

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE**  
**ANTICORPOS CONTRA CANAIS PARA SÓDIO**  
**VOLTAGEM DEPENDENTES**

---

**STEPHANIE STRANSKY LÁUAR**

**BELO HORIZONTE**

**OUTUBRO DE 2012**

**STEPHANIE STRANSKY LÁUAR**

**GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
ANTICORPOS CONTRA CANAIS PARA SÓDIO  
VOLTAGEM DEPENDENTES**

---

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Neurociências.

**ORIENTADOR: Dr. Carlos Chavez Olórtegui**

**CO-ORIENTADOR: Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela**

**BELO HORIZONTE**

**OUTUBRO DE 2012**

043

Láuar, Stephanie Stransky.

Geração e caracterização molecular de anticorpos contra canais para sódio voltagem dependentes [manuscrito] / Stephanie Stransky Láuar. – 2012.

94 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Chavez Olórtgui. Co-orientadora: Liza Figueiredo Felicori Vilela.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Canais de sódio disparados por voltagem. 2. Anticorpos – Teses. 3. Peptídios alpha. 4. Seguimento extracelular. 5. Neurociências – Teses. I. Chavez Olórtgui, Carlos. II. Vilela, Liza Figueiredo Felicori. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

***Este trabalho foi realizado:***

no Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, ICB, UFMG.

***E, contou com o apoio financeiro do:***

CNPq;

CAPES.

## ***Dedicatória***

Aos meus pais e meu irmão, por serem a base da minha estrutura.

*“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.*

*Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”*

*(Clarice Lispector)*

## ***Agradecimentos***

A Deus, por ter guiado os meus passos durante esta trajetória.

Ao Prof. Dr. Carlos Chavez, por ter acreditado em mim, por todas as oportunidades e principalmente por todo o aprendizado que me proporcionou nestes poucos anos de convivência.

À Profa. Dra. Liza Felicori, por ter me ensinado a fazer pesquisa. Obrigada pela convivência diária agradável, pela disponibilidade, paciência e incentivo.

À Profa. Dra. Ângela Ribeiro por toda a ajuda e incentivo.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Beirão pelas discussões proveitosas e por ter cedido gentilmente as células utilizadas neste estudo.

À Profa. Dra. Fabíola Mara Ribeiro por ter cedido gentilmente os extratos de cérebro de camundongo utilizados neste estudo.

À Profa. Dra. Rafaela Ferreira, pela convivência agradável.

Ao Dr. Ricardo Andrez pela ajuda com a síntese de peptídeos e espectrometria de massas. Obrigada pela amizade e por todos os conselhos!

À Dra. Clara Guerra, por todas as discussões proveitosas sobre o mundo do SPOT e por toda a ajuda com as meninas coelhas!

À Camila Lopes, pela ajuda com a cultura celular, pela paciência e disponibilidade.

Ao Dr. Enéas Gomes pela ajuda com os ensaios de imunohistoquímica e análise no confocal.

A Daiana Cardoso pela ajuda nos experimentos de *patch clamp* e pelas conversas agradáveis.

Ao Jammil pelo bom humor sempre e por toda a ajuda durante este trabalho.

À Karen, Bruna e Ed pela amizade, disponibilidade e por toda a ajuda nos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas: Luís, Fernanda, Gabi, Chico, Daysi, Thaís, Raphael, Carol, Polly, Guilherme, Rebeka, Mariana, Tasla, Edgard, Benjamin, Filipe, Luana, Pollyanne e Úrsula pela amizade e disponibilidade e por tornarem os meus dias mais alegres!

Aos colegas da Neurociências, em especial à Celina Pires, pelo companheirismo, amizade, por todas as conversas agradáveis e por sempre estar presente!

À Vanessa, Carlos e D. Neli pelo carinho e ajuda na resolução de problemas.

À minha família, por acreditar em mim, por todo o amor e paciência e por sempre estar presente nos momentos mais importantes. Mãe, obrigada por nunca ter me deixado desistir!

Ao Bruno por toda a paciência e amor.

As minhas amigas: Clarissa, Ju, Rebeca e Cláudia pela amizade verdadeira e por entenderem meus momentos de ausência.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## Índice

Lista de figuras.....	I
Lista de tabelas .....	III
Lista de siglas e abreviaturas.....	IV
Quadro de aminoácidos .....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
1. INTRODUÇÃO .....	2
1.1 Canais iônicos.....	2
1.2 Canais para sódio voltagem dependentes.....	6
1.3 Ferramentas para o estudo de canais para Na <sup>+</sup> .....	14
2. OBJETIVOS .....	26
2.1 Geral .....	26
2.2 Específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Seleção da sequência extracelular comum a todos os subtipos do canal para sódio voltagem dependente.....	29
3.1.1 Recuperação de sequências de canais iônicos para sódio.....	29
3.1.2 Alinhamento de sequência.....	29
3.2 Predição de regiões imunogênicas.....	29
3.3 Verificação da exclusividade da região em canais para sódio .....	30
3.4 Síntese do peptídeo.....	30
3.4.1 Seleção do peptídeo.....	30
3.4.2 Síntese solúvel do peptídeo comum a todos os subtipos do canal para Na <sup>+</sup> .....	31
3.4.3 Purificação do peptídeo e espectrometria de massas.....	32
3.5 Produção de anticorpos anti-peptídeo .....	33
3.5.1 Acoplamento do peptídeo à ovalbumina.....	33
3.5.2 Imunizações.....	33
3.5.3 Purificação de imunoglobulinas.....	34



3.5.4	Produção de fragmentos Fab.....	34
3.6	Teste para reatividade dos anticorpos.....	34
3.6.1	ELISA indireta.....	34
3.6.2	SPOT synthesis.....	35
3.6.2.1	Síntese.....	35
3.6.2.2	Imunoensaio.....	36
3.6.2.3	Revelação por fosfatase alcalina.....	37
3.6.2.4	Quantificação.....	37
3.6.2.5	Regeneração.....	37
3.7	Determinação dos aminoácidos críticos do peptídeo para interação com o anticorpo .....	38
3.7.1	Alanina-Scan.....	38
3.8	Avaliação da ligação de imunoglobulinas à células HEK expressando Na <sub>v</sub> 1.3 .....	38
3.8.1	Cultivo de células HEK 293 e HEK Na <sub>v</sub> 1.3.....	38
3.8.2	Imunohistoquímica.....	39
3.9	Avaliação da reatividade dos anticorpos frente a extrato de cérebro de camundongo .....	39
3.9.1	Imunoblot.....	39
3.10	Avaliação do efeito dos anticorpos em correntes para sódio .....	40
3.10.1	Eletrofisiologia.....	40
3.10.2	Análise estatística dos dados.....	42
4.	RESULTADOS .....	44
4.1	Seleção da sequência extracelular comum a todos os subtipos do canal para sódio voltagem dependente .....	44
4.1.1	Recuperação de sequências de canais iônicos para sódio.....	44
4.1.2	Determinação de segmentos extracelulares.....	45
4.1.3	Alinhamento de sequência.....	47
4.2	Predição de regiões imunogênicas.....	48
4.3	Verificação da exclusividade da região em canais para sódio .....	49

4.4	Síntese do peptídeo .....	49
4.4.1	Seleção e síntese do peptídeo.....	49
4.4.2	Purificação do peptídeo e espectrometria de massas.....	50
4.5	Reatividade dos anticorpos anti-peptídeo alpha .....	52
4.5.1	ELISA indireta.....	52
4.5.2	SPOT.....	55
4.6	Determinação dos aminoácidos críticos do peptídeo para interação com o anticorpo .....	57
4.6.1	Alanina-Scan.....	57
4.7	Avaliação da ligação de imunoglobulinas à células HEK expressando Na <sub>v</sub> 1.3 .....	63
4.7.1	Imunohistoquímica.....	63
4.8	Avaliação da reatividade dos anticorpos frente a extrato de cérebro de camundongo .....	65
4.8.1	Imunoblot.....	65
4.9	Avaliação do efeito dos anticorpos na corrente para sódio .....	67
4.9.1	Eletrofisiologia.....	67
5.	DISCUSSÃO .....	70
6.	CONCLUSÕES .....	80
7.	PERSPECTIVAS .....	82
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
9.	ANEXO.....	94

## Lista de figuras

FIGURA 1: Canais iônicos dependentes de voltagem.....	3
FIGURA 2: Estrutura das subunidades do canal para sódio.....	6
FIGURA 3: Mutações do canal Na <sub>v</sub> 1.1.....	8
FIGURA 4: Cascata metastática.....	13
FIGURA 5: Sítios receptores para neurotoxinas em canais para sódio voltagem dependentes.....	17
FIGURA 6: Sítios aproximados de ligação de anticorpos nos canais para sódio voltagem dependentes.....	21
FIGURA 7: Desenho experimental.....	28
FIGURA 8: Traçados representativos do protocolo utilizado na eletrofisiologia.....	42
FIGURA 9: Sequência recuperada do subtipo Na <sub>v</sub> 1.1 do canal para sódio.....	44
FIGURA 10: Alinhamento parcial de todas as isoformas de canais para sódio.....	47
FIGURA 11: Predição de regiões imunogênicas.....	48
FIGURA 12: Purificação do peptídeo em HPLC.....	50
FIGURA 13: Espectrometria de massas.....	51
FIGURA 14: Reatividade, medida por ELISA, do soro anti-peptídeo alpha-OVA.....	53
FIGURA 15: Reatividade, medida por ELISA, da IgG anti-peptídeo alpha.....	54
FIGURA 16: Reatividade dos peptídeos alpha e mimético do segmento extracelular 11 do canal para sódio por SPOT.....	57
FIGURA 17: Gráfico de reatividade e membrana de ALA-Scan do peptídeo alpha, testado com o soro anti-peptídeo alpha-OVA.....	58

FIGURA 18: Gráficos de reatividade e membrana de ALA-Scan testadas com o soro de camundongos imunizados com o peptídeo alpha-OVA.....	60
FIGURA 19: Imagens representativas mostrando a ligação da imunoglobulina à membrana de células HEK Na <sub>v</sub> 1.3.....	64
FIGURA 20: Análise de proteínas do córtex de camundongo em gel de poliacrilamida e Western blot.....	65
FIGURA 21: Reatividade, medida por ELISA, da IgG anti-peptídeo alpha e IgG pré-imune frente ao extrato de córtex.....	66
FIGURA 22: Traçados representativos da corrente de sódio em células HEK Na <sub>v</sub> 1.3.....	68

## Lista de tabelas

TABELA 1: Principais subunidades e localização subcelular dos canais para cálcio em neurônios centrais de mamíferos.....	4
TABELA 2: Principais subunidades e localização subcelular dos canais para potássio em neurônios centrais de mamíferos.....	5
TABELA 3: Principais subunidades e localização subcelular dos canais para sódio no sistema nervoso central de mamíferos.....	9
TABELA 4: Sítios receptores identificados por neurotoxinas em canais para sódio.....	15
TABELA 5: Anticorpos dirigidos contra segmentos dos isotipos de canal para Na <sup>+</sup> .....	23
TABELA 6: Anotação dos 24 segmentos transmembranares do subtipo Na <sub>v</sub> 1.1.....	45
TABELA 7: Dedução dos 12 segmentos extracelulares da isoforma Na <sub>v</sub> 1.1.....	46
TABELA 8: Peptídeos alpha e mimético do 11º segmento extracelular com suas sequências invertidas sintetizados na membrana de SPOT.....	55

## Lista de siglas e abreviaturas

aa	Aminoácido
Abs	Absorbância
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBS	Tampão ácido cítrico, KCl, NaCl
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DIPC	Diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence Immnoblotting</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	Fluorenil metil oxicarbonila
HEK	Human Embryonic Kidney
HOBT	Hidroxibenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IgG	Imunoglobulina G
LqTx	Toxina do escorpião <i>Leiurus quinquestriatus</i>
MTT	Bromídeo de 3-(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium
mV	Milivolts
nm	Nanômetro
OPD	Ortofenilenodiamino

OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão salina fostato
pI	Ponto isoelétrico
RPM	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
STX	Saxitoxina
TBS	Tampão Tris, KCl, NaCl
TFA	Ácido trifluoracético
TTX	Tetrodotoxina
VGIC	<i>Voltage gated ion channel</i>
VGSC	<i>Voltage gated sodium channel</i>

## Quadro de aminoácidos

NOME	SÍMBOLO	ABREVIÇÃO
Glicina	Gly, Gli	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Iso	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe, Fen	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys, Cis	C
Tirosina	Tyr, Tir	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D
Glutamato ou Ácido Glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys, Lis	Y
Histidina	His	H
Triptofano	Trp, Tri	W
Metionina	Met	M



## RESUMO

Canais para sódio voltagem dependentes ( $\text{Na}_v$ ) são canais iônicos responsáveis pela iniciação e propagação de potenciais de ação em células eletricamente excitáveis. Estes canais são expressos em células metastáticas de diversos tipos de câncer, e mutações associadas a eles estão relacionados à síndromes epiléticas, miopatias esqueléticas, arritmias cardíacas, neuropatias entre outras. Devido ao importante papel dos canais para  $\text{Na}^+$  em diferentes patologias, o objetivo deste estudo foi a produção de anticorpos contra uma sequência extracelular conservada das subfamílias  $\text{Na}_v$ . A sequência de 15 aminoácidos (peptídeo alpha) correspondente ao 11º segmento extracelular localizado no domínio IV do canal  $\text{Na}_v1.1$ , foi sintetizada utilizando o método FMOC. Camundongos Balb/C e coelhos New Zealand foram imunizados com o peptídeo sintético conjugado à ovalbumina. Anticorpos anti-peptídeo alpha foram testados quanto à capacidade de reconhecer tanto o próprio peptídeo alpha, através de ensaios de ELISA e SPOT, mas também de reconhecer o próprio canal para  $\text{Na}^+$ , tanto em células HEK expressando o canal  $\text{Na}_v1.3$  e também em extrato de córtex de cérebro de camundongos. Os resultados demonstraram que o peptídeo sintetizado é capaz de induzir a produção de anticorpos sítio específicos. Além disso, nossa metodologia foi eficaz no mapeamento de um sítio extracelular do canal para  $\text{Na}^+$  e para a identificação de resíduos de aminoácidos críticos para a interação com o anticorpo, proporcionando novas perspectivas para o estudo da modulação de canais para  $\text{Na}^+$  e seus efeitos fisiopatológicos associados.

**Palavras-chave:** canais para  $\text{Na}^+$ , anticorpo, peptídeo alpha, segmento extracelular

## ABSTRACT

Voltage-gated sodium channels ( $\text{Na}_v$ ) are ion channels responsible for the initiation and propagation of action potentials in electrically excitable cells. These channels are expressed in metastatic cells of several types of cancer, and mutations associated with them are related to epileptic syndromes, skeletal myopathy, cardiac arrhythmias, neuropathies and others. Due to the important role of  $\text{Na}^+$  channels in different pathologies, the aim of this study was the production of antibodies against a conserved extracellular sequence of the  $\text{Na}_v$  subfamilies. The sequence of 15 amino acids (alpha peptide) corresponding to the 11<sup>o</sup> extracellular segment located in domain IV of  $\text{Na}_v1.1$  channel, was synthesized using the Fmoc method. Balb/C mice and New Zealand rabbits were immunized with the synthetic peptide conjugated to ovalbumin. Alpha peptide antibodies were tested for their ability to recognize alpha peptide in an ELISA and SPOT assay, and also for their ability to recognize the  $\text{Na}^+$  channel in HEK cells expressing  $\text{Na}_v1.3$  channels and mouse brain cortex extract. The results showed that the synthesized peptide was capable of inducing the production of site specific antibodies. Moreover, our method was effective in mapping a  $\text{Na}^+$  channel extracellular site and in identification of critical amino acids residues for the interaction with the antibody, providing new prospects for studying modulation of sodium channel and their associated pathophysiological effects.

**Keywords:**  $\text{Na}^+$  channel, antibody, alpha peptide, extracellular segment

# INTRODUÇÃO

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Canais iônicos

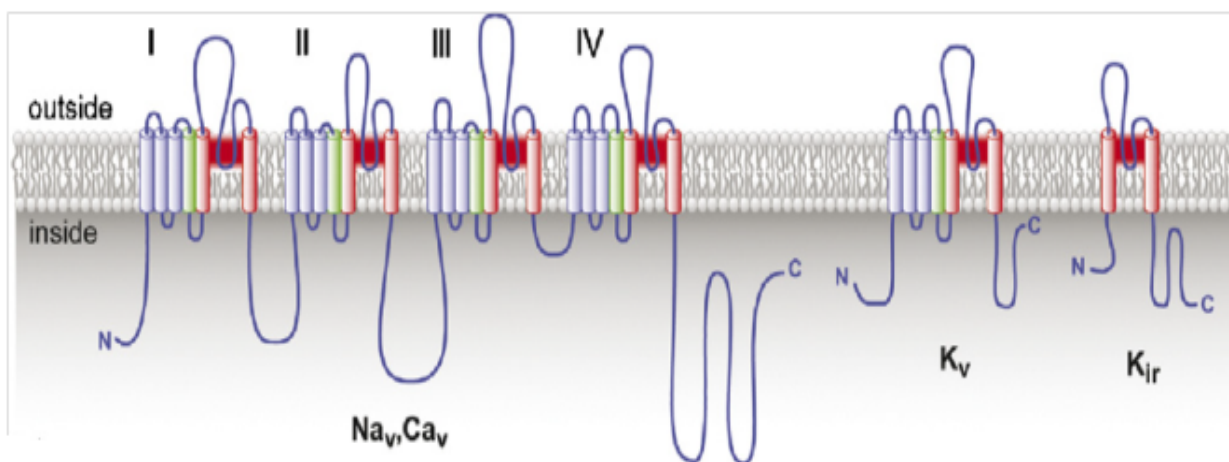
Canais iônicos são proteínas de membrana que formam poros hidrofílicos por onde passa um fluxo controlado de íons, em resposta a um gradiente eletroquímico (Morera et al., 2007). São divididos em duas classes: canais dependentes de ligante e canais dependentes de voltagem. Canais dependentes de ligante são acionados pela ligação de substâncias específicas, tais como acetilcolina (Stryer et al., 2002).

Canais dependentes de voltagem (VGICs) pertencem a uma diversa classe de proteínas integrais de membrana responsáveis pela transmissão de sinais eletroquímicos, necessários para a geração e condução dos potenciais de ação (Catterall et al., 2007).

Membros desta superfamília de proteínas conduzem sinais elétricos que controlam a contração muscular, a secreção de hormônios, o processamento de informações cerebrais, além de ter uma influência sobre o metabolismo intracelular, a transdução de sinais, a expressão de genes e a síntese e degradação de proteínas (Catterall et al., 2007).

Os canais iônicos são formados por uma subunidade  $\alpha$ , que contém quatro domínios (I-IV), como no caso dos canais para sódio ( $\text{Na}_v$ ) e para cálcio ( $\text{Ca}_v$ ). Um VGIC pode também ser formado por quatro subunidades  $\alpha$ , cada uma contendo apenas um domínio, como no caso do canal para potássio ( $\text{K}_v$ ) (Lai e Jan, 2006) (Figura 1). Cada domínio contém seis segmentos transmembranares helicoidais (S1-S6) que são divididos em dois módulos distintos: o módulo sensível à voltagem, delimitado pelos segmentos S1-S4, e o módulo formador do poro, delimitado pelos segmentos S5-S6. O quarto segmento transmembranar, S4, de cada domínio atua como o principal sensor de voltagem, que responde a mudanças no potencial

elétrico transmembranar (Vacher et al., 2007), e os segmentos transmembranares S5 e S6, de cada monômero, se reúnem em torno de um eixo para formar o poro condutor de íons do canal (Jiang e Gonen, 2012). A interação da subunidade  $\alpha$  com a subunidade  $\beta$ , ou com outras proteínas, pode modular a função do canal iônico (Lai e Jan, 2006).



**Figura 1: Canais iônicos dependentes de voltagem.** Diferentes membros da superfamília de canais iônicos estão ilustrados. Cilindros representam as  $\alpha$ -hélices transmembranares. Em vermelho, S5-S6, segmentos formadores do poro. Em verde, S4, sensor de voltagem. Em azul, S1-S3, segmentos transmembranares (Catterall et al., 2007).

Canais para cálcio regulam o influxo deste íon em resposta à despolarização da membrana e regulam processos intracelulares como secreção e neurotransmissão em diferentes tipos celulares. São classificados em três famílias funcionalmente e estruturalmente relacionadas - Ca<sub>v</sub>1, Ca<sub>v</sub>2 e Ca<sub>v</sub>3 – que estão localizadas no sistema nervoso central de mamíferos (Catterall, 2012), onde possuem localizações subcelulares distintas (Tabela 1).

Migrânea, paralisia periódica, arritmia cardíaca e uma desordem do espectro do autismo são algumas das doenças, causadas por mutações, descritas por Catterall e colaboradores (Catterall et al., 2008) para o canal para cálcio.

**Tabela 1: Principais subunidades e localização subcelular dos canais para cálcio em neurônios centrais de mamíferos (Vacher et al., 2008).**

Canal	Gene	Localização subcelular
Ca <sub>v</sub> 1.2	CACNA1C	Soma, dendritos
Ca <sub>v</sub> 1.3	CACNA1D	Soma, dendritos proximais
Ca <sub>v</sub> 2.1	CACNA1A	Axônio, soma somatodendrítico
Ca <sub>v</sub> 2.2	CACNA1B	Axônio, soma somatodendrítico
Ca <sub>v</sub> 2.3	CACNA1E	Soma, dendritos
Ca <sub>v</sub> 3.1	CACNA1G	Soma, dendritos proximais
Ca <sub>v</sub> 3.2	CACNA1H	Soma, dendritos proximais
Ca <sub>v</sub> 3.3	CACNA1I	Soma, dendritos

Canais para potássio desempenham um papel fundamental na restauração do potencial de membrana e, desta forma, são responsáveis pelo controle da sinalização elétrica em células excitáveis e pela regulação do fluxo de íons e do transiente de cálcio em células não excitáveis (Catterall et al., 2007). São proteínas de 65-95 kDa (Rehm e Tempel, 1991) que são classificadas em quatro famílias (K<sub>v</sub>1 - K<sub>v</sub>4), tendo como base a homologia na sequência de aminoácidos. Recentemente, foram descritas subunidades  $\alpha$  para as famílias K<sub>v</sub>5 a K<sub>v</sub>12 (Vacher et al., 2008).

Estudos relatam o envolvimento destes canais em diversos processos fisiológicos, incluindo a regulação do volume celular, apoptose, imunomodulação e diferenciação, e parecem estar envolvidos, também, na proliferação e progressão do ciclo celular em mamíferos (Felipe et al., 2012). No cérebro de mamíferos, grande

parte da expressão destes canais é restrita a neurônios do sistema nervoso central (Kullmann, 2010), embora células gliais possam expressar um subconjunto do repertório neuronal. A tabela 2 descreve a localização subcelular dos canais para potássio em neurônios centrais de mamíferos.

Mutações humanas foram identificadas em apenas alguns genes dos canais para potássio. Estas mutações são responsáveis pelo desenvolvimento de epilepsia, discinesia paroximal (crises de movimentos involuntários), ataxia progressiva, fraqueza do músculo esquelético (paralisia periódica) e arritmia cardíaca (Kullmann, 2010).

**Tabela 2: Principais subunidades e localização subcelular dos canais para potássio em neurônios centrais de mamíferos** (Vacher et al., 2008). As subunidades não demonstradas nesta tabela possuem localização cerebral desconhecida.

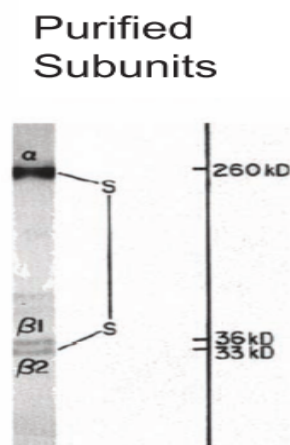
Canal	Gene	Localização subcelular
K <sub>v</sub> 1.1	KCNA1	Axônio
K <sub>v</sub> 1.2	KCNA2	Axônio
K <sub>v</sub> 1.3	KCNA3	Axônio
K <sub>v</sub> 1.4	KCNA4	Axônio
K <sub>v</sub> 1.6	KCNA6	Axônio
K <sub>v</sub> 2.1	KCNB1	Soma, dendritos proximais
K <sub>v</sub> 2.2	KCNB2	Soma, dendritos
K <sub>v</sub> 3.1	KCNC1	Axônio
K <sub>v</sub> 3.2	KCNC2	Soma, dendritos
K <sub>v</sub> 3.3	KCNC3	Axônio
K <sub>v</sub> 3.4	KCNC4	Axônio
K <sub>v</sub> 4.1	KCND1	Soma, dendritos
K <sub>v</sub> 4.2	KCND2	Soma, dendritos
K <sub>v</sub> 4.3	KCND3	Soma, dendritos
K <sub>v</sub> 7.2	KCNQ2	Axônio
K <sub>v</sub> 7.3	KCNQ3	Axônio, soma, dendritos
K <sub>v</sub> 7.5	KCNQ5	Soma, dendritos

## 1.2 Canais para sódio voltagem dependentes

Canais para sódio foram os primeiros membros da superfamília de canais iônicos a serem descritos. Pesquisas sobre a sinalização elétrica em nervos, músculos e outras células excitáveis tiveram início em 1952 com a publicação de quatro artigos por Hodgkin e Huxley nos quais descreviam o potencial de ação em axônios gigantes de lula usando a técnica de *voltage clamp*. Eles observaram, neste trabalho, que os sinais elétricos eram iniciados pela ativação da corrente de sódio, dependente de voltagem, que transporta íons  $\text{Na}^+$  dos canais para dentro das células (Hodgkin e Huxley, 1952 a, b, c, d).

Canais para sódio voltagem dependentes ( $\text{Na}_v$ ) são elementos críticos para a iniciação do potencial de ação e propagação em células excitáveis devido ao seu papel na despolarização inicial da membrana.

Em 1980, toxinas de escorpião foram usadas para identificar as subunidades da proteína do canal, revelando uma grande subunidade  $\alpha$  de 260kDa e uma subunidade menor  $\beta$  de 30-40kDa (Figura 2) (Beneski e Catterall, 1980; Catterall, 2012).



**Figura 2: Estrutura das subunidades do canal para sódio.** Gel de poliacrilamida SDS ilustrando as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do canal para sódio do cérebro (Catterall, 2012).

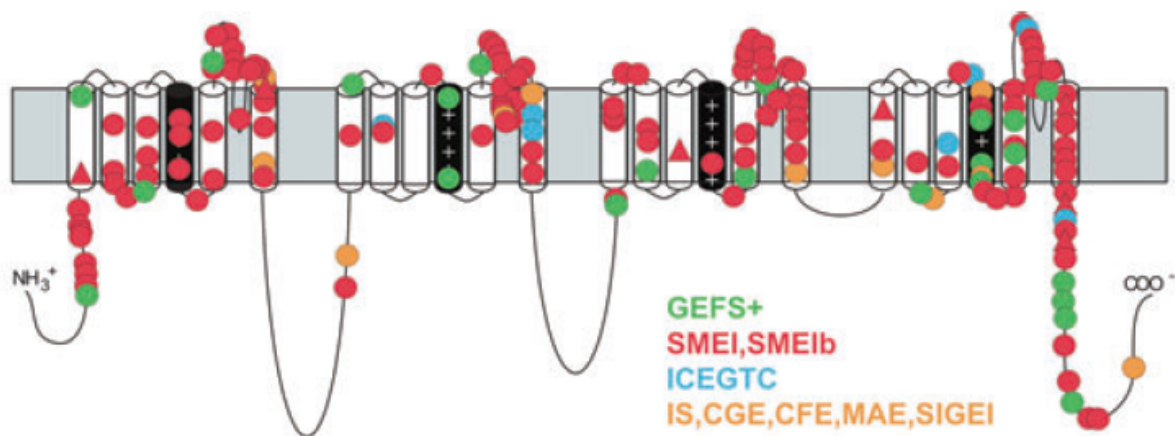


Uma grande variedade de canais para sódio foi identificada por registros eletrofisiológicos, purificação e clonagem (Goldin, 2001). Para diferenciar os diversos tipos, uma nomenclatura baseada em canais de potássio foi adotada (Gutman e Chandy, 1993). Nesta nomenclatura, o nome do canal consiste do símbolo do íon ao qual ele é permeável ( $\text{Na}^+$ ) com seu principal tipo de regulação (voltagem) indicado em subscrito ( $\text{Na}_v$ ). O número seguinte ao subscrito indica a subfamília (atualmente somente a  $\text{Na}_v1$ ), e o número seguindo o ponto identifica a isoforma específica do canal, como por exemplo,  $\text{Na}_v1.1$ . Este último número foi determinado de acordo com a ordem em que cada gene foi identificado. Variantes provenientes de *splice* para cada membro da família são identificadas por letras minúsculas após os números ( $\text{Na}_v1.1a$ ).

Em mamíferos, 11 genes (SCN1A – SCN11A) codificam uma família de 9 canais para sódio voltagem dependentes funcionalmente expressos (VGSC  $\text{Na}_v1.1$  a  $\text{Na}_v1.9$ ), apresentando uma identidade de sequência superior a 50% nos domínios transmembranares e extracelulares (Catterall et al., 2005). Entretanto, são observadas diferenças na expressão destes subtipos em células e tecidos, assim como em diferentes fases do desenvolvimento, consistente com um papel distinto de cada isoforma na fisiologia dos mamíferos.

O subtipo  $\text{Na}_v1.1$  foi identificado em neurônios do sistema nervoso central (SNC), embora tenha sido descrito também em altos níveis em neurônios do sistema nervoso periférico (SNP). No SNC é encontrado em altos níveis no hipocampo, corpo estriado, cerebelo, tronco cerebral, córtex e substância negra (Beckh, 1990).

O subtipo  $\text{Na}_v1.1$  codificado pelo gene  $\text{SCN1A}$  é alvo de mais de 600 mutações (Figura 3) (Catterall et al., 2008). Fenótipos severos de epilepsia foram associados a mutações de perda de função e deleções de exóns que resultaram na falta de um ou mais domínios (Waxman, 2007). Barela e colaboradores (Barela et al., 2006) notaram que a gravidade das formas familiares de epilepsia, resultante de mutações no canal  $\text{Na}_v1.1$ , varia de leve a profunda, com os fenótipos mais severos sendo associados com mutações que reduzem a atividade do canal para sódio.



**Figura 3: Mutações do canal  $\text{Na}_v1.1$ .** Mutações em pacientes com epilepsia. A forma clínica da epilepsia está indicada por cores: GEFS+, epilepsia generalizada com crises febris; SMEI, epilepsia mioclônica grave infantil; SMEIb, SMEI *borderline*; ICEGTC, epilepsia idiopática infantil com convulsões generalizadas; IS, espasmos infantis; CGE, epilepsia criptogênica generalizada; CFE, epilepsia focal criptogênica; MAE, epilepsia mioclônica astática; SIGEI, epilepsia idiopática generalizada da infância grave (Catterall et al., 2008).

Os níveis de Na<sub>v</sub>1.2 e Na<sub>v</sub>1.3 são significativamente maiores em neurônios do SNC. O subtipo Na<sub>v</sub>1.2 é observado em regiões como globo pálido, hipocampo e tálamo (Beckh, 1990).

Em contraste aos altos níveis de mutações encontradas no subtipo Na<sub>v</sub>1.1, as mutações no gene SCN2A, que codifica o subtipo Na<sub>v</sub>1.2, são menos frequentes, mas apresentam em comum a perda parcial de função do canal. Evidências menos diretas implicam o gene SCN3A, codificador da isoforma Na<sub>v</sub>1.3, na epilepsia (Kullmann, 2010).

Na<sub>v</sub>1.6 é o subtipo mais expresso em neurônios do SNC. Encontrado no cerebelo, córtex cerebral e hipocampo. Pode também ser detectado em células ganglionares da raiz dorsal (DRG), astrócitos e células de Schwann (Schaller et al., 1995).

A tabela 3 descreve a localização subcelular dos subtipos Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3 e Na<sub>v</sub>1.6.

**Tabela 3: Principais subunidades e localização subcelular dos canais para sódio no sistema nervoso central de mamíferos (Vacher et al., 2008).**

Canal	Gene	Localização subcelular
Na <sub>v</sub> 1.1	SCN1A	Soma, dendritos
Na <sub>v</sub> 1.2	SCN2A	Axônio
Na <sub>v</sub> 1.3	SCN3A	Soma, dendritos
Na <sub>v</sub> 1.6	SCN8A	Axônio, soma somatodendrítico

A isoforma  $Na_v1.4$  é expressa em altos níveis no músculo esquelético adulto e em baixos níveis no músculo esquelético neonatal, mas não apresenta expressão no cérebro e coração (Trimmer et al., 1990).

Mutações múltiplas nesta isoforma produzem canais para sódio hiperativos no músculo esquelético responsáveis pela paralisia hipercalêmica periódica, doença caracterizada por fraqueza muscular que pode ser agravada por altos níveis séricos de potássio. É descrita também a paramiotonia congênita, uma síndrome que causa rigidez muscular (Cannon, 1996).

$Na_v1.5$  está presente em altos níveis no coração. Não é observado no músculo esquelético adulto, mas pode ser encontrado no músculo esquelético neonatal e após deservação do músculo. Pode estar presente também em alguns neurônios cerebrais (Hartmann et al., 1999).

Mutações na isoforma  $Na_v1.5$  que prejudicam a inativação são a causa da síndrome herdada do QT longo tipo 3 e da síndrome de Brugada (mutação de perda de função). Ambas levam a um aumento do risco de arritmias ventriculares (Yu e Catterall, 2003).

O subtipo  $Na_v1.7$  é encontrado no SNP, em todos os tipos de neurônios DRG (particularmente em células nociceptivas), em células de Schwann e em células neuroendócrinas (Klugbauer et al., 1995).

Recentes estudos em humanos relacionaram diretamente o canal  $Na_v1.7$  a três distúrbios da dor: eritromelalgia herdada (IEM), desordem paroxística de dor extrema (PEPD) e insensibilidade congênita a dor (CIP). Mutações de ganho de função no gene SCN9A ( $Na_v1.7$ ) causam a IEM, caracterizada por episódios de dor ardente, eritema e um leve inchaço das mãos e dos pés, que são desencadeados por calor ou exercícios leves (Waxman, 2007). Um conjunto diferente de mutações

por ganho de função foi identificado em pacientes com PEPD. A dor severa nestes pacientes é induzida pelo movimento do intestino e algumas vezes são acompanhadas por crises não epiléticas tônicas e déficits cardíacos (Fertleman et al., 2007). Uma terceira classe de mutações envolvendo o gene SCN9A comporta-se de modo recessivo e causam completa insensibilidade à dor. Crianças afetadas frequentemente se auto mutilam ou sofrem as consequências de fraturas ósseas não cicatrizadas (Kullmann, 2010).

Em 2006, Cox e colaboradores relataram a completa incapacidade para percepção da dor em três famílias consanguíneas do norte do Paquistão. Análises das sequências do gene SCN9A nos indivíduos afetados revelaram três mutações distintas que causavam a perda de função dos canais  $Na_v1.7$ . Os resultados deste trabalho sugeriram que o gene SCN9A é um requisito essencial para a nocicepção em humanos (Cox et al., 2006).

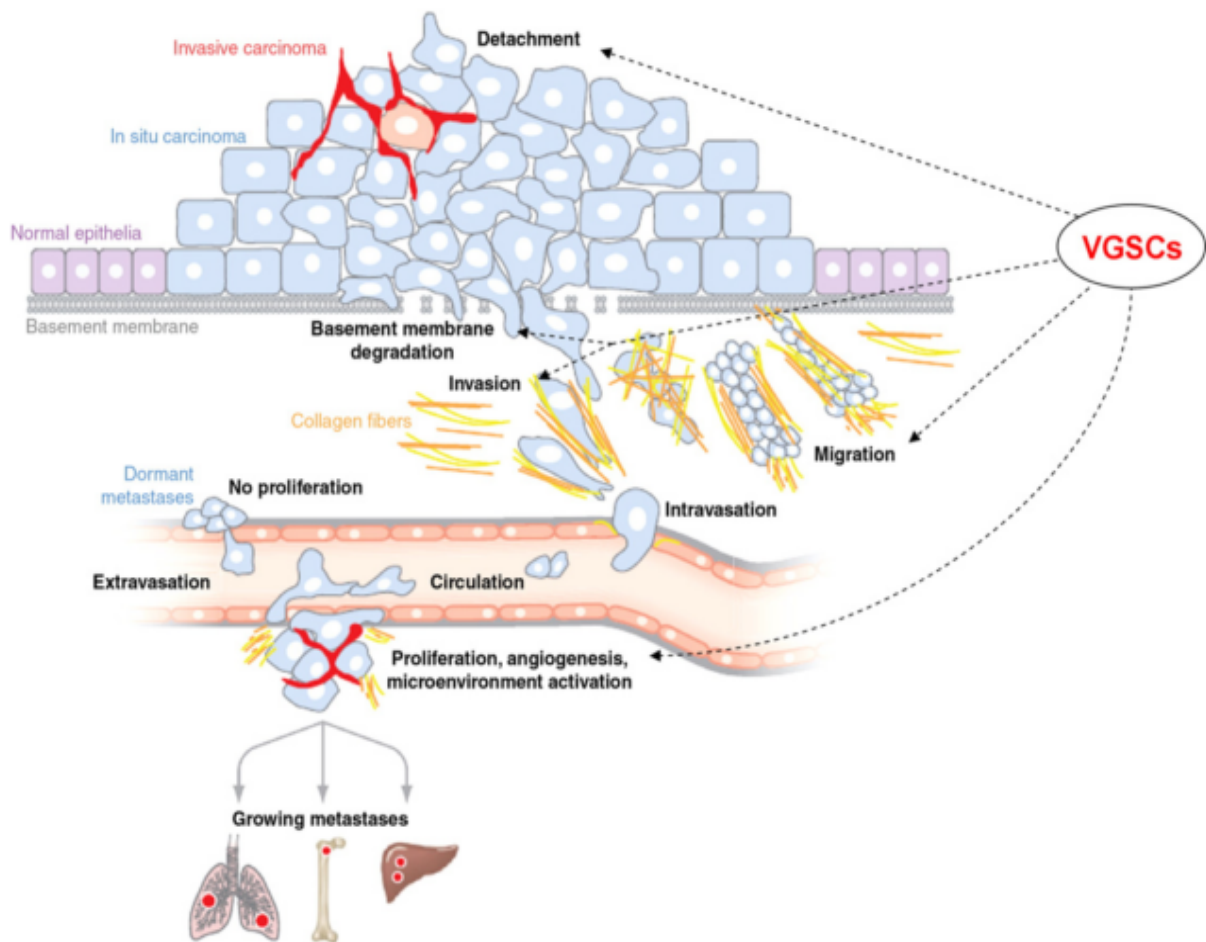
A expressão de  $Na_v1.8$  é mais localizada e encontra-se principalmente em neurônios sensitivos de pequeno diâmetro dos gânglios da raiz dorsal e gânglios trigeminais (Akopian et al., 1996).

Em camundongos sem o canal  $Na_v1.8$  foi demonstrado um comportamento relacionado à dor reduzido, em diversos modelos de dor inflamatória, provavelmente devido a ausência de regulação positiva na transcrição deste canal. Portanto, o papel desta isoforma na geração e manutenção da dor neuropática parece ser essencial (Lampert et al., 2010).

A isoforma  $Na_v1.9$  é expressa em pequenas fibras (neurônios sensitivos) dos gânglios da raiz dorsal e gânglios trigeminais (Dib-Hajj et al., 1999). Estes canais são afetados por mutações que provocam a síndrome da dor neuropática periférica (Savio-Galimberti et al., 2012).

Além do envolvimento dos canais para sódio em todas as patologias já descritas neste trabalho, foi descrito seu envolvimento em processos que levam ao câncer. Em particular, os canais parecem estar fortemente associados com o potencial metastático, como evidenciado por seus altos níveis de expressão em vários carcinomas agressivos e por seu papel no controle de várias etapas da cascata metastática (Figura 4). Após a degradação da membrana basal, as células tumorais invadem o estroma circundante, migram para a circulação linfática ou sanguínea e se prendem aos capilares em órgãos distantes. A formação de tumores secundários ocorre após proliferação, indução da angiogênese e ativação do microambiente (Onkal e Djamgoz, 2009).

Estudos estruturais e funcionais indicam que cânceres altamente metastáticos, expressam principalmente isoformas embrionárias dos VGSC, apoiando a ideia de que os genes humanos embrionários possam ser re-expressos em células cancerosas. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela regulação positiva do canal e pelos seus papéis pró-invasivos ainda são pouco conhecidos (Prevarskaya et al., 2010).



**Figura 4: Cascata metastática.** Canais para sódio voltagem dependentes (VGSCs) estão envolvidos no controle de vários componentes da cascata metastática, como indicado pelas setas (Onkal e Djamgoz, 2009).

### 1.3 Ferramentas para o estudo de canais para Na<sup>+</sup>

Aspectos funcionais do canal para sódio dependente de voltagem podem ser observados através da técnica de *patch clamp*. Esta técnica pode ser aplicada para medição da corrente iônica através de um único canal ou através de um conjunto de canais expressos em toda a célula (modo *whole cell*). O modo *whole cell* é mais frequente para medição de correntes iônicas e o único que permite a medição de potenciais de ação (Karmazinova e Lacinova, 2010). Através desta configuração é possível realizar uma análise detalhada do funcionamento do canal para sódio após manipulação com uma diversidade de compostos como neurotoxinas ou imunoglobulinas.

Canais para sódio são alvos moleculares para diversos grupos de neurotoxinas, as quais alteram sua função através da ligação a diferentes sítios dos mesmos. Devido a sua alta afinidade e especificidade, as neurotoxinas representam ferramentas eficazes para o estudo da estrutura e função dos canais para sódio. Foram identificados pelo menos seis sítios receptores usando diferentes neurotoxinas (Tabela 4) (Figura 5) (Cestèle e Catterall, 2000).

Os primeiros estudos farmacológicos levaram à conclusão que neurotoxinas agem em quatro sítios receptores e têm efeitos tanto na permeabilidade aos íons quanto na modulação da voltagem (Catterall, 1980). Estudos posteriores descreveram mais dois sítios, nos quais neurotoxinas se ligam e alteram o equilíbrio entre o estado aberto e fechado dos canais (Martin-Eauclaire e Couraud, 1992).



**Tabela 4: Sítios receptores identificados por neurotoxinas em canais para sódio.** SS1 e SS2, segmentos reentrantes; S1-S6, segmentos transmembranares (Cestèle e Catterall, 2000).

	<b>Toxina</b>	<b>Domínio e Segmento</b>
<b>Sítio 1</b>	Tetrodotoxina	I SS2 – S6
	Saxitoxina	II SS2 – S6
		III SS2 – S6
		IV SS2 – S6
		IV SS2 – S6
	$\mu$ - Conotoxina	I SS2 – S6
		II S5 – S6
III SS2 – S6		
IV SS2 – S6		
<b>Sítio 2</b>	Veratridina	I S6
	Batracotoxina	
	Grayanotoxina	IV S6
<b>Sítio 3</b>	$\alpha$ -toxinas de escorpião	I S5-S6
	Toxinas anêmona do mar	IV S5-S6
	Toxinas de aranha	IV S3-S4
<b>Sítio 4</b>	$\beta$ -toxinas de escorpião	I S5-SS1
		II S1-S2
		II S3-S4
		III SS2-S6
<b>Sítio 5</b>	Brevetoxina	I S6
	Ciguatoxina	IV S5
<b>Sítio 6</b>	$\delta$ - Conotoxina	---

O sítio receptor 1 é ocupado por dois diferentes grupos de toxinas: a tetrodotoxina (TTX) e a saxitoxina (STX) e o peptídeo  $\mu$ -conotoxina. Estas neurotoxinas agem no lado extracelular da membrana bloqueando a condutância ao

sódio. Resíduos de aminoácidos que formam o sítio receptor estão localizados no *loop* do poro, constituindo o filtro de seletividade ao íon (Noda et al., 1989).

A afinidade da tetrodotoxina é mais baixa para os canais cardíacos que para as isoformas do músculo esquelético e do cérebro. Ao se ligar ao sítio do receptor 1 a TTX entra na abertura do poro transmembranar e impede o acesso de cátions monovalentes (Cestèle e Catterall, 2000).

Grayanotoxina, veratridina, acotinina e batracotoxina ligam-se ao receptor do sítio 2 em canais para sódio, preferencialmente em seu estado ativado, e causam a ativação persistente no potencial de repouso da membrana. Através de um mecanismo alostérico estas toxinas levam ao bloqueio da inativação do canal e ao deslocamento da dependência de voltagem para ativação para valores mais negativos (Catterall, 1977).

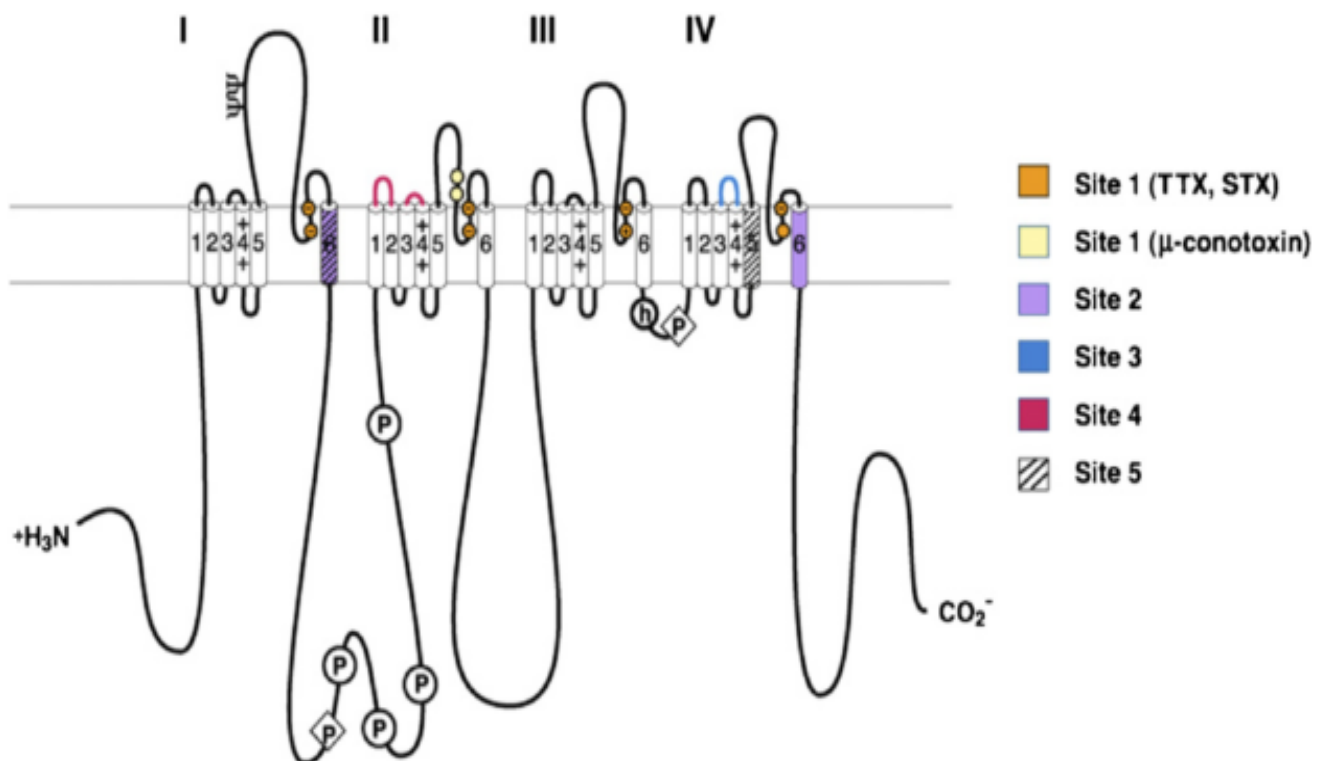
Brevetoxina e ciguatoxina aumentam a atividade do canal para sódio ao se ligarem ao receptor do sítio 5 e desencadearem uma mudança na ativação para potenciais de membrana mais negativos, além de bloquearem a inativação (Catterall e Risk, 1981).

As neurotoxinas que agem nos sítios 2 e 5 são moduladoras alostéricas da função do canal e atuam favorecendo o estado aberto (Catterall et al., 2007).

O sítio receptor 3 é ocupado por vários grupos de toxinas polipeptídicas:  $\alpha$ -toxinas de escorpião, toxinas da anêmona do mar e algumas toxinas de aranha que lentificam ou bloqueiam a inativação do canal para sódio. Este sítio receptor foi primeiro identificado em canais para sódio de mamíferos usando  $\alpha$ -toxinas de escorpião, e foi concluído que a ligação desta neurotoxina previne mudanças conformacionais necessárias para uma rápida inativação (Catterall, 1979).

O sítio receptor 4 é ocupado por  $\beta$ -toxinas de escorpião que induzem uma mudança na dependência de voltagem para ativação do canal, na direção hiperpolarizante. Estudos adicionais sugerem que esta dependência de voltagem no cérebro é modificada por  $\beta$ -toxinas somente após um intenso pré-pulso despolarizante (Catterall et al., 2007).

$\delta$ - conotoxinas se ligam ao sítio receptor 6 e lentificam a inativação do canal para sódio. Resultados de estudos sugerem que estas neurotoxinas lentificam a inativação através do mesmo mecanismo molecular das  $\alpha$ -toxinas de escorpião, toxinas da anêmona do mar e toxinas de aranha (Catterall, 2007).



**Figura 5: Sítios receptores para neurotoxinas em canais para sódio voltagem dependentes.** Localizações dos sítios receptores para neurotoxinas em mamíferos estão ilustrados por cor (Cestèle e Catterall, 2000).

As neurotoxinas se tornaram compostos principais para o desenvolvimento de novos medicamentos para uma enorme variedade de doenças em que os canais estão envolvidos. Um exemplo recente é de uma neurotoxina que bloqueia os canais para cálcio voltagem dependentes tipo-N nas fibras da dor. Essa neurotoxina sintética, a ziconotida (Prialt®, Elan) derivada do peptídeo  $\omega$ -MVIIA do caracol *Conus magus*, foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration)/EMA (European Medicines Agency) para o tratamento da dor crônica grave (Stevens et al., 2011).

Outra abordagem para o estudo dos canais iônicos é a produção de anticorpos específicos contra esses canais. Referente aos canais para sódio, Noda e colaboradores (Noda et al., 1986) identificaram a sequência de duas isoformas de canais para sódio, atualmente denominados  $Na_v1.1$  e  $Na_v1.2$ . e um ano mais tarde Gordon e colaboradores (Gordon et al., 1987) sintetizaram um peptídeo específico para uma região de  $Na_v1.1$  (SP11<sub>1</sub>), um outro para uma região  $Na_v1.2$  (SP11<sub>11</sub>) e um peptídeo correspondente a uma região comum entre estes canais (SP1). Estes peptídeos foram então utilizados como imunógenos em camundongos e os anticorpos obtidos foram capazes de precipitar diferentes populações de canais para sódio em frações membranares de sinaptossomas de rato.

A fim de estudar as características conservadas em canais para sódio em uma ampla gama de tecidos excitáveis, o mesmo grupo desenvolveu anticorpos sítio específicos dirigidos contra um peptídeo (SP19) correspondente a um segmento intracelular comum dos canais para sódio  $Na_v1.1$  e  $Na_v1.2$ . Este anticorpo reconheceu preparações de cérebro, músculo e coração de rato (Gordon et al., 1988).

Em outro estudo com anticorpos, Tejedor e Catterall utilizaram uma toxina do escorpião *Leiurus quinquestriatus* (LqTx), uma  $\alpha$ -toxina, para marcar por fotoafinidade canais para sódio purificados de cérebro de rato. Anticorpos sítio específicos que reconhecem diferentes regiões do canal  $\text{Na}_v1.2$ , descritos anteriormente por Gordon e colaboradores (Gordon et al., 1987; Gordon et al., 1988), foram então usados para determinar quais dos peptídeos, produzidos por clivagem química e enzimática do canal para sódio marcado, continham a LqTx covalentemente ligada. Os anticorpos reconheceram os resíduos de aminoácidos 317 a 335 e 382 a 400, presentes no domínio I do canal para sódio, levando a conclusão que neste sítio se ligariam  $\alpha$ -toxinas (Tejedor e Catterall, 1988).

Anticorpos sítio dirigidos, descritos por Gordon e colaboradores (Gordon et al., 1987; Gordon et al., 1988), também foram utilizados por Thomsen e Catterall para determinar as sequências que compreendem o sítio receptor para  $\alpha$ -toxinas. Neste trabalho, foi avaliado o efeito do anticorpo na dependência de voltagem através da ligação deste à LqTx radiomarcada covalentemente ligada aos canais para sódio. Aminoácidos na posição 355 a 371 e 382 a 400, localizados no *loop* extracelular, entre os segmentos S5 e S6 do domínio I foram reconhecidos por dois anticorpos e um anticorpo reconheceu os resíduos de 1686 a 1703 de um *loop* similar do domínio IV. Estes resultados sugeriram que os *loops* extracelulares entre os segmentos S5 e S6 dos domínios I e IV compreendem pelo menos parte do sítio receptor para  $\alpha$ -toxinas (Thomsen e Catterall, 1989).

Objetivando analisar a distribuição das isoformas dos canais para sódio em diferentes regiões do SNC, Withaker e colaboradores selecionaram sequências dos canais  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$  e  $\text{Na}_v1.3$  de humano e  $\text{Na}_v1.6$  de rato, para síntese. Os peptídeos produzidos foram utilizados como imunógenos em coelhos e os anticorpos

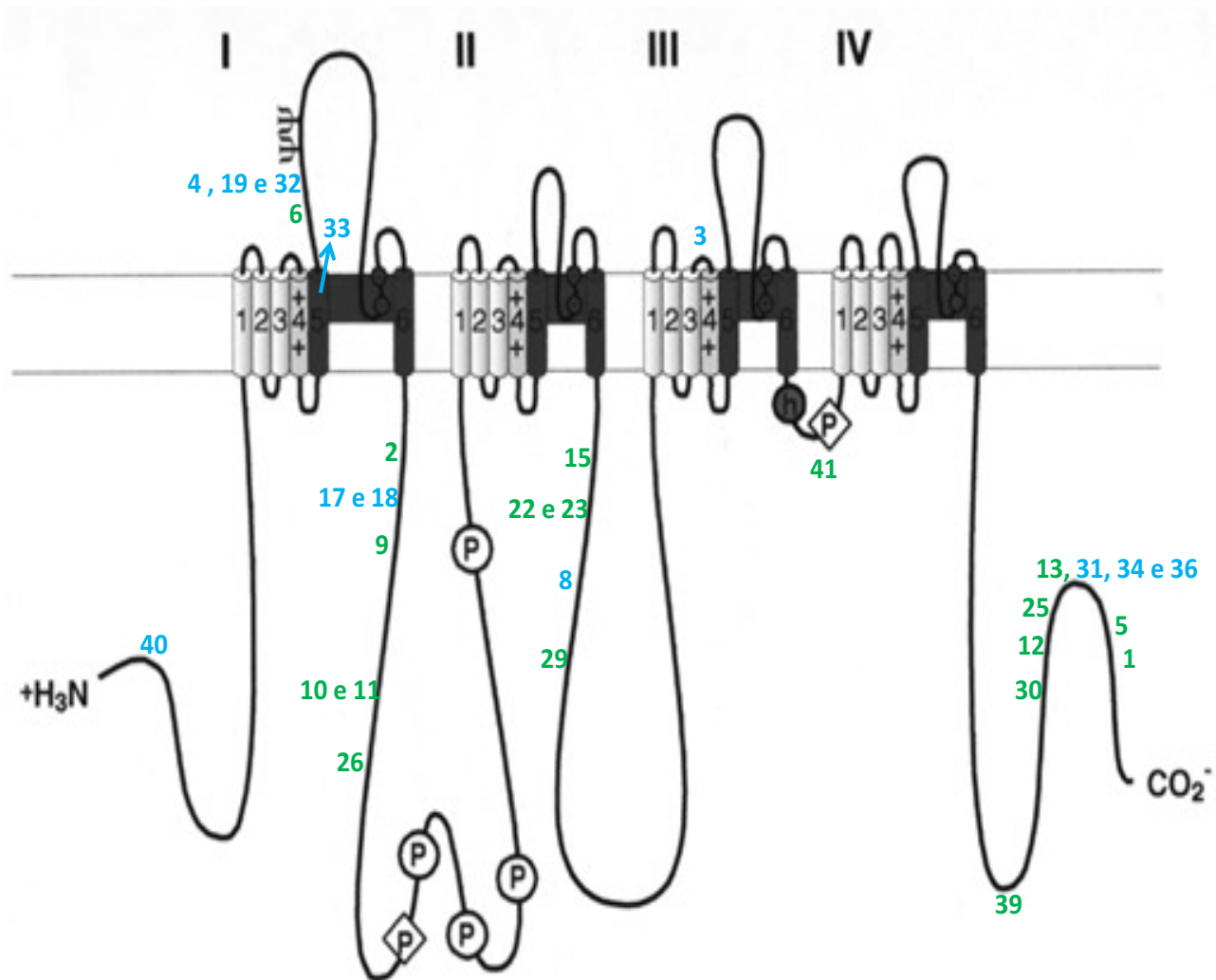
obtidos foram testados com extratos de células HEK 293 expressando diferentes isoformas de canal para sódio em ensaios de imunohistoquímica e em diferentes partes do cérebro humano em ensaios de imunoblot (Whitaker et al., 2001).

Em um estudo mais recente, Chioni e colaboradores (2005) descobriram a sequência do canal para sódio  $Na_v1,5$  neonatal ( $nNa_v1.5$ ) que difere da forma adulta em 5 aminoácidos. Esta sequência foi sintetizada e o peptídeo foi utilizado como imunógeno em coelhos. Os anticorpos obtidos reagiram fortemente com células transfectadas com o  $nNa_v1.5$ , consistente com a expressão da proteína do canal na membrana plasmática e com a localização extracelular do sítio antigênico.

Em uma patente, depositada em 2007, uma série de anticorpos dirigidos contra regiões das isoformas específicas do canal para sódio (figura 6) foi descrita. As sequências dos peptídeos destas regiões estão mostradas na tabela 6 (WO 2007/023298 A2). Além disso, atualmente, uma grande variedade de anticorpos policlonais e monoclonais dirigidos contra diferentes segmentos dos subtipos de canais para sódio estão disponíveis comercialmente (Figura 6) (Tabela 5), sendo que destes, 27 são dirigidos contra um segmento intracelular e apenas 3 dirigidos contra um segmento extracelular.

Diversos trabalhos apontam os canais iônicos como alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos no combate a diversas patologias como já discutido. Entretanto, anticorpos dirigidos contra regiões intracelulares dos canais para sódio não podem ser usados como inibidores em células vivas (WO 2007/023298 A2). Neste sentido, o desenvolvimento de anticorpos contra regiões extracelulares seria muito importante no estudo da inibição da proliferação de células tumorais e também em ensaios de competição com drogas e toxinas para determinação de sítios de ligação destas nos canais. Além de serem também,

ferramentas que podem ser utilizadas na purificação de canais e em estudos imunohistoquímicos de localização de tais canais em diferentes tecidos.



**Figura 6: Sítios aproximados de ligação de anticorpos nos canais para sódio voltagem dependentes.** Em azul, o local aproximado da ligação dos anticorpos descritos na patente, de acordo com a tabela 6. Em verde o local aproximado da ligação de anticorpos comerciais de acordo com a tabela 6 (Adaptado de Cestèle e Catterall, 2000).

Nesse sentido, visto a importância do domínio IV do canal para sódio na interação com diversas toxinas e a carência de anticorpos para regiões desse domínio, o trabalho aqui apresentado tem o propósito de produzir um anticorpo sítio específico, dirigido contra o 11º segmento extracelular do canal para sódio.



**Tabela 5: Anticorpos dirigidos contra segmentos dos isotipos de canal para Na<sup>+</sup>.** Dados disponíveis em Santa Cruz Biotechnology (<http://www.scbt.com/index.html>), Sigma Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>) e na patente depositada (WO 2007/023298 A2, 2005).

	Gene	Isoforma	Isótipo	Epitopo	Monoclonal/ Policlonal	Origem do canal
1	SCN1A	Na <sub>v</sub> 1.1	Goat IgG	C-terminal intracelular (aa 1997-2010)	Policlonal	Humana
2	SCN1A	Na <sub>v</sub> 1.1	Rabbit IgG	Intracelular (aa 455-524)	Policlonal	Humana
3	SCN1A	Na <sub>v</sub> 1.1	----	Extracelular (aa 1393-1409)	----	----
4	SCN1A	Na <sub>v</sub> 1.1	----	Extracelular (aa 277-294)	----	----
5	SCN2A	Na <sub>v</sub> 1.2	Goat IgG	Próximo ao C-terminal intracelular (aa 1991-2005)	Policlonal	Humana
6	SCN2A	Na <sub>v</sub> 1.2	Rabbit IgG	Extracelular próximo ao N-terminal (aa 281-330)	Policlonal	Humana
7	SCN2A	Na <sub>v</sub> 1.2	Goat IgG	Próximo ao N-terminal	Policlonal	Humana
8	SCN3A	Na <sub>v</sub> 1.3	----	Intracelular (aa 1026-1044)	----	----
9	SCN3A	Na <sub>v</sub> 1.3	Rabbit IgG	Intracelular (aa 479-528)	Policlonal	Humana
10	SCN3A	Na <sub>v</sub> 1.3	Goat IgG	Intracelular (511-524)	Policlonal	Rato
11	SCN3A	Na <sub>v</sub> 1.3	Goat IgG	Intracelular (511-524)	Policlonal	Humano
12	SCN3A	Na <sub>v</sub> 1.3	Mouse IgG2 <sub>Bκ</sub>	Intracelular (aa 1861-1960)	Monoclonal	Humano
13	SCN3A	Na <sub>v</sub> 1.3	Rabbit IgG	Intracelular (aa 1903-1951)	Policlonal	Humano
14	SCN4A	Na <sub>v</sub> 1.4	Goat IgG	Região interna	Policlonal	Humano
15	SCN4A	Na <sub>v</sub> 1.4	Rabbit IgG	Intracelular (aa 829-918)	Policlonal	Humano
16	SCN4A	Na <sub>v</sub> 1.4	Goat IgG	Próximo ao N-terminal	Policlonal	Humano
17	SCN4A	Na <sub>v</sub> 1.4	----	Intracelular (aa 470-486)	----	----
18	SCN4A	Na <sub>v</sub> 1.4	----	Intracelular (aa 470-488)	----	----
19	SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5	----	Extracelular (aa 280-298)	----	----

20	SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5	Mouse IgG <sub>1</sub> (α-pep. Sintético)	Região extracelular	Monoclonal	Humano
21	SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5	Goat IgG	Próximo ao C-terminal	Policlonal	Humano
22	SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5	Mouse IgG <sub>1</sub>	Intracelular (aa 971-1140)	Monoclonal	Humano
23	SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5	Rabbit IgG	Intracelular (aa 971-1140)	Policlonal	Humano
24	SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5	Goat IgG	Próximo ao N-terminal	Policlonal	Humano
25	SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5	Rabbit IgG	Intracelular (aa 1872-1921)	Policlonal	Humano
26	SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5	Rabbit IgG	Intracelular (aa 540-589)	Policlonal	Humano
27	SCN8A	Na <sub>v</sub> 1.6	Goat IgG	Região interna	Policlonal	Humano
28	SCN8A	Na <sub>v</sub> 1.6	Mouse IgG2a	Canal para Na <sup>+</sup> Nav1.6 recombinante	Monoclonal	Humano
29	SCN8A	Na <sub>v</sub> 1.6	Rabbit IgG	Intracelular (aa 1116-1165)	Policlonal	Humano
30	SCN8A	Na <sub>v</sub> 1.6	Mouse IgG2 <sub>Ak</sub>	Intracelular (aa 1854-1951)	Monoclonal	Humano
31	SCN8A	Na <sub>v</sub> 1.6	----	Intracelular (aa 1962-1980)	----	----
32	SCN8A	Na <sub>v</sub> 1.6	----	Extracelular (aa 281-298)	----	----
33	SCN9A	Na <sub>v</sub> 1.7	Mouse IgG2 <sub>Bk</sub>	Transmembrana (aa 269-271) Extracelular (aa 272-339)	Monoclonal	Humano
34	SCN9A	Na <sub>v</sub> 1.7	----	Intracelular (aa 1968-1988)	----	----
35	SCN10A	Na <sub>v</sub> 1.8	Goat IgG	Região interna	Policlonal	Humano
36	SCN10A	Na <sub>v</sub> 1.8	----	Intracelular (aa 1939-1957)	----	----
37	SCN11A	Na <sub>v</sub> 1.9	Goat IgG	Próximo ao N-terminal	Policlonal	Humano
38	SCN11A	Na <sub>v</sub> 1.9	Goat IgG	N-terminal	Policlonal	Humano
39	SCN11A	Na <sub>v</sub> 1.9	Mouse IgG2 <sub>Ak</sub>	Intracelular (aa 1726-1791)	Monoclonal	Humano
40	SCN11A	Na <sub>v</sub> 1.9	----	Intracelular (29-47)	----	----
41	----	----	Mouse	Intracelular 3-4 loop (aa 1501-1518)	Monoclonal	Mamíferos

# OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Gerar anticorpos sítio específicos contra regiões extracelulares de canais para sódio voltagem dependentes.

### 2.2 Específicos

- Selecionar uma sequência extracelular comum a todos os subtipos de canal para sódio voltagem dependente.
- Verificar a antigenicidade e imunogenicidade da região extracelular escolhida.
- Verificar a exclusividade dessa região em canais para sódio.
- Sintetizar o peptídeo selecionado.
- Produzir anticorpos em camundongos e coelhos contra esse peptídeo.
- Testar a reatividade dos anticorpos produzidos frente ao peptídeo, por ELISA e SPOT.
- Determinar os aminoácidos críticos do peptídeo para interação com os anticorpos.
- Avaliar a ligação das imunoglobulinas anti-peptídeo extracelular a células HEK expressando  $Na_v1.3$  através de imunohistoquímica.
- Avaliar a reatividade dos anticorpos frente a extrato de cérebro de camundongo.
- Avaliar o efeito dos anticorpos anti-peptídeo extracelular na corrente para sódio de células HEK expressando  $Na_v1.3$

# MATERIAIS E MÉTODOS

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

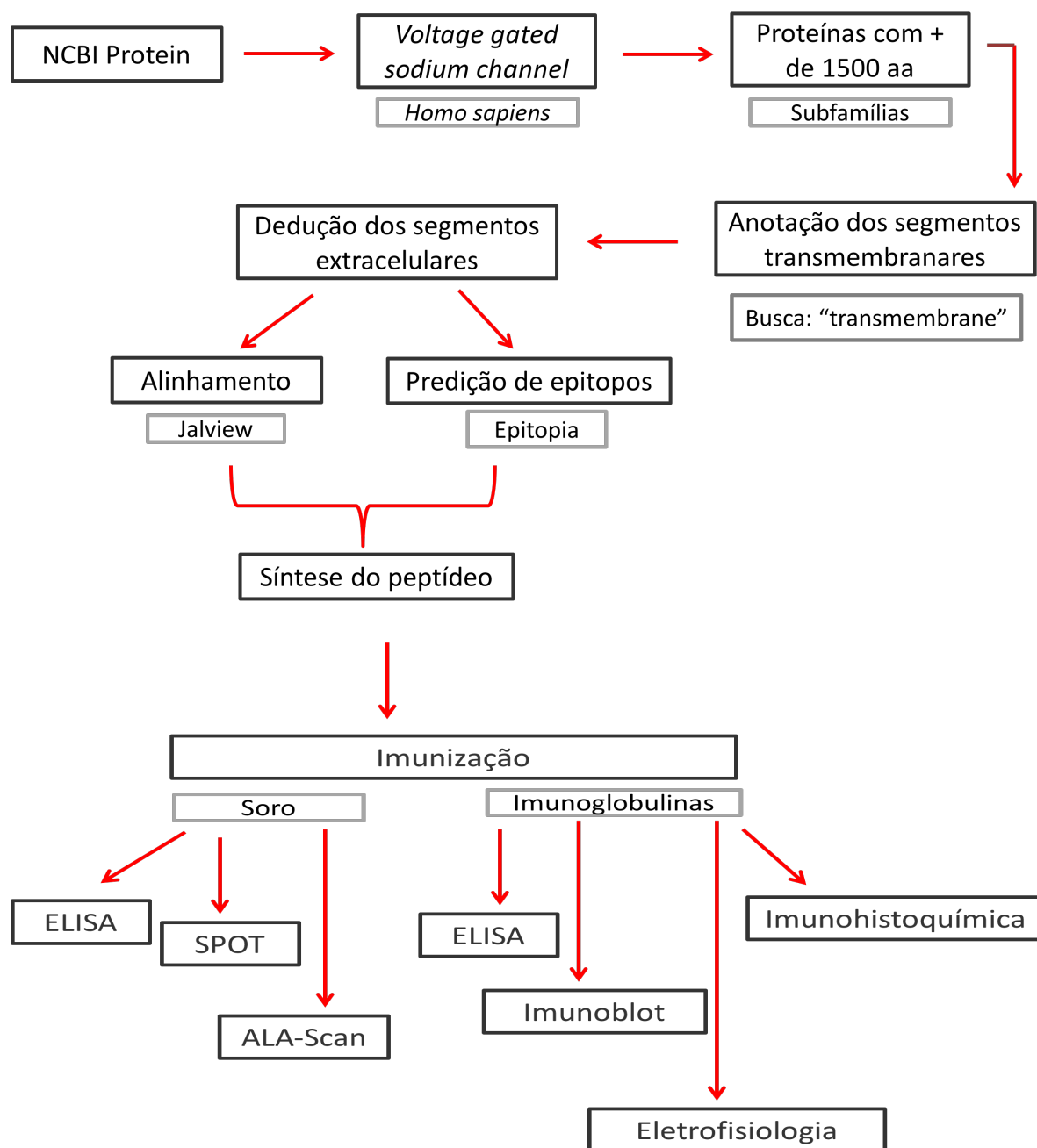


Figura 7: Desenho experimental. Representação esquemática da metodologia utilizada.

### **3.1 Seleção da sequência extracelular comum a todos os subtipos do canal para sódio voltagem dependente**

#### **3.1.1 Recuperação de sequências de canais iônicos para sódio**

As sequências dos canais iônicos para sódio foram recuperadas no banco de dados Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Foram escolhidas apenas sequências dos canais para sódio humanos e sequências de proteínas com mais de 1500 aminoácidos, para evitar proteínas truncadas. As características de cada sequência selecionada foram extraídas, principalmente no que se refere à presença de segmentos transmembranares hipotéticos. A partir desta informação deduzimos os seguimentos extracelulares.

#### **3.1.2 Alinhamento de sequência**

O alinhamento das sequências peptídicas das isoformas do canal para sódio foi feito utilizando a ferramenta ClustalW do programa Jalview (Clamp et al., 2004). Além de permitir o alinhamento de sequências de proteínas e o cálculo da conservação entre elas, o programa colore os resíduos de aminoácidos de acordo com características em comum.

### **3.2 Predição de regiões imunogênicas**

O algoritmo Epitopia foi utilizado para prever regiões imunogênicas como candidatas a epitopos para células B, a partir da sequência linear de uma dada proteína. O algoritmo calcula uma pontuação de imunogenicidade para cada aminoácido (1 a 5, sendo 1 para baixa imunogenicidade e 5 para alta

imunogenicidade), e atribui cores a esta pontuação, afim de fornecer uma imagem perceptível da natureza das proteínas imunogênicas estudadas. Além disso, Epitopia prevê a acessibilidade para cada um dos aminoácidos (e, exposto; b, internalizado) (Rubinstein et al., 2009).

### **3.3 Verificação da exclusividade da região em canais para sódio**

Os peptídeos dentro dos segmentos extracelulares que apresentaram maiores índices pelo algoritmo Epitopia foram listados e submetidos à análise por PsiBlast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para a verificação da ocorrência destes peptídeos em outras proteínas.

### **3.4 Síntese do peptídeo**

#### **3.4.1 Seleção do peptídeo**

Foi selecionado para síntese um peptídeo comum a todas as isoformas dos canais para sódio, levando-se em consideração a conservação entre os resíduos de aminoácidos, suas posições na sequência e se estavam expostos na estrutura tridimensional da proteína.

A estrutura tridimensional do canal para sódio humano ainda não é conhecida. As análises de exposição de resíduos de aminoácidos foram baseadas em um estudo de 2011 no qual Payandeh e colaboradores demonstraram a estrutura tridimensional do canal para sódio bacteriano (PDB code 3RVZ). Portanto, a partir do alinhamento da sequência dessa proteína, de estrutura conhecida, e do alinhamento da sequência do canal humano, foram realizadas as análises de exposição.



Selecionamos inicialmente para síntese a sequência LIEKYFVSPTLFRVI, aa 1624-1642, localizada no 11º segmento extracelular (S3-S4), no domínio IV do subtipo Na<sub>v</sub>1.1. Entretanto, este peptídeo foi altamente insolúvel em água. A adição de DMSO a 10% e TFA a 1% melhorou a solubilidade, mas uma grande quantidade de precipitado ainda permaneceu em solução impossibilitando a continuidade dos experimentos. Dessa forma, algumas modificações foram feitas na sequência, através da adição de resíduos carregados e eliminação de resíduos hidrofóbicos, a fim de aumentar a solubilidade do peptídeo. O peptídeo modificado, selecionado para síntese apresenta a seguinte sequência: TGEKYFVSEPTLFRGNKEK (peptídeo alpha).

Para cálculo do peso molecular e do ponto isoelétrico do peptídeo selecionado utilizamos a ferramenta *Compute pI/Mw* disponível no portal ExPASy (Bioinformatics Resource Portal - [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)), que baseia-se na sequência de aminoácidos fornecida.

### **3.4.2 Síntese solúvel do peptídeo comum a todos os subtipos do canal para Na<sup>+</sup>**

O peptídeo que apresenta uma região comum a todos os subtipos do canal para sódio, identificado pelas análises acima descritas, foi sintetizado de acordo com o protocolo descrito por Merrifield em 1969. De acordo com este protocolo, o aminoácido C-terminal do peptídeo é fixado a uma resina (Rink Amide) e a cadeia peptídica é alongada adicionando-se sucessivamente resíduos da porção C-terminal para N-terminal.

Foram utilizados aminoácidos com cadeias laterais protegidas por diferentes grupamentos e o N-terminal protegido com o grupamento FMOC. A remoção do

Fmoc é feita pela adição de 4-metil piperidina 25% em dimetilformamida (DMF). Desta forma, o grupamento amina se torna disponível para a reação com o próximo aminoácido da sequência de interesse. Após o acoplamento um novo ciclo é iniciado e repete-se até se obter a sequência do peptídeo desejado. Ao final da síntese, os grupos laterais são desprotegidos e o peptídeo é liberado da resina através do tratamento com ácido trifluoracético (TFA). O peptídeo é precipitado em éter etílico glacial, filtrado e ressuspendido em água e em seguida é liofilizado.

A síntese foi realizada pelo equipamento, *Multipep RS (Intavis, Alemanha)*.

O peptídeo foi purificado por HPLC e teve sua massa confirmada por espectrometria de massas.

### **3.4.3 Purificação do peptídeo e espectrometria de massas**

O peptídeo foi solubilizado em 80% de acetonitrila e submetido à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC- *Shimadzu*) acoplada à coluna C18 (*Vydac*). A coluna foi lavada com solução A (TFA 0,1% em água deionizada) por 10 minutos. Os componentes presentes foram eluídos, utilizando-se um gradiente que variou em 0% e 80% de acetonitrila em 90 minutos (0-15 minutos até 20% de acetonitrila em fase B e de 15-30 minutos até 40% de acetonitrila em fase B, sendo que 30-60 minutos até 50% de acetonitrila em fase B e de 60-70 minutos até 80% de acetonitrila em fase B e os seguintes 20 minutos foram utilizados para lavagem da coluna). O fluxo utilizado foi de 1ml/minuto e a detecção dos picos foi feita a 214nm.

Os picos obtidos foram submetidos à análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF).

### **3.5 Produção de anticorpos anti-peptídeo**

#### **3.5.1 Acoplamento do peptídeo à ovalbumina**

A fim de garantir uma melhor apresentação ao sistema imune humoral, o peptídeo foi acoplado a uma proteína carreadora. Para o acoplamento com ovalbumina (OVA) foram diluídos 21mg do peptídeo e 1mg de OVA em 1ml de PBS. Durante 1 hora, 1 ml de solução de glutaraldeído 1% foi adicionado à solução peptídeo-OVA, a 4°C, sob agitação constante. A reação se processou por mais 1 hora nessas condições e então foi adicionado NaBH<sub>4</sub> em quantidade suficiente para estabelecer uma concentração final de 10mg/ml. A amostra foi dialisada contra PBS diluído 10 vezes, por dois dias.

#### **3.5.2 Imunizações**

Após a coleta do soro pré-imune, camundongos da linhagem Balb/c receberam injeções do peptídeo acoplado à OVA. A primeira dose (50µg) foi administrada, via subcutânea, no dia 1, utilizando adjuvante de Freund completo. Doses subsequentes foram dadas nos dias 15, 25 e 32, utilizando adjuvante de Freund incompleto. O sangue foi coletado no dia 42 e doses adicionais foram administradas conforme a necessidade do imunógeno.

Adicionalmente, um coelho adulto da linhagem New Zealand (2,0–2,5kg) foi usado para a produção de anticorpos anti-peptídeos. Após a coleta do soro pré-imune o animal recebeu uma injeção inicial, subcutânea, do peptídeo acoplado à OVA (150µg) no dia 1, utilizando adjuvante de Freund completo. Injeções subsequentes foram administradas nos dias 21, 36 e 51, após a primeira injeção e doses adicionais, utilizando adjuvante de Freund incompleto, foram administradas conforme a necessidade do imunógeno.

### **3.5.3 Purificação de imunoglobulinas**

Para a purificação de imunoglobulinas provenientes do soro de coelho, a coluna de proteína A foi equilibrada com 40 volumes de PBS. O soro (8ml) foi adicionado e deixado em contato com a *Sepharose* – Proteína A por 16 horas à 4°C. Em seguida, a coluna foi lavada com 50 volumes de PBS e a IgG purificada foi eluída com tampão glicina (0,1M, pH 2,8, com NaCl 0,15M). O eluato foi neutralizado com tampão Tris-HCl 1mol/L, pH 8,0 e posteriormente dialisado contra PBS 0,05M.

### **3.5.4 Produção de fragmentos Fab**

Após a purificação de imunoglobulinas de coelho, foram produzidos fragmentos Fab. Para tal, a papaína (Sigma – P4762) foi ativada com o tampão de incubação e a cisteína foi removida por ultracentrifugação. A papaína foi então adicionada às imunoglobulinas, em uma proporção de 5% (w/w) papaína/anticorpo, à 37°C por 2 horas. A reação foi interrompida com a adição de 0,03M de iodoacetamida e dialisada contra PBS pH 8,0, à 4°C *overnight*. A amostra foi então purificada em coluna de proteína A.

## **3.6 Teste para reatividade dos anticorpos**

### **3.6.1 ELISA indireta**

Microplacas de ELISA de 96 poços Falcon (Becton Dickinson France AS) foram sensibilizadas durante a noite a 5°C, com 100µl de uma solução contendo 10µg/ml do antígeno a ser testado diluído em tampão bicarbonato de sódio 0,02M, pH 9,6. Após esse período, as placas foram lavadas três vezes com uma solução de lavagem (0,05% Tween-salina) e bloqueadas com uma solução contendo caseína 2% em tampão fosfato 0,05M, 0,015M NaCl, pH 7,4, por uma hora. As placas foram

lavadas novamente e os anticorpos a serem testados, em duplicata, foram diluídos em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% Tween 20). Em seguida, as placas foram lavadas novamente e o anticorpo secundário (Sigma) anti-murino ou anti-coelho, conjugados com a enzima peroxidase, foram adicionados, nas diluições 1:6000 e 1:4000 respectivamente. A ligação do anticorpo secundário foi medida pela atividade enzimática, utilizando ortofenilenodiamino (OPD) como substrato (0,33mg/ml em tampão citrato pH 5,2 na presença de 0,04% de água oxigenada). Após 15 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 20µl de ácido sulfúrico diluído 1:20. As leituras da absorbância foram feitas a 492nm.

### **3.6.2 SPOT synthesis**

#### **3.6.2.1 Síntese**

Os peptídeos correspondentes à mesma região do peptídeo alpha para as diferentes isoformas de canal para sódio  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.4$ ,  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.6$  e  $Na_v1.7$ , foram sintetizados em uma membrana de celulose, de acordo com o protocolo descrito por Laune e colaboradores em 2002. A síntese paralela de peptídeos permite a síntese rápida e eficiente de um grande número de peptídeos em delimitações pontuais. A síntese foi realizada utilizando um equipamento (*Multipep Automatic Spot Synthesizer – Intavis, Alemanha*).

A síntese dos peptídeos iniciou-se sempre pelo C-terminal do último aminoácido das sequências estabelecidas para cada ponto. O grupamento protetor FMOC, que se encontrava acoplado à função amina da  $\beta$ Ala-OH, foi retirado pela adição de 4-metil piperidina 25% em dimetilformamida (DMF). O grupo amina se tornou então disponível para reação com o primeiro aminoácido da sequência desejada a ser acoplado.

Ao serem acoplados, os aminoácidos tiveram sua função carboxila previamente ativada por DIPC/HOBT. Os aminoácidos ativados foram então depositados em seus pontos específicos sobre a membrana. Para cada aminoácido foram realizados dois ciclos de acoplamento.

Em um próximo ciclo, o grupo protetor FMOC do aminoácido recém-acoplado foi eliminado pela piperidina a 20%. A membrana foi lavada com DMF e diclorometano e, após sua secagem, foi iniciado um novo ciclo de acoplamento com o segundo aminoácido. Os ciclos se sucederem desta forma até completar a sequência do peptídeo desejado.

Ao final da síntese, os grupos laterais protetores dos aminoácidos foram retirados pelo tratamento da membrana com ácido trifluoracético (TFA) associado a etanoditiol e trietilsilano.

### **3.6.2.2 Imunoensaio**

O ensaio foi realizado com o soro produzido em coelhos, contra o peptídeo sintético. Foram testados, também, IgGs purificadas a partir do soro destes animais.

Inicialmente as membranas foram lavadas três vezes com tampão TBS pH 7,4 e então bloqueadas com solução contendo 3ml de tampão de bloqueio (BSA 3%) e 0,5g de sacarose em 30ml de tampão TBS-Tween 0,1% *overnight*. A membrana foi lavada em tampão TBS-Tween 0,1% e incubada com soro ou anticorpo a ser testado, diluído na mesma solução usada para bloqueio, durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação. Após a incubação, a membrana foi lavada com TBS-Tween 0,1% por 10 minutos.

### **3.6.2.3 Revelação por fosfatase alcalina**

O anticorpo secundário anti-murino ligado à fosfatase alcalina, diluído 1:3000 em tampão de bloqueio, foi incubado com a membrana por 1 hora à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS-Tween 0,1% e mais duas lavagens com CBS pH 7,0 por 10 minutos sob agitação à temperatura ambiente, foi adicionado o substrato contendo MTT-BCIP (*Sigma*) e MgCl<sub>2</sub>. Após 20 minutos de revelação a reação foi interrompida com lavagens rápidas com H<sub>2</sub>O e spots reativos foram observados.

### **3.6.2.4 Quantificação**

O resultado final foi obtido escaneando-se a membrana, revelada pelo método da fosfatase alcalina. A imagem gerada foi analisada utilizando o ImageJ, que quantifica pixels presentes em uma área definida pelo usuário.

### **3.6.2.5 Regeneração**

Para uso posterior a membrana é tratada com dimetilformamida (DMF) 100%, reagente A (ureia 8M, 1% SDS, 0,1% de 2-mercaptoetanol), reagente B (etanol/água/ácido acético nas proporções 50:40:10 vol/vol/vol), e metanol (três lavagens de 10 minutos cada).

### **3.7 Determinação dos aminoácidos críticos do peptídeo para interação com o anticorpo**

#### **3.7.1 Alanina-Scan**

Após identificar um peptídeo reativo na membrana de spot, foram determinados os resíduos de aminoácidos importantes para a interação peptídeo – anticorpo pela técnica de Alanina-Scan (ALA-Scan). Neste ensaio, uma membrana de spot contendo uma série de peptídeos, cuja sequência é derivada da sequência de interesse, é sintetizada e tem cada um de seus aminoácidos substituídos por uma alanina. Quando alaninas estão presentes na sequência inicial, são substituídas por glicina.

As membranas de ALA-Scan foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima.

### **3.8 Avaliação da ligação de imunoglobulinas à células HEK expressando $Na_v1.3$**

#### **3.8.1 Cultivo de células HEK 293 e HEK $Na_v1.3$**

Células HEK293 foram transfectadas com plasmídeos contendo a subunidade  $\alpha$  do canal de sódio  $Na_v1.3$ , contido no vetor de expressão pRK7. As células HEK 293T e HEK 293 expressando constitutivamente canais  $Na_v1.3$  foram cultivadas em garrafas de plástico 25 cm<sup>2</sup> (Sarstedt) a 37 °C em estufa umidificada com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com bicarbonato de sódio (3,7g/l), 10% de soro bovino (Cripion), mais 1% de antibiótico gentamicina (10 U.I/ml) (Sigma-Aldrich). O meio foi trocado três vezes por semana.

Toda a manipulação descrita acima foi executada em ambiente estéril criado por uma capela de fluxo laminar, e todo material utilizado era autoclavado a fim de



se evitar a contaminação do meio de cultura por microrganismos. Os meios de cultivo e demais soluções eram esterilizadas por filtração em membranas estéreis de 0,22 µm de poro.

### **3.8.2 Imunohistoquímica**

Para a realização dos ensaios, células HEK Na<sub>v</sub>1.3 e HEK 293 foram fixadas em lamínulas com paraformaldeído 4% e incubadas com 10µg/ml de IgG anti-peptídeo alpha, por 18 horas, à 4°C. As células foram então incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugados com fluorescência Alexa Fluor 488 (diluição 1:500) (Invitrogen-USA). As imagens de fluorescência foram coletadas utilizando o microscópio confocal Meta LSM 510 (Zeiss GmbH, Jena, Germany). Dois grupos controles foram utilizados, um contendo apenas o anticorpo secundário e outro contendo o anticorpo secundário e a IgG pré-imune.

## **3.9 Avaliação da reatividade dos anticorpos frente a extrato de cérebro de camundongo**

### **3.9.1 Immunoblot**

Proteínas foram extraídas do córtex de camundongos. Após a retirada, a amostra foi colocada em um eppendorf contendo inibidor de protease (tripsina), *rippa buffer*, triton e um inibidor de fosfatase. A amostra foi em seguida macerada e colocada em gelo sob agitação por 1 hora, e após este intervalo centrifugada por 20 minutos à 4°C, 15000rpm. O sobrenadante foi novamente centrifugado por mais 20 minutos. O sobrenadante da última centrifugação foi armazenado a -20°C para os testes.

A amostra obtida pelo processo acima descrito foi separada por gel de SDS-PAGE 6% a 160V por 3-4 horas e transferida para uma membrana de nitrocelulose a 24V *overnight*. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com PBS Tween 0,3%, à temperatura ambiente por 1 hora, sob agitação. A membrana foi então incubada com as imunoglobulinas anti-peptídeo alpha ou pré-imune diluídas em PBS (em concentrações de 10µl/ml), à temperatura ambiente por 2 horas. Após a incubação foram feitas 3 lavagens com PBS Tween 0,05%. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com a enzima peroxidase, por 1 hora à temperatura ambiente e novamente lavada. As bandas foram visualizadas utilizando o kit Enhanced Chemiluminescence Immunoblotting (GE).

### **3.10 Avaliação do efeito dos anticorpos em correntes para sódio**

#### **3.10.1 Eletrofisiologia**

Correntes iônicas das células HEK Na<sub>v</sub>1.3 foram registradas através da técnica de *patch clamp* no modo *Whole-cell*. Os experimentos foram feitos em um microscópio invertido *Olympus IMT-2* montado sobre uma mesa antivibração, acoplado a um micromanipulador para a movimentação de micropipetas de vidro (1,5mm d.e., 1,0mm d.i. Perfecta, São Paulo, SP), utilizadas para o registro da corrente. As micropipetas foram preenchidas com solução interna e colocadas no eletrodo de Ag/AgCl ligado a um amplificador (*HEKA-EPC9*). Para a análise dos dados foram utilizados os programas *Pulse* e *Pulse fit* (*HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany*).

As micropipetas de vidro foram confeccionadas a partir de capilares limpos por sonicação e polidos ao fogo, que foram alongados através de duas séries de

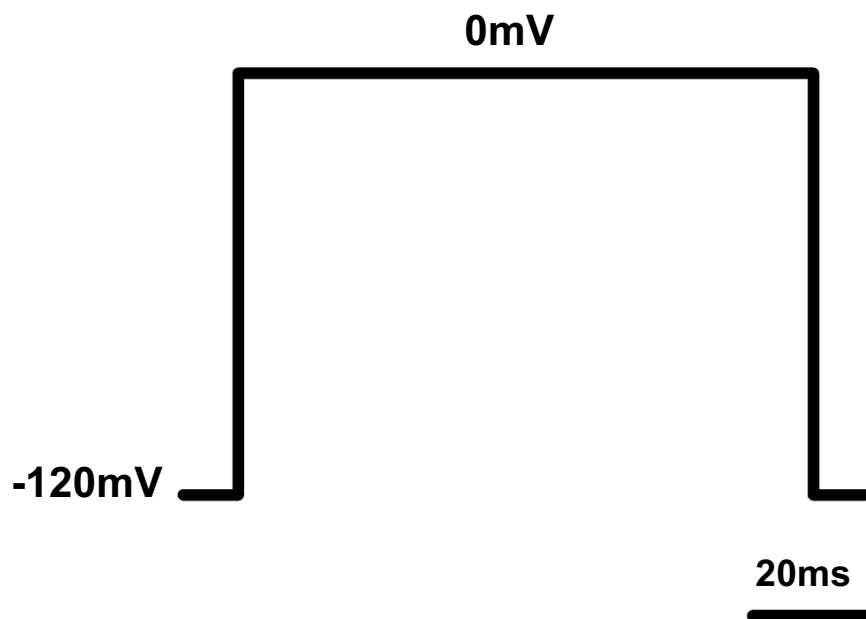
aquecimento por meio de um estirador vertical (*Narishige, PP-830*), gerando, assim, uma ponta cuja resistência variou entre 2 – 3 M $\Omega$ . A pipeta foi aproximada lentamente com o auxílio do micromanipulador até tocar a célula, banhada pela solução externa. Neste momento, foi aplicada uma pressão negativa para que uma pequena porção da membrana da célula interagira com o interior da micropipeta, formando um selamento de alta resistência (gigaselo). Posteriormente, esta porção da membrana foi rompida através de outra sucção, estabelecendo uma continuidade entre o citoplasma e a solução interna da pipeta. Este passo é o que caracteriza a modalidade *Whole-cell*, uma vez que, a atividade elétrica de toda a membrana da célula é captada pela micropipeta e registrada pelo amplificador.

A corrente foi avaliada através de um protocolo de voltagem, em que se fixa o potencial da membrana a um determinado valor, medindo a corrente necessária para mantê-lo.

Para os registros de corrente de Na<sup>+</sup> foi utilizada uma solução interna (mM): 130 CsCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 EGTA e 5 NaCl, pH ajustado para 7,2 com CsOH. A solução externa utilizada foi (mM): 140 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0,2 CdCl<sub>2</sub>, 0,2 NiCl<sub>2</sub>, 15 Glicose e 10 HEPES, pH ajustado para 7,4 com NaOH.

Todas as células foram mantidas em um potencial de *holding* de -80mV quando não estimuladas pelos protocolos. Nos experimentos realizados utilizamos um protocolo no qual a célula foi despolarizada até 0mV a partir de um potencial de -120mV durante 100ms para obtenção da corrente total de Na<sup>+</sup>. O intervalo entre os estímulos foi de 5s (Figura 8).

Nos primeiros episódios de estimulação a célula foi perfundida apenas com a solução externa. Após a estabilização, a célula foi exposta à solução teste (solução externa + IgG).



**Figura 8:** Traçados representativos do protocolo utilizado na eletrofisiologia. A célula foi despolarizada até 0mV a partir de um potencial de -120mV para obtenção da corrente total de Na<sup>+</sup>.

### **3.10.2 Análise estatística dos dados**

Comparações entre dois grupos de dados foram feitas por teste de Mann-Whitney. Considerou-se que dois grupos de dados eram estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Seleção da sequência extracelular comum a todos os subtipos do canal para sódio voltagem dependente

#### 4.1.1 Recuperação de sequências de canais iônicos para sódio

As sequências de cada subtipo do canal para sódio foram recuperadas no NCBI Protein, em formato FASTA. Foram selecionadas as sequências com mais de 1500 aminoácidos presentes na espécie humana. A sequência do subtipo Na<sub>v</sub>1.1 pode ser observada na figura 9.

```
>gi|12644229|sp|P35498.2|SCN1A_HUMAN RecName: Full=Sodium channel protein type 1 subunit alpha; AltName: Full=Sodium channel protein brain I subunit alpha; AltName: Full=Sodium channel protein type I subunit alpha; AltName: Full=Voltage-gated sodium channel subunit alpha Nav1.1
```

```
NTerminalMEQTVLVPPGPDFSNFFFTRESLAAIERRIAEEKAKNPKPDKKDDDENGGPPNSDLEAGKNLPFIYGD  
IPPEMVSEPLEDLPYYINKKTFIVLNKGKAIFRFSATSALYILTPFNPLRKAIAIKLVHSLFSLMIMCTILTNCVF  
MTMSNPPDWTKNVEYTFGTIYTFESLIKIIARGFCLEDFTLRDPWNWLDFTVITFAVYVTEFVDLGNVSALRT  
FRVLRALKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRNKCIQWPPTNASLEEHSI  
EKNITVNYNGTLINETVFEFDWKSIIQDSRYHYFLEGFLDALLCGNSSDAGQCPEGYMCVKAGRNPYGYT  
SFDTFSWAFLSLFRLMTQDFWENLYQLTLRAAGKTYMIFVVLVIFLGSFYLNILAVVAMAYEEQNQATLE  
EAEQKEAEFQQMIEQLKKQQEAAQQAATATASEHSREPSAAGRLSDSSSEASKLSSKSAKERNNRRKKRKQ  
KEQSGGEEKDEDEFQKSESEDSIRRKGFRFSIEGNRLTYEKRYSSPHQSLLSIRGSLFSPRRNSRSLFSFRGRA  
KDVGSENFADDEHSTFEDNESRRDSLFPVRRHGERRNSNLSQTSRSMMLAVFPANGKMHSTVDCNGVVS  
LVGGPSVPTSPVGQLLPEVIIDKPADDDNGTTTETEMRKRSSSFHVSMDFLEDPSQRQRAMSIASILTNTVEE  
LEESRQKCPWCWYKFSNIFLIWDCSPYWLKVKHVNLVVMDFVLAITICIVLNTLFMAMEHYPMTDHFN  
NVLTVGNLVFTGIFTAEMFLKIIAMDPYFYFQEGWNIFDGFIVTSLVELGLANVEGLSVLRSFRLLRVFKLA  
KSWPTLNMLIKIIGNSVGALGNLTLVLAHVIFAVVGMQLFGKSYKDCVCKIASDCQLPRWHMNDFFHSFLI  
VFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCLTVFMMVMVIGNLVVLNLFALLSSFSADNLAATDDDNEMNNL  
QIAVDRMHKGVAVYVKRKIYEFIQQSFIKQKILDEIKPLDDLNNKDKSCMSNHTAEIGKDLDYLDKDVNGTTS  
GIGTGSSVEKYIIDESDYMSFINNPSLTVTPVIAVGESDFENLNTEDFSSESLEESKEKLNESSSSEGSTVDIG  
APVEEQPVVEPEETLEPEACFTEGCVQRFKCCQINVEEGRGKQWNLRRTCFRIVEHNWFETFIVFMILLSSG  
ALAFEDIYIDQRKTIKTMLEYADKVFTYIFILEMLLKWVAYGYQTYFTNAWCWLDLIVDVSLVSLTANALG  
YSELGAIKSLRTLRLRPLRALSREFGMRVVNALLGAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKPHYCINT  
TTGDRFDIEDVNNHTDCLKLIERNETARWKNVKNVDFDNGVFGYLSLLQVATFKGWMDIMYAAVDSRNVEL  
QPKYEESLYMYLYFVIFIFGSFFTLNLFIVGVIDNFNQKKKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKPKPKPI  
PRPGNKFQGMVDFVTRQVFDISIMILICLNMVMTMMVETDDQSEYVTILSRINLVFIVLFTGECVLKLSLRH  
YYFTIGWNIFDFVIVVILSIVGMFLA ELIEKYFVSPTLFR VIRLARIGRILRLIKGAKGIRTLFLMMSLPALFN  
IGLLFLVMFIYAIFGMSNFAYVKREVGIDDMFNFETFGNSMICLFQITTSAGWDGLLAPILNSKPPDCDPNKV  
NPGSSVKGDCGNPSVGIFFVSYIIISFLVVVNMYIAVILENFSVATEESAEPLEDDFEMFYEVWEKFDPDAT  
QFMFEKLSQFAAALEPPLNLPQPNKLQLIAMDLPVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGEGEMDALRIQMEERF  
MASNPSKVSYPITTLTKRKQEEVSAVIIQRAYRRHLLKRTVKQASFTYNKNKIKGGANLLIKEDMIIDRINE  
NSITEKTDLTMSTAACPPSYDRVTKPIVEKHEQEGKDEKAKGKCTerminal
```

**Figura 9: Sequência recuperada do subtipo Na<sub>v</sub>1.1 do canal para sódio.** Em destaque a sequência posteriormente escolhida.

#### 4.1.2 Determinação de segmentos extracelulares

Anotações dos 24 segmentos transmembranares, disponíveis no NCBI Protein, foram realizadas para cada subtipo do canal para sódio. A tabela 6 exemplifica as anotações realizadas para o subtipo Na<sub>v</sub>1.1 e a localização dos aminoácidos na sequência da proteína.

**Tabela 6: Anotação dos 24 segmentos transmembranares do subtipo Na<sub>v</sub>1.1.**

<b>Segmentos transmembranares</b>	
<b>1.</b> 124 – 147	<b>13.</b> 1214 – 1237
<b>2.</b> 156 – 175	<b>14.</b> 1251 – 1276
<b>3.</b> 189 – 207	<b>15.</b> 1283 – 1304
<b>4.</b> 214 – 233	<b>16.</b> 1309 – 1330
<b>5.</b> 250 – 273	<b>17.</b> 1350 – 1377
<b>6.</b> 400 – 425	<b>18.</b> 1457 – 1483
<b>7.</b> 763 – 787	<b>19.</b> 1537 – 1560
<b>8.</b> 799 – 822	<b>20.</b> 1572 – 1595
<b>9.</b> 831 – 850	<b>21.</b> 1602 – 1625
<b>10.</b> 857 – 876	<b>22.</b> 1636 – 1657
<b>11.</b> 893 – 913	<b>23.</b> 1673 – 1695
<b>12.</b> 967 – 992	<b>24.</b> 1762 - 1786

A partir das informações de localização dos segmentos transmembranares na sequência dos canais, foi possível a dedução dos segmentos extracelulares (Tabela 7), alvo do nosso estudo.

A sequência de aminoácidos correspondente a cada segmento extracelular foi obtida através de uma busca na sequência completa da proteína, recuperada previamente no NCBI Protein.

**Tabela 7: Dedução dos 12 segmentos extracelulares da isoforma Na<sub>v</sub>1.1.**

<b>Segmentos extracelulares</b>	<b>Sequência de aminoácidos</b>
<b>147-156</b>	MSNPPDWTKN
<b>207-214</b>	VDLGNVSA
<b>273-400</b>	LRNKCIQWPPTNASLEEHSIEKNITVNYNGTLINETVFEFDW KSYIQDSRYHYFLEGFLDALLCGNSSDAGQCPEGYMCVKA GRNPNYGYTSFDTFSWAFLSLFRLMTQDFWENLYQLTLRA AGKTYM
<b>787-799</b>	MEHYPMTDHFNNV
<b>850-857</b>	ANVEGLSV
<b>913-967</b>	GKSYKDCVCKIASDCQLPRWHMNDFFHSFLIVFRVLCGEWI ETMWDCMEVAGQAM
<b>1237-1251</b>	FEDIYIDQRKTIKTM
<b>1304-1309</b>	LGYSEL
<b>1377-1457</b>	INTTTGDRFDIEDVNNHTDCLKLIERNETARWKNVKVNFENV GFGYLSLLQVATFKGWMDIMYAAVDSRNVELQPKYEESL
<b>1560-1572</b>	VETDDQSEYVTTI
<b>1625-1636</b>	IEKYFVSPTLFR
<b>1695-1762</b>	VKREVGIDDMFNFETFGNSMICLFQITTSAGWDGLLAPILNS KPPDCDPNKVNPSSVKGDCGNPSVG



### 4.1.3 Alinhamento de sequência

O alinhamento das sequências de aminoácidos de todas as isoformas do canal para sódio foi feito utilizando a ferramenta ClustalW do programa Jalview. As sequências completas foram alinhadas e os resíduos de aminoácidos foram coloridos de acordo com a porcentagem de identidade entre si.

A sequência de aminoácidos PTLFR mostrou 100% de conservação entre as isoformas (Figura 10). Estes resíduos de aminoácidos estão localizados no domínio IV, no 11º segmento extracelular de todos os subtipos de canais para sódio. Esta característica foi considerada fundamental para a escolha do peptídeo a ser sintetizado.

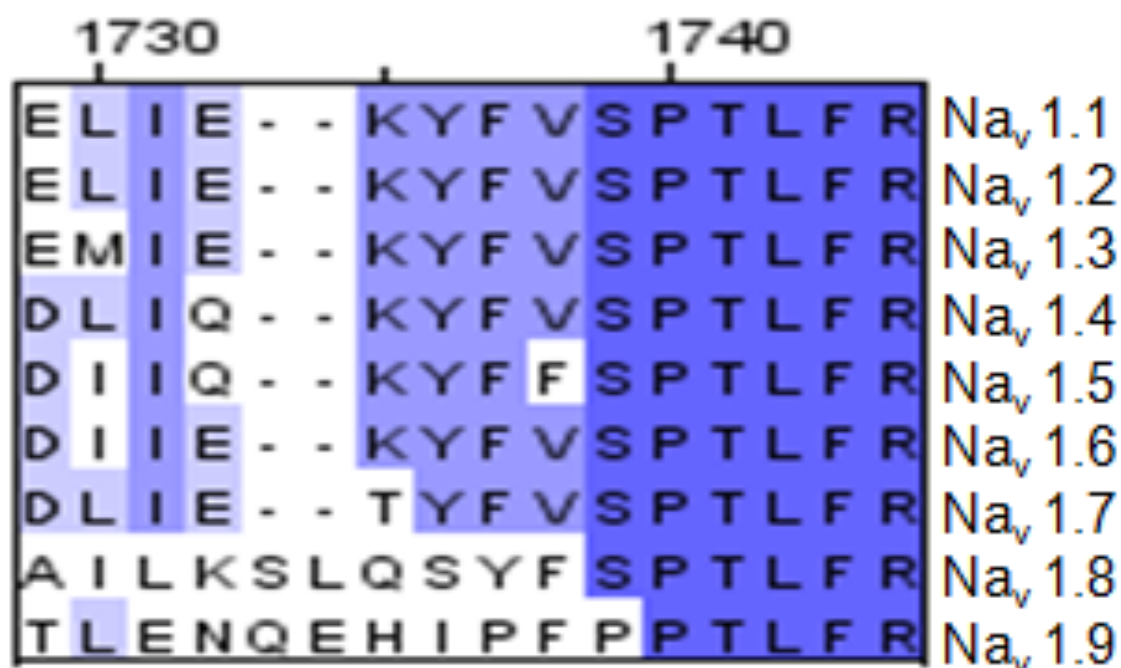


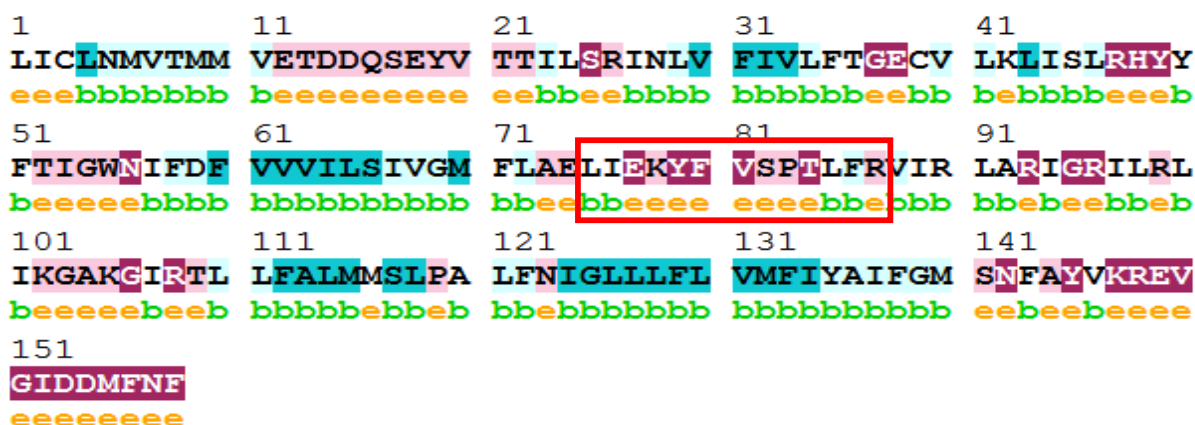
Figura 10: Alinhamento parcial de todas as isoformas de canais para sódio. Em diferentes tons de azul, resíduos de aminoácidos agrupados de acordo com a porcentagem de identidade entre si. Quanto mais intenso, maior é a porcentagem de identidade.

Devido à similaridade entre as sequências selecionamos a do Na<sub>v</sub>1.1 para a realização da predição de regiões imunogênicas e posterior síntese do peptídeo.

## 4.2 Predição de regiões imunogênicas

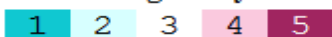
O algoritmo Epitopia foi utilizado para prever regiões imunogênicas como candidatas a epitopos para células B, a partir da sequência linear do subtipo Na<sub>v</sub>1.1.

De acordo com a escala fornecida pelo algoritmo, a sequência apresenta resíduos altamente imunogênicos (índice 4 e 5) e expostos (e) (extracelulares) (Figura 11), como o segmento LIEKYFVSPFLFR, características relevantes para a síntese do peptídeo. Além disso, de acordo com a literatura, não foram descritos anticorpos dirigidos contra esta sequência.



### Legend:

The immunogenicity scale:



Low Average High

e - A predicted exposed residue.

b - A predicted buried residue.

**Figura 11: Predição de regiões imunogênicas.** Sequência de aminoácidos parcial do subtipo Na<sub>v</sub>1.1 submetido a predição de epitopo pelo algoritmo Epitopia. A sequência conservada em todas as isoformas está destacada em vermelho.

### 4.3 Verificação da exclusividade da região em canais para sódio

A sequência do subtipo Na<sub>v</sub>1.1, que é conservada entre os outros subtipos de canais para sódio e predita como imunogênica, foi submetida à análise por PsiBlast. O Blast mostrou que o peptídeo de interesse está presente exclusivamente em canais para sódio e apresenta similaridade de sequência com os subtipos Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.4, Na<sub>v</sub>1.5, Na<sub>v</sub>1.6, Na<sub>v</sub>1.7 e Na<sub>v</sub>1.9.

### 4.4 Síntese do peptídeo

#### 4.4.1 Seleção e síntese do peptídeo

Inicialmente selecionamos para síntese a sequência **LIEKYFVSPTLFRVI** do subtipo Na<sub>v</sub>1.1, um peptídeo de 15 aminoácidos, no qual 9 são hidrofóbicos. Devido a este caráter hidrofóbico o peptídeo não foi solúvel em água e em alguns solventes orgânicos.

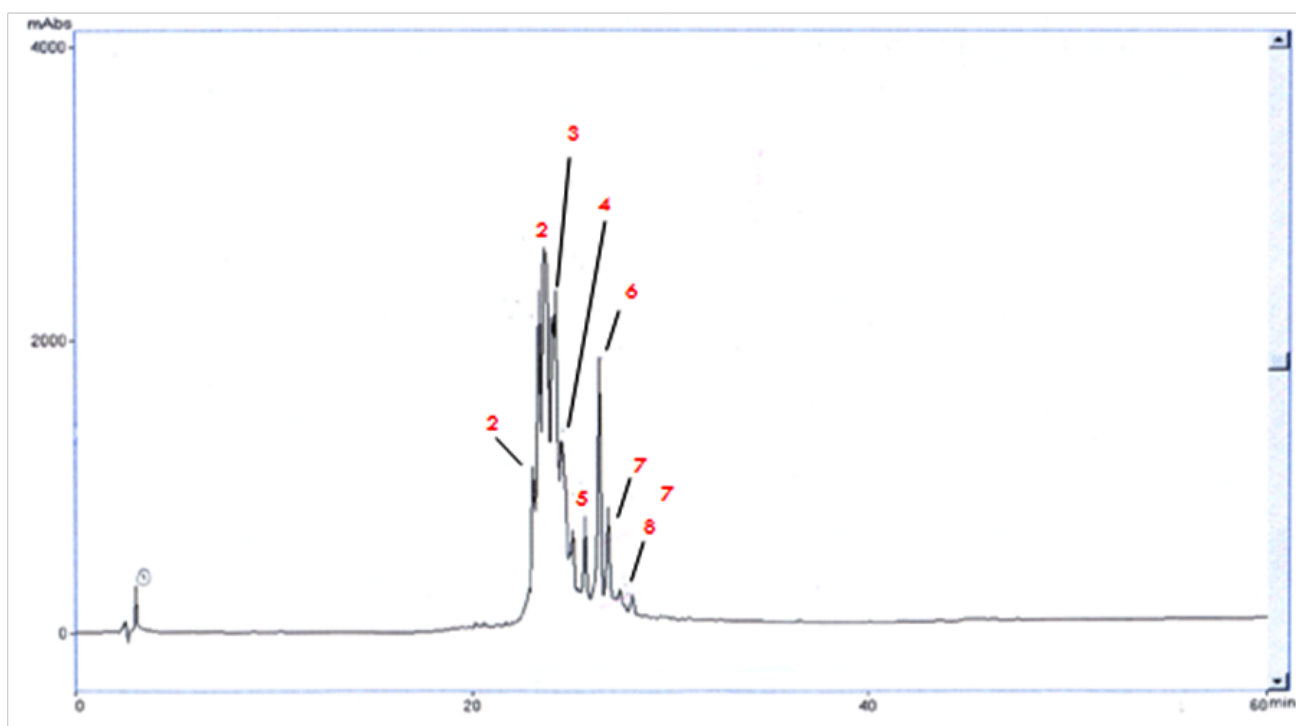
Com o objetivo de aumentar a solubilidade do peptídeo fizemos algumas modificações substituindo aminoácidos hidrofóbicos por resíduos polares ou carregados de acordo com *Custom Peptide Technical Support* ([http://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=peptide\\_support](http://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=peptide_support)).

O peptídeo alterado, selecionado para síntese, **TGEKYFVSEPTLFRGNKEK**, é composto por 19 aminoácidos, sendo 5 hidrofóbicos, 3 carregados negativamente, 4 carregados positivamente e 7 polares e se mostrou solúvel em água e foi utilizado nos ensaios posteriores.

O peso molecular de 2230,51Da e o ponto isoelétrico de 8,10 do peptídeo selecionado foram calculados pela ferramenta *Compute pI/Mw* disponível no portal ExpASy.

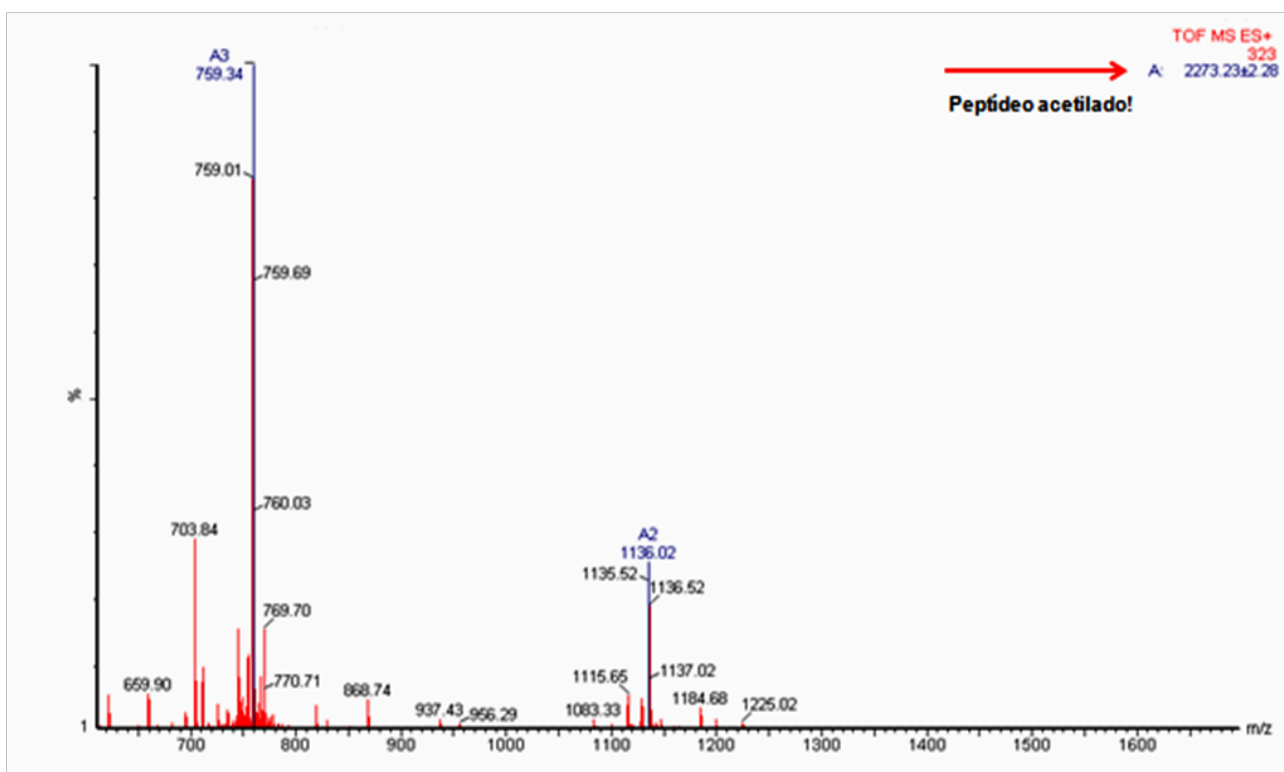
#### 4.4.2 Purificação do peptídeo e espectrometria de massas

O peptídeo foi solubilizado em 80% de acetonitrila e submetido à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC- *Shimadzu*) acoplada à coluna C18 (*Vydac*). O perfil de purificação do peptídeo está demonstrado na figura 12.



**Figura 12: Purificação do peptídeo em HPLC.** Em vermelho estão os picos coletados na corrida.

Os picos obtidos foram submetidos à análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF). A massa do peptídeo (2230,51Da) acrescida de um grupamento acetila (42Da) foi confirmada no pico 2, com a massa de 2273Da, como demonstrado na figura 13.



**Figura 13: Espectrometria de massas.** Em destaque está a massa do peptídeo acrescida da massa de um grupamento acetila.

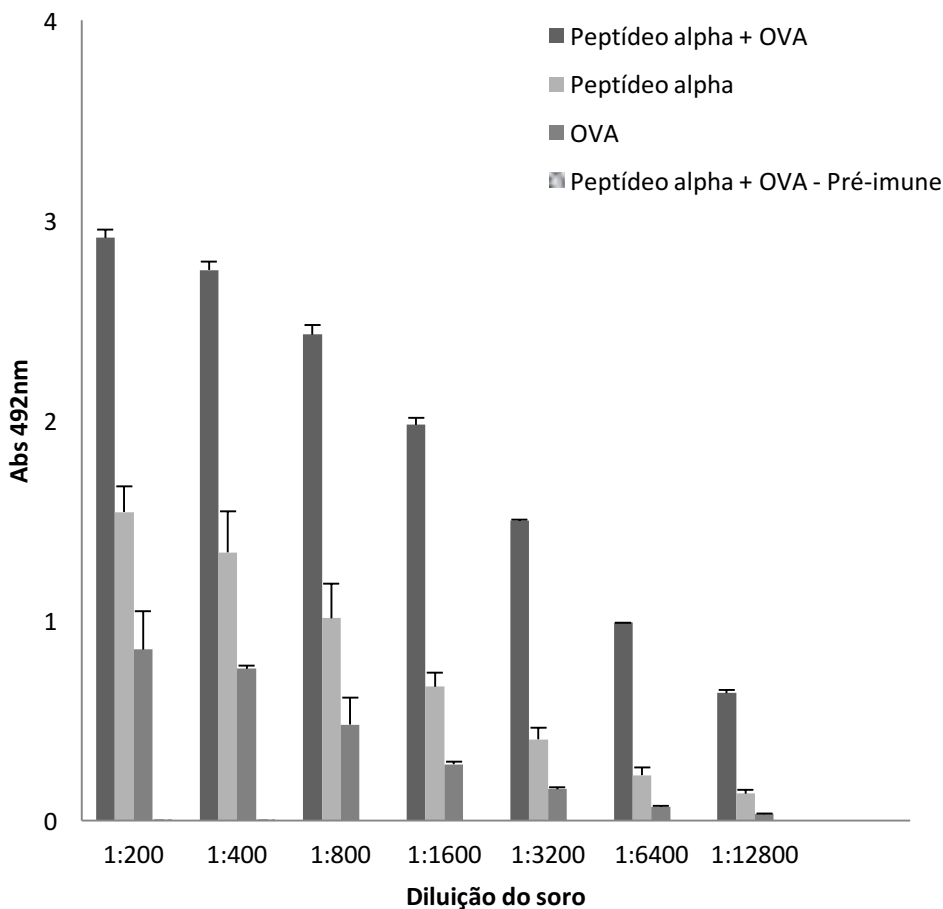
## **4.5 Reatividade dos anticorpos anti-peptídeo alpha**

### **4.5.1 ELISA indireta**

O peptídeo reativo foi acoplado à ovalbumina (OVA), assumindo o papel de uma proteína carreadora e utilizado como imunógeno em camundongos Balb/C e coelhos New Zealand. O imunógeno produzido (TGEKYFVSEPTLFRGNKEK – OVA) foi testado quanto à sua habilidade de incitar uma resposta imune efetiva em camundongos e coelhos. Uma semana após a 8ª dose o soro dos animais foi coletado e o soro de coelho foi purificado em coluna de proteína A.

A reatividade do soro de camundongos frente ao peptídeo alpha conjugado à OVA, frente ao peptídeo alpha e frente à OVA, foi verificada, em diferentes diluições. Foram observados anticorpos reativos frente a todas as condições testadas (Figura 14). Para o soro frente ao peptídeo alpha conjugado à OVA, a diluição que apresentou densidade ótica (DO) de 1.0, foi 1:6400 e para o soro frente ao peptídeo alpha, foi 1:800. Desta maneira, observamos que o soro de camundongo anti-peptídeo alpha-OVA é capaz de reconhecer o peptídeo sozinho, não carreado.

Como podemos ver na figura 14, não houve reação do soro pré-imune contra o peptídeo alpha + OVA, assim como contra o peptídeo alpha e contra a OVA (não mostrado no gráfico).

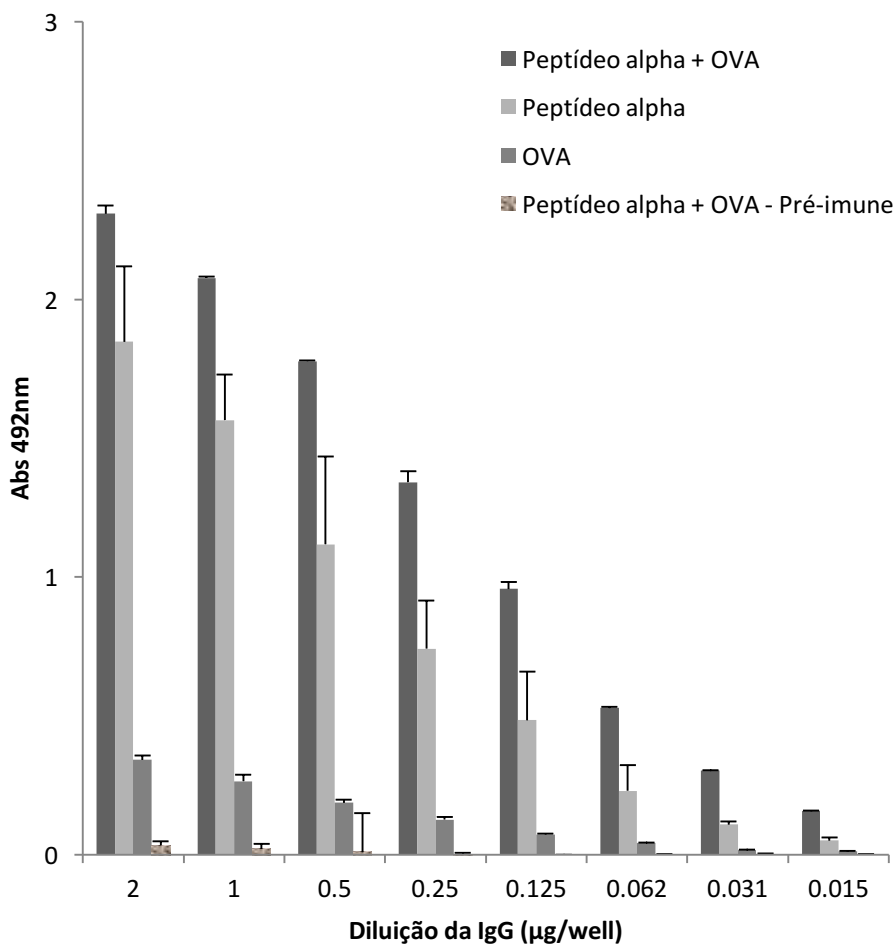


**Figura 14: Reatividade, medida por ELISA, do soro anti-peptídeo alpha-OVA.** A placa foi sensibilizada com 100µl de solução contendo 10µg/ml do peptídeo alpha + OVA, somente peptídeo alpha e somente OVA como controle negativo. Não houve reatividade do soro pré-imune frente ao peptídeo alpha + OVA.

Foi avaliada também, a capacidade do imunógeno em desencadear uma resposta imune em coelhos New Zealand.

Para a IgG frente ao peptídeo alpha conjugado à OVA, a diluição que apresentou densidade ótica (DO) de 1.0, foi 0,125µg/poço e para a IgG frente ao peptídeo alpha, foi 0,5µg/poço (Figura 15), mostrando uma forte reatividade da IgG purificada frente ao peptídeo alpha não carregado.

Podemos observar na figura 15 que não houve reação da IgG pré-imune contra o peptídeo alpha + OVA, assim como contra o peptídeo alpha e contra a OVA (não mostrado no gráfico).



**Figura 15: Reatividade, medida por ELISA, da IgG anti-peptídeo alpha.** A placa foi sensibilizada com 100µl de solução contendo 10µg/ml de peptídeo alpha + OVA, somente peptídeo alpha e somente OVA como controle negativo. Não houve reatividade da imunoglobulina pré-imune frente ao peptídeo alpha + OVA.



#### 4.5.2 SPOT

Como o peptídeo correspondente ao 11º segmento extracelular do canal para sódio Na<sub>v</sub>1.1 se mostrou insolúvel quando sintetizado em solução, não foi possível testar sua reatividade por ELISA. Desta maneira, adotamos a metodologia de SPOT síntese para testar se os anticorpos produzidos contra o peptídeo alpha reconheceriam através dessa técnica o peptídeo hidrofóbico mimetizado do 11º segmento.

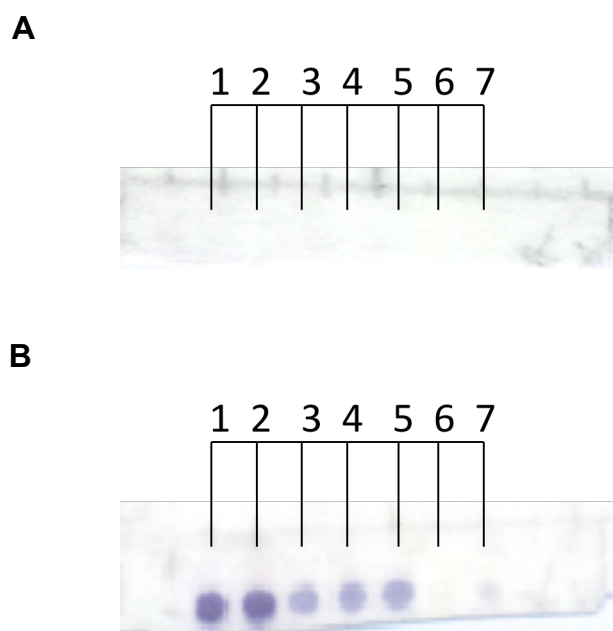
Desta maneira, a sequência do peptídeo alpha, foi sintetizada em uma membrana de SPOT, assim como sua sequência invertida, como controles positivo e negativo. Na mesma membrana, foi sintetizada a sequência do peptídeo hidrofóbico e sua sequência invertida como controle negativo (Tabela 8).

**Tabela 8: Peptídeos alpha e mimético do 11º segmento extracelular com suas sequências invertidas sintetizados na membrana de SPOT.**

# SPOT	Sequência	Identificação
1	TGEKYFVSEPTLFRGNKEK	Peptídeo alpha
2	TGEKYFVSEPTLFRGNKEK	Peptídeo alpha
3	LIEKYFVSPTLFRVI	Peptídeo hidrofóbico
4	LIEKYFVSPTLFRVI	Peptídeo hidrofóbico
5	LIEKYFVSPTLFRVI	Peptídeo hidrofóbico
6	KEKNGRFLTPESVIFYKEGT	Peptídeo alpha invertido
7	IVRFLTPSVIFYKEIL	Peptídeo hidrofóbico invertido

Para garantir a especificidade das reações, os anticorpos secundários a serem utilizados no imunoenensaio (anti-IgG de camundongo conjugada à fosfatase alcalina) foram primeiramente testados com as membranas. Nenhum spot se mostrou reativo, o que descarta uma possível reatividade cruzada com este anticorpo. Outro ensaio, utilizando primeiramente soro pré-imune de camundongo, seguida da adição do anticorpo secundário utilizado acima, também foi realizado, e novamente não foram detectados spots reativos (Figura 16A).

Ao testar o soro de camundongo anti-peptídeo alpha-OVA frente aos peptídeos por SPOT (Figura 16B), observamos reatividade frente aos spots 1 e 2, correspondentes ao peptídeo alpha, assim como os spots 3, 4 e 5, correspondentes ao peptídeo hidrofóbico. O spot 6, correspondente ao peptídeo alpha invertido e o spot 7, correspondente ao peptídeo hidrofóbico invertido, não apresentaram reatividade, demonstrando a especificidade do reconhecimento da sequência correta dos peptídeos.



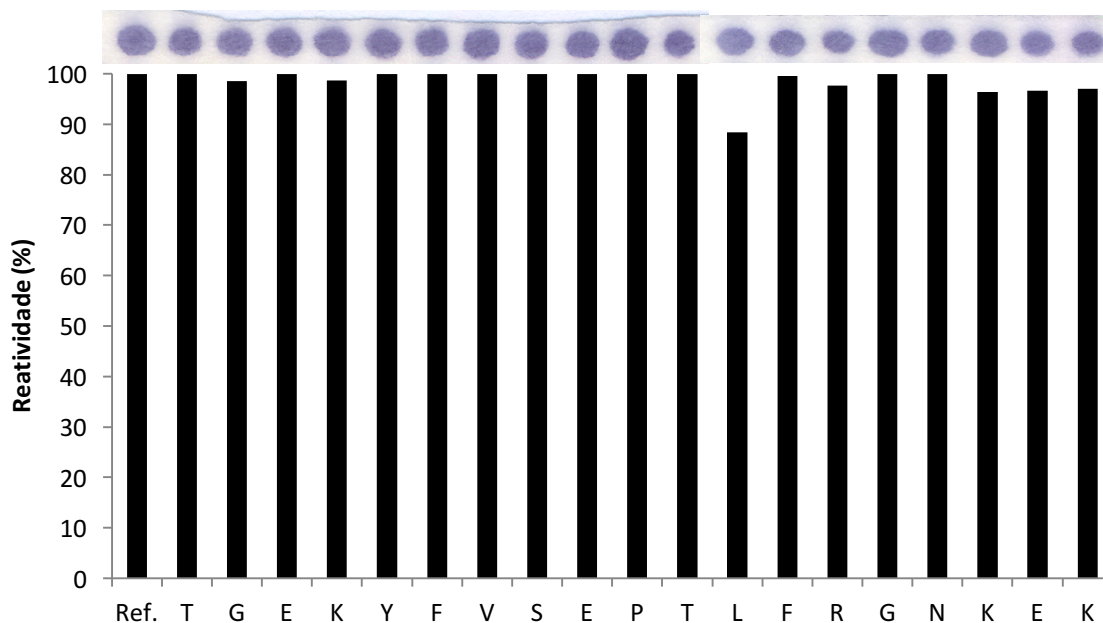
**Figura 16: Reatividade dos peptídeos alpha e mimético do segmento extracelular 11 do canal para sódio por SPOT. A) Frente ao soro pré-imune de camundongo.** Foi utilizado soro de camundongo pré-imune na diluição 1:400 e o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina em diluição 1:3000. **B) Frente ao soro anti-peptídeo alpha-OVA.** Foi utilizado soro de camundongo anti-peptídeo alpha-OVA na diluição 1:400 e o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina na diluição 1:3000.

#### **4.6 Determinação dos aminoácidos críticos do peptídeo para interação com o anticorpo**

##### **4.6.1 Alanina-Scan**

Para verificar os resíduos importantes para a interação dos anticorpos gerados, foi produzida uma membrana de SPOT contendo uma série de análogos do peptídeo alpha, onde cada aminoácido foi substituído por uma alanina, para verificar os efeitos dessa substituição (Figura 17). Através desse ensaio, observamos que a modificação de cada um dos aminoácidos do peptídeo alpha por alanina não acarretou em nenhuma mudança significativa para a interação com o anticorpo.

Apenas uma leve alteração na ligação dos anticorpos anti-peptídeo alpha foi observada quando o resíduo de leucina (L) foi substituído por alanina.



**Figura 17: Gráfico de reatividade e membrana de ALA-Scan do peptídeo alpha, testado com o soro anti-peptídeo alpha-OVA.** A reatividade do soro anti-peptídeo alpha-OVA de camundongo na diluição 1:400 foi medida pela quantidade de pixels por área no programa ImageJ. A sequência original do peptídeo foi utilizada como referência (Ref.) e sua medida correspondeu à 100% de reatividade, a partir da qual a reatividade dos demais spots foi calculada.

Visando identificar os resíduos de aminoácidos importantes no peptídeo hidrofóbico correspondente ao segmento extracelular 11 do canal para sódio  $Na_v1.1$ , uma série de análogos do peptídeo, substituindo-se cada resíduo de aminoácido por uma alanina, foram sintetizados para a região, bem como uma série de análogos para o mesmo segmento dos canais para sódio nas diferentes isoformas  $Na_v1.4$ ,  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.6$  e  $Na_v1.7$ .

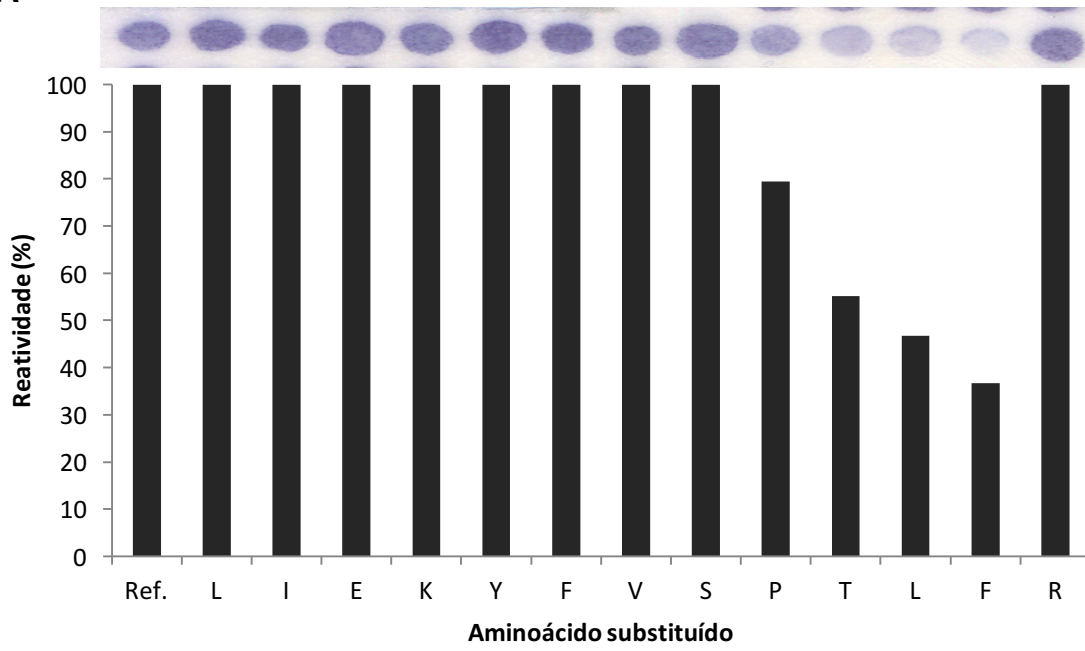
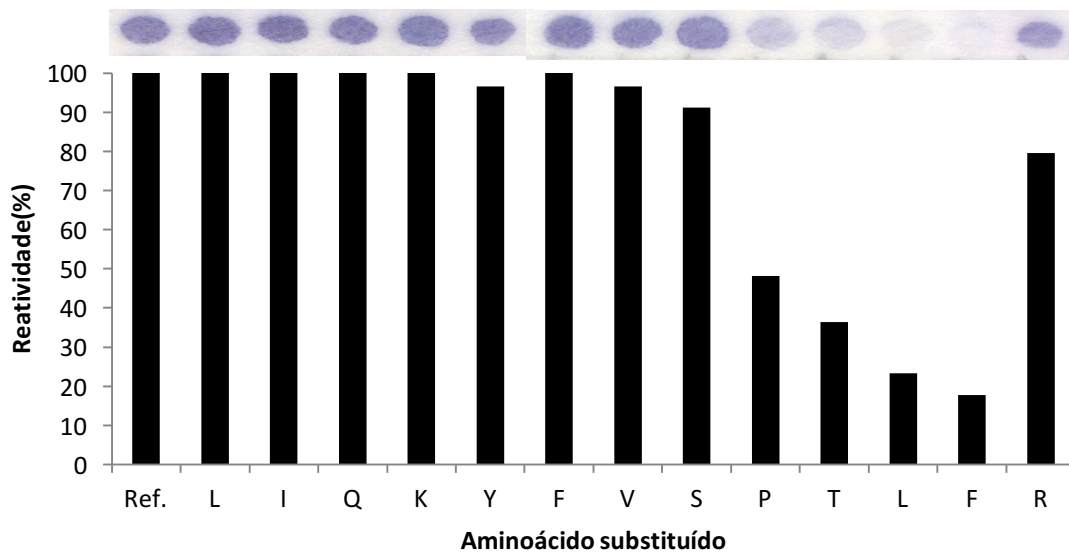
A membrana sintetizada foi testada com soro de camundongo anti-peptídeo alpha-OVA em uma diluição 1:400 (Figura 18). Novamente, testamos a membrana com soro pré-imune e anticorpo secundário e nenhuma reação foi observada.

A substituição dos resíduos de prolina (P), treonina (T), leucina (L) e fenilalanina (F) pertencentes à região extracelular do canal para sódio alterou significativamente a ligação dos anticorpos anti-peptídeo alpha-OVA.

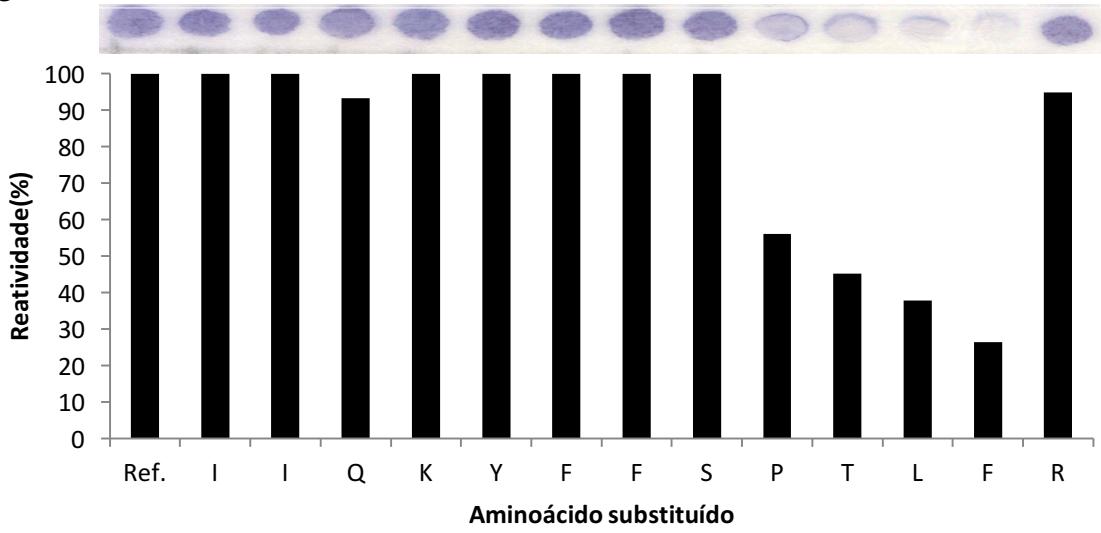
A alteração dos aminoácidos prolina e treonina na sequência do canal Na<sub>v</sub>1.4 acarretou uma diminuição de mais de 50% na reatividade, enquanto que para os resíduos leucina e fenilalanina essa diminuição foi de aproximadamente 80%.

Para o canal Na<sub>v</sub>1.5 a alteração da prolina e treonina diminuiu em 50% a reatividade e a diminuição foi de 60% e 70% para a substituição dos aminoácidos leucina e fenilalanina respectivamente. Efeito semelhante foi observado para o canal Na<sub>v</sub>1.6.

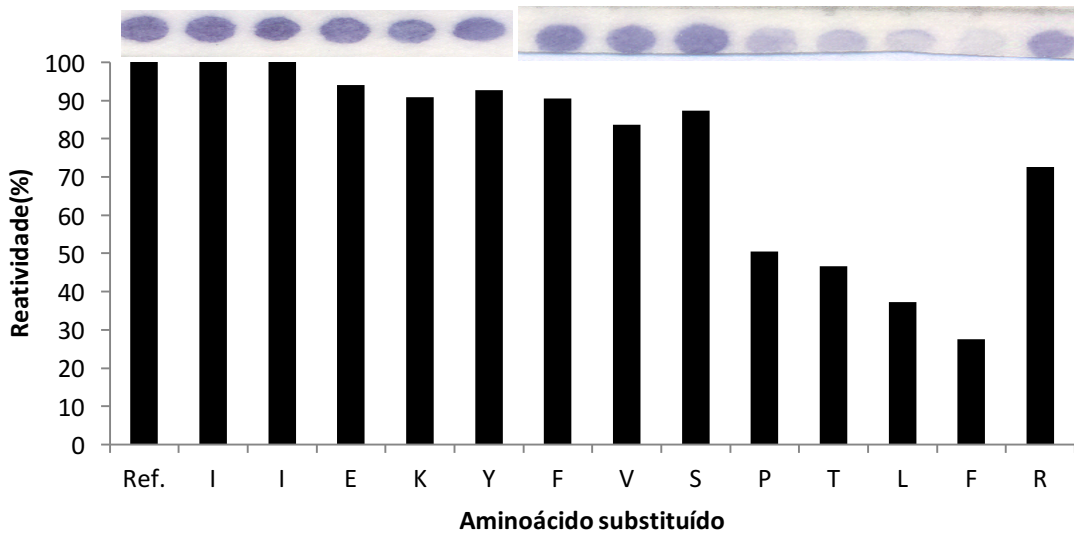
Um efeito menos acentuado foi observado para o canal Na<sub>v</sub>1.7 e Na<sub>v</sub>1.1 que apresentaram uma diminuição de 30% na reatividade ao substituir prolina por alanina e uma redução de aproximadamente 40% para a substituição da treonina e 60% para a substituição dos resíduos leucina e fenilalanina.

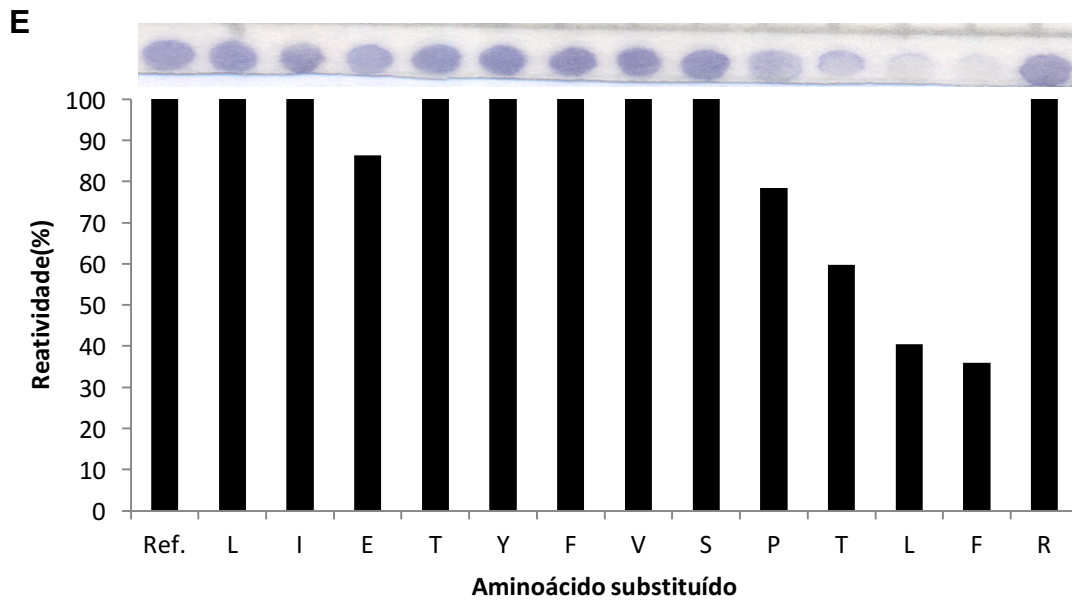
**A****B**

**C**



**D**





**Figura 18: Gráficos de reatividade e membranas de ALA-Scan testadas com o soro de camundongos imunizados com o peptídeo alpha-OVA. A) Sequência Na<sub>v</sub>1.1. B) Sequência Na<sub>v</sub>1.4. C) Sequência Na<sub>v</sub>1.5. D) Sequência Na<sub>v</sub>1.6. E) Sequência Na<sub>v</sub>1.7.** A reatividade foi medida pela quantidade de pixels por área no programa ImageJ. A sequência original do peptídeo como utilizada como referência (Ref.) e sua medida correspondeu a 100% de reatividade, a partir da qual a reatividade dos demais spots foi calculada.



## **4.7 Avaliação da ligação de imunoglobulinas à células HEK expressando**

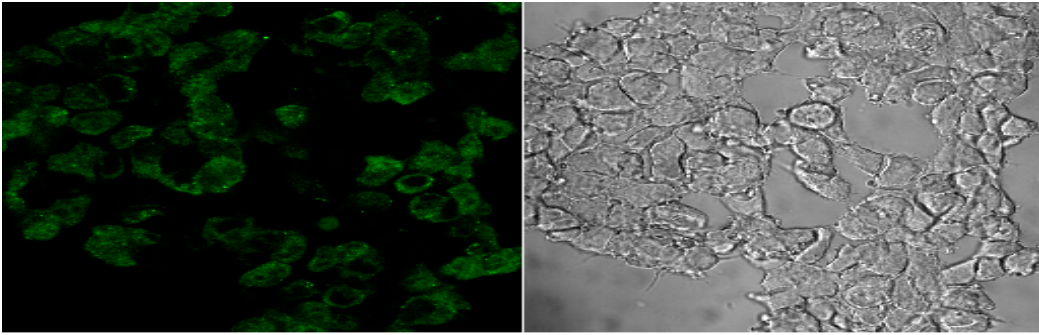
### **Na<sub>v</sub>1.3**

#### **4.7.1 Imunohistoquímica**

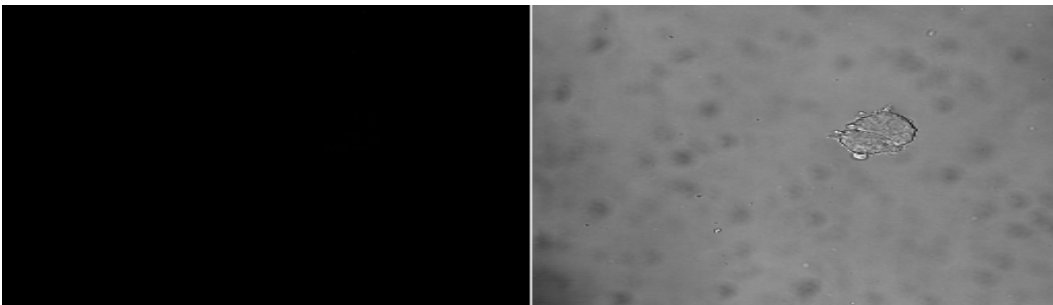
O ensaio de imunohistoquímica foi realizado para investigar se a IgG anti-peptídeo alpha se liga a células HEK expressando o canal para sódio Na<sub>v</sub>1.3. Estas células foram colocadas em contato com a IgG e posteriormente incubadas com um anticorpo anti-IgG de coelho marcado com fluorescência. As células foram então visualizadas em microscopia confocal.

Os resultados preliminares são encontrados na figura 19. Toda a região da membrana celular exposta para o meio extracelular foi marcada pela fluorescência nas células tratadas com a imunoglobulina (Figura 19A), enquanto que os grupos controles testados (apenas com o anticorpo secundário ou com a imunoglobulina pré-imune e anticorpo secundário) foram negativos para a marcação (Figura 19B e C).

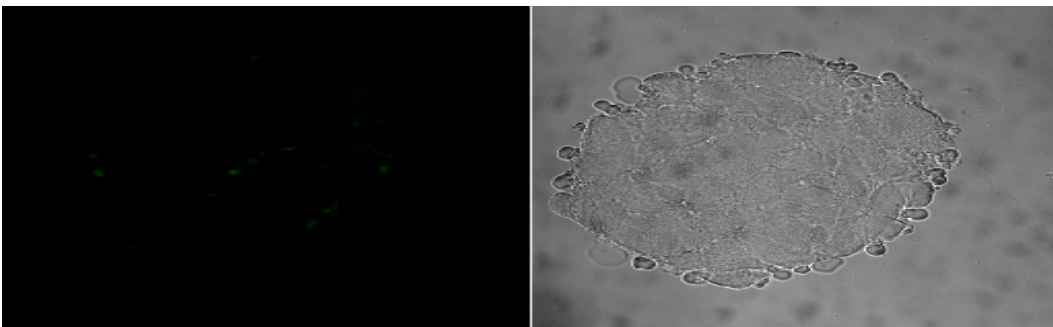
**A**



**B**



**C**

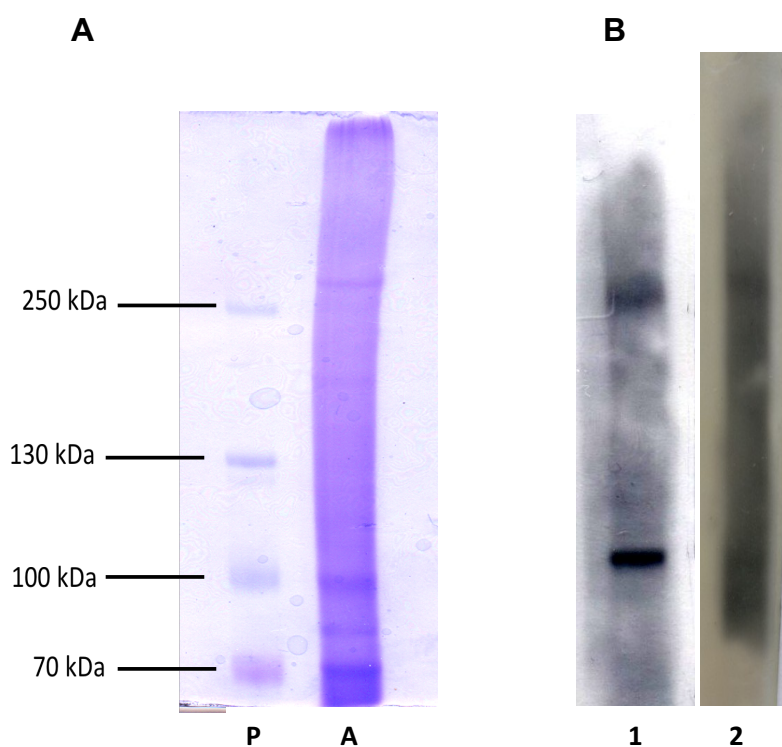


**Figura 19: Imagens representativas mostrando a ligação da imunoglobulina à membrana de células HEK Na<sub>v</sub>1.3. A) IgG anti-peptídeo alpha.** Foi realizada a incubação das células com a IgG e posteriormente com anticorpos anti-IgG de coelho marcados com Alexa Fluor 488. **B) Alexa 488.** Células foram tratadas somente com o anticorpo anti-coelho marcados com Alexa Fluor 488. **C) IgG Pré-Imune.** Foi realizada a incubação das células com a IgG e posteriormente com anticorpos anti-IgG de coelho marcados com Alexa Fluor 488. Quadro esquerdo: imagens obtidas com o filtro 488; Quadro direito: imagens obtidas sem o filtro.

## 4.8 Avaliação da reatividade dos anticorpos frente a extrato de cérebro de camundongo

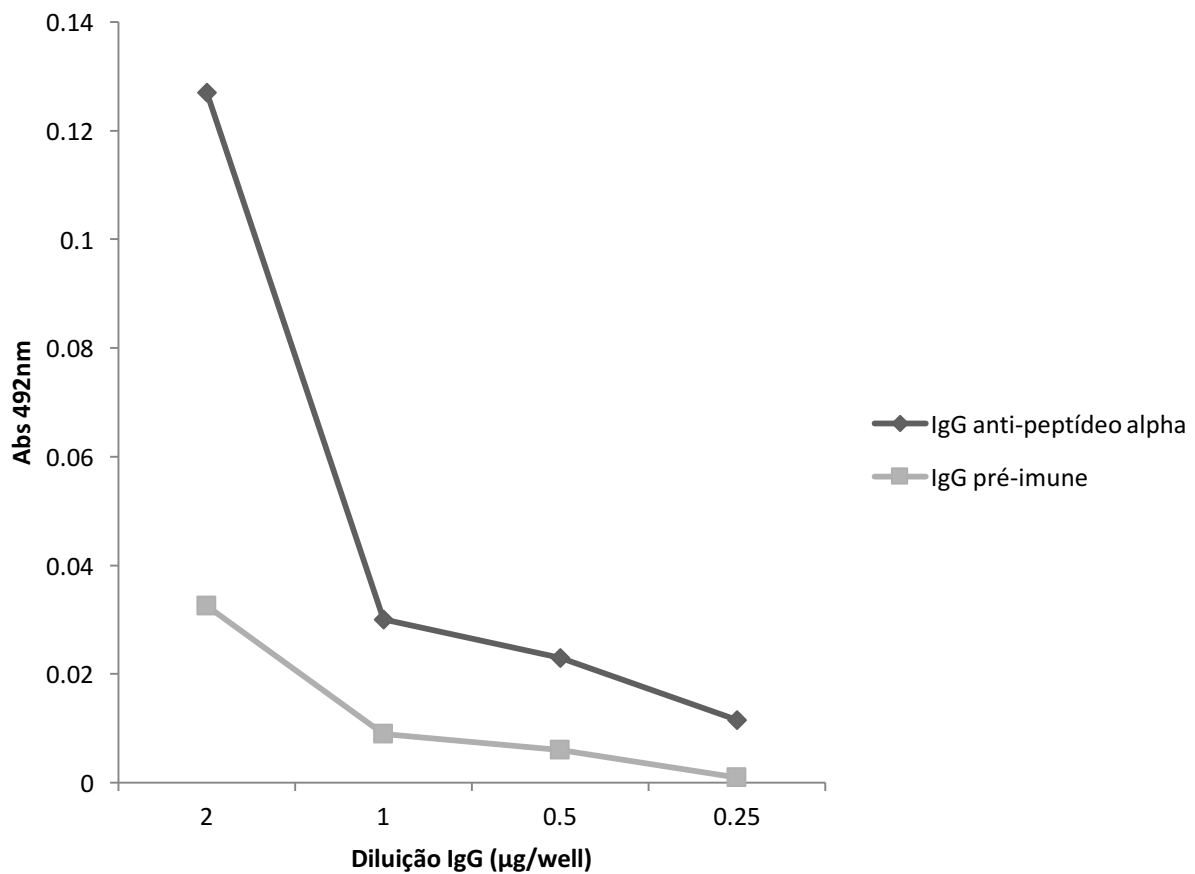
### 4.8.1 Imunoblot

A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida do extrato de córtex de cérebro de camundongos revelou a presença de uma proteína de aproximadamente 260kDa (Figura 20A), massa do canal para sódio. A imunoglobulina anti-peptídeo alpha, reconheceu, por *Western blot*, uma proteína do córtex de aproximadamente 260kDa e uma proteína de aproximadamente 100kDa não identificada (Figura 20B).



**Figura 20: Análise de proteínas do córtex de camundongo em gel de poliacrilamida e *Western blot*. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida.** Extrato de córtex de cérebro de camundongo. P, padrão; A, amostra. **B) *Western blot*.** Análise desta amostra utilizando IgG anti-peptídeo alpha (1) e IgG pré-imune (2).

A reatividade das imunoglobulinas anti-peptídeo alpha e pré-imune frente ao extrato de córtex, também foi verificada pelo ensaio de ELISA (Figura 21). A IgG anti-peptídeo alpha foi capaz de reconhecer o extrato, entretanto não foi observada reação para a IgG pré-imune.



**Figura 21: Reatividade, medida por ELISA, da IgG anti-peptídeo alpha e IgG pré-imune frente ao extrato de córtex.** A placa foi sensibilizada com 100µl de solução contendo 50µg/ml de extrato de córtex.

## 4.9 Avaliação do efeito dos anticorpos na corrente para sódio

### 4.9.1 Eletrofisiologia

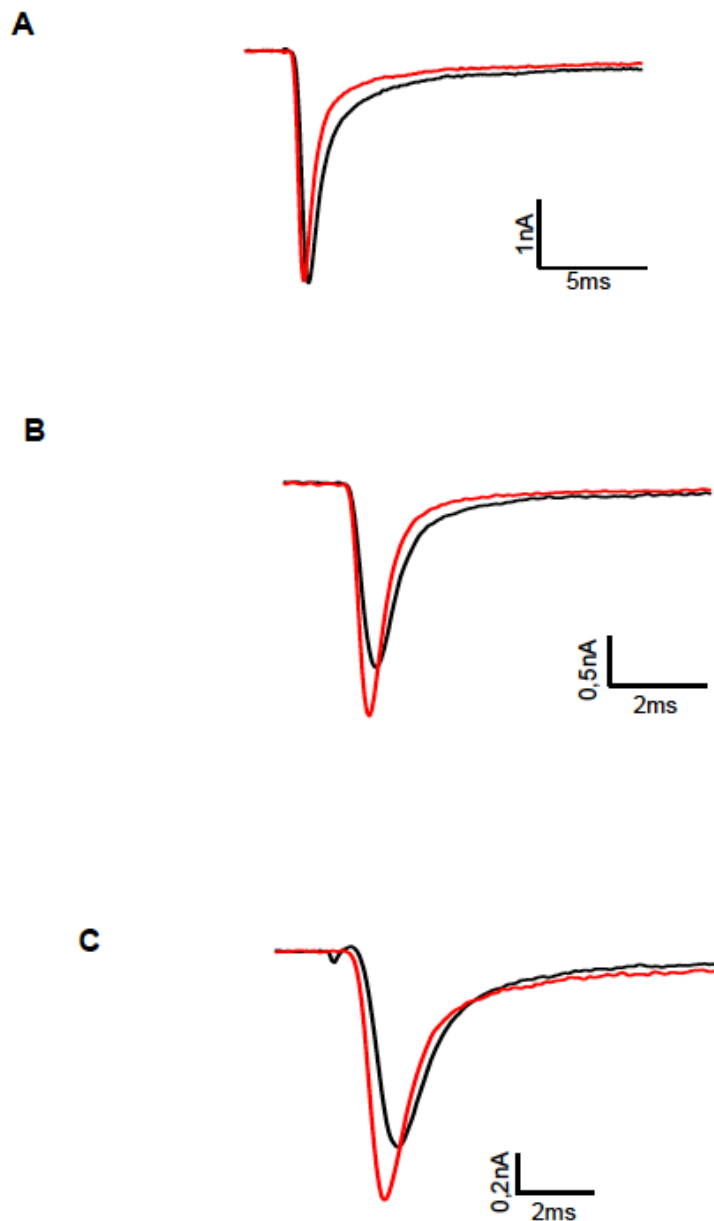
O protocolo utilizado para este ensaio está exemplificado na figura 8.

Visto que a IgG anti-imunógeno é capaz de se ligar à células HEK que expressam o canal  $Na_v1.3$ , o próximo passo deste trabalho foi investigar se esta ligação interfere no comportamento eletrofisiológico das células.

Para isso, células HEK  $Na_v1.3$  foram tratadas com IgG anti-imunógeno e a corrente de sódio foi investigada através da técnica de *Patch Clamp* no modo *Whole cell*.

Como pode ser notada na figura 22A, a corrente de sódio presente em células tratadas com imunoglobulina pré-imune (em vermelho), em relação a corrente da célula controle (solução externa), não apresentou variação estatisticamente significativa.

As figuras 22B e C apresentam os traçados representativos da corrente de sódio em células HEK  $Na_v1.3$  tratadas com a IgG anti-imunógeno e com a porção Fab, respectivamente. A IgG anti-peptídeo alpha a 600pM aumenta em média 16% a corrente de  $Na^+$  (Figura 22B) enquanto a porção Fab, a 200nM, aumenta em média 23% (Figura 22C), valores considerados estatisticamente significativos (teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05\%$ ). Além disso, uma análise mais cuidadosa sugere que estas duas moléculas interferem na corrente de sódio e deslocam a curva de ativação para um sentido mais negativo, levando a um aumento nesta corrente.



**Figura 22: Traçados representativos da corrente de sódio em células HEK  $\text{Na}_v1.3$ .** Em vermelho, corrente de células tratadas. Em preto, corrente de células controle (solução externa). **A) IgG pré-imune.** Corrente de células HEK  $\text{Na}_v1.3$  tratadas com  $0,1\mu\text{g/ml}$  de IgG pré-imune. **B) IgG anti-peptídeo alpha.** Corrente de células HEK  $\text{Na}_v1.3$  tratadas com  $0,1\mu\text{g/ml}$  de IgG anti-peptídeo alpha. **C) Fab anti-peptídeo alpha.** Corrente de células HEK  $\text{Na}_v1.3$  tratadas com  $0,1\mu\text{g/ml}$  de porção Fab anti-peptídeo alpha.

DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

Em todas as células eletricamente excitáveis de mamíferos, os canais para sódio voltagem dependentes são essenciais para a geração do potencial de ação e, assim, ao nível de um único neurônio são indispensáveis para a sinalização elétrica (Catterall, 2000). Em virtude de sua função, as patologias que envolvem os canais para sódio podem causar um aumento no seu funcionamento levando a uma hiperexcitabilidade neuronal associada a manifestações clínicas como as convulsões. Por outro lado, podem causar atenuação da função do canal e hipoexcitabilidade neuronal associada a manifestações clínicas como a paralisia (Waxman, 2007).

As primeiras canalopatias associadas a mutações dos canais para sódio neuronais foram descobertas em rato: uma mutação nula do gene SCN8A (Burgess et al., 1995) e uma mutação de ganho de função no gene SCN2A (Kearney et al., 2001). A triagem de pacientes humanos com distúrbios clínicos relacionados levou a identificação de mutações no gene SCN1A em duas grandes famílias que apresentavam epilepsia. Posteriormente, mais de 20 mutações diferentes foram identificadas no gene SCN1A (Figura 3) (Catterall et al., 2008), sendo que, duas destas mutações, associadas à epilepsia infantil, estão localizadas no 11º segmento extracelular, no local de ligação do anticorpo anti-peptídeo alpha.

O conhecimento da estrutura e funcionamento dos canais para sódio e as propriedades de interação destes com outras moléculas, como os anticorpos, pode levar a um avanço no desenvolvimento de novos marcadores, que auxiliarão no tratamento das canalopatias associadas ao canal para sódio.

A arquitetura do canal para sódio foi recentemente revelada em três dimensões pela determinação da estrutura cristalina do canal Na<sub>v</sub>Ab bacteriano



(Payandeh et al., 2011). Entretanto, a estrutura do canal para sódio humano ainda não foi descrita e as regiões transmembranares e extracelulares exatas destes canais não foram determinadas. Neste sentido, estudos funcionais foram realizados com o objetivo de conhecer aproximadamente a posição dos segmentos de aminoácidos nestas regiões.

Diversos estudos sobre o mapeamento de canais para sódio com a utilização de anticorpos já foram descritos anteriormente (Noda et al., 1986; Gordon et al., 1987; Gordon et al., 1988; Tejedor e Catterall, 1988; Thomsen e Catterall, 1989; Withaker et al., 2001; Chioni et al., 2005). Dentre estes, dois estudos demonstraram a produção de anticorpos dirigidos contra o 3º, 9º e 12º segmentos extracelulares do canal para sódio Na<sub>v</sub>1.2 (Tejedor e Catterall, 1988); (Thomsen e Catterall, 1989).

Em outro trabalho, anticorpos dirigidos contra sequências extracelulares das isoformas Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.4, Na<sub>v</sub>1.5, Na<sub>v</sub>1.6, Na<sub>v</sub>1.7, Na<sub>v</sub>1.8 e Na<sub>v</sub>1.9 do canal para sódio foram descritos (WO 2007/023298 A2, 2007). Através da localização aproximada destas sequências, obtida a partir de dados anotados no NCBI como transmembranares e da dedução dos segmentos extracelulares, observamos que alguns dos segmentos descritos localizavam-se intracelularmente e não extracelularmente como afirmava o autor. Sendo assim, apenas 4 anticorpos foram produzidos neste estudo contra segmentos extracelulares, localizados na 3ª e 9ª alça do canal para sódio.

Além destes, são atualmente comercializados pelas empresas *Sigma*, *Milipore* e *Santa Cruz Biotechnology* três anticorpos, dirigidos também contra regiões extracelulares. Um dos anticorpos, policlonal, é dirigido contra 1º segmento extracelular do canal Na<sub>v</sub>1.2, próximo ao N-terminal. O segundo, monoclonal, é dirigido contra uma região extracelular do canal Na<sub>v</sub>1.5. O terceiro, monoclonal, é

dirigido contra o 1º segmento extracelular do canal Na<sub>v</sub>1.7. Estas empresas disponibilizam também, um anticorpo monoclonal produzido contra o 9º *loop* intracelular presente em todas as isoformas dos canais para sódio.

É importante ressaltar, contudo, que anticorpos dirigidos contra regiões intracelulares dos canais para sódio não podem ser usados em ensaios de inibição com células vivas. Neste sentido, o desenvolvimento de anticorpos contra regiões extracelulares seria essencial no estudo da inibição da proliferação de células tumorais e também em ensaios de competição com drogas e toxinas para determinação de sítios de ligação destas nos canais.

Visto a importância do mapeamento de canais para sódio e a carência de anticorpos dirigidos contra regiões extracelulares, em especial contra segmentos do domínio IV, buscamos selecionar neste trabalho, uma sequência extracelular comum a todos os subtipos de canais para sódio. A sequência do canal Na<sub>v</sub>1.1, LIEKYFVSPTLFRVI, selecionada no presente estudo, se mostrou altamente conservada entre todas as isoformas. Entretanto, devido ao seu caráter hidrofóbico foi necessária a modificação de alguns aminoácidos para que o peptídeo fosse solúvel em meio aquoso.

Ao desenvolver peptídeos, é aconselhável que haja um aminoácido carregado a cada cinco para auxiliar a solubilização. Se não for possível, recomenda-se a substituição de aminoácidos hidrofóbicos por resíduos polares ou carregados ([http://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=peptide\\_support](http://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=peptide_support)). Desta forma, para o peptídeo selecionado, os resíduos de aminoácidos das pontas N-terminal, leucina (L) e isoleucina (I), e C-terminal, valina (V) e isoleucina, hidrofóbicos, foram substituídos por resíduos polares, treonina (T), glicina (G) e asparagina (N) e resíduos carregados, lisina (K) e ácido glutâmico (E).

Adicionalmente, um resíduo de ácido glutâmico, carregado negativamente, foi inserido na metade da sequência. Entretanto, uma vez que a sequência PTLFR mostrou-se altamente conservada entre as isoformas dos canais para sódio, resolvemos não modificá-la. Após estas alterações a sequência final para síntese foi **TGEKYFVSEPTLFRGNKEK**.

A sequência sintetizada está localizada entre os segmentos 3 e 4 (aa 1624-1642, 11º segmento extracelular), no domínio IV, e de acordo com o Blast, está presente exclusivamente em canais para sódio voltagem dependentes apresentando similaridade com os subtipos Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.4, Na<sub>v</sub>1.5, Na<sub>v</sub>1.6, Na<sub>v</sub>1.7 e Na<sub>v</sub>1.9.

O peptídeo sintetizado, acoplado à ovalbumina, foi utilizado para imunizar camundongos e coelhos e, após 8 doses verificou-se que o imunógeno foi capaz de induzir anticorpos contra a porção extracelular do canal para sódio em ambos os animais.

Observamos que o soro anti-peptídeo alpha, produzido em camundongos, foi capaz de reconhecer o antígeno (Peptídeo alpha), e mesmo estando acoplado a uma proteína carreadora este antígeno desencadeou uma resposta imune não só contra o peptídeo carregado, mas também contra o peptídeo não carregado e em menor proporção à OVA (Figura 14). Estes resultados confirmaram a antigenicidade e imunogenicidade do peptídeo alpha.

Visto que o soro anti-peptídeo alpha foi capaz de reconhecer o antígeno, purificamos as imunoglobulinas a partir do soro de coelhos, com o objetivo de aumentar a especificidade dos ensaios. As IgGs foram capazes de reconhecer fortemente o peptídeo alpha acoplado à OVA e o peptídeo alpha não acoplado, nos ensaios de ELISA (Figura 15), confirmando sua imunogenicidade. É importante

ressaltar que a IgG anti-peptídeo alpha apresentou baixa reatividade frente à OVA, indicando que esta proteína carreadora não influenciou as respostas imunes apresentadas pelos animais.

A reatividade do peptídeo também foi testada pelo método de SPOT. Foram sintetizadas em uma membrana de celulose as sequências do peptídeo hidrofóbico, do peptídeo alpha e destas sequências em um sentido invertido. A sequência do peptídeo alpha reagiu fortemente com o anticorpo e uma reação de intensidade moderada foi observada para a sequência do peptídeo hidrofóbico. Não houve reação do anticorpo com as sequências invertidas, demonstrando a importância da sequência correta de aminoácidos para a interação com o anticorpo.

Posteriormente, o ensaio de ALA-Scan foi realizado para verificar a importância de cada resíduo de aminoácido para a ligação com o anticorpo. Foi observada apenas uma leve modificação quando um resíduo de leucina foi substituído por um resíduo de alanina na sequência do peptídeo alpha, que pode ser explicada por características similares apresentadas por estes dois aminoácidos.

A análise dos resultados demonstrou uma maior importância dos resíduos de prolina (P), treonina, leucina e fenilalanina (F) para a ligação com o anticorpo anti-peptídeo alpha, uma vez que, a troca sequencial dos resíduos de P, T, L e F por um resíduo de alanina (A) acarretou a perda de reatividade com o anticorpo (Figura 18). Além disso, estes resíduos mostraram-se altamente conservados entre as isoformas de canais para sódio.

Este estudo foi pioneiro em utilizar a técnica de SPOT para o mapeamento de sítios específicos do canal para sódio e na identificação de resíduos de aminoácidos críticos para a interação com o anticorpo.

Em um estudo de 2005, Chioni e colaboradores demonstraram a ligação de anticorpos anti-VGSC à células EBNA transfectadas com o canal para sódio  $Na_v1.5$  em ensaios de imunohistoquímica. Desta maneira, baseando-se neste estudo e com o objetivo de constatar a ligação de imunoglobulinas ao canal de sódio, neste trabalho utilizamos células HEK expressando o canal  $Na_v1.3$  como alvo de estudo.

A ligação da imunoglobulina anti-peptídeo alpha em toda a superfície das células HEK expressando o canal foi claramente demonstrada através de uma intensa fluorescência observada por microscopia confocal (Figura 19). Em contrapartida, não foi observada fluorescência quando estas mesmas células foram testadas com a imunoglobulina pré-imune. Estes resultados confirmam a hipótese de que a IgG, produzida contra um peptídeo que mimetiza um segmento do canal para sódio, se liga especificamente aos canais localizados na membrana celular das células HEK. A fim de excluir resultados falso-positivos, células HEK  $Na_v1.3$  foram ainda testadas com o anticorpo secundário, mas nenhuma reação foi observada.

As imunoglobulinas foram testadas, ainda, quanto a sua capacidade de se ligar a regiões do cérebro de camundongos, conhecidas por apresentar as isoformas  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  e  $Na_v1.6$ . Demonstramos mais uma vez a especificidade da IgG pelo canal para sódio em um ensaio de *Western blot*, através da detecção de uma forte banda, de aproximadamente 260kDa, em um extrato de proteína do córtex do cérebro de camundongos. Estes resultados confirmam a localização de canais para sódio, principalmente  $Na_v1.1$ , na região do córtex presente no SNC (Beckh, 1990; Trimmer e Rhodes, 2004; Oliva et al., 2012). Em contrapartida, não foram observadas bandas quando a membrana foi testada com a imunoglobulina pré-imune.

Observamos também que a IgG anti-peptídeo alpha reconheceu uma banda de aproximadamente 100kDa. Entretanto, não conseguimos identificar esta proteína reconhecida pela imunoglobulina.

Sabe-se que a homeostase das concentrações de sódio é de extrema importância, já que este íon é responsável pela iniciação e propagação dos potenciais de ação em células eletricamente excitáveis. É esperado que a ligação do anticorpo anti-peptídeo alpha ao canal para sódio altere o seu funcionamento, e interfira na sua homeostase. Uma grande variedade de neurotoxinas, entre elas as  $\alpha$ -toxinas de escorpião, são conhecidas por alterarem o funcionamento do canal para sódio, através da sua ligação ao sítio 3 (D.IV S3-S4 e D.I S5-S6) (Rogers et al., 1996; Bosmans e Tytgat, 2008; Wang et al., 2011).

Os efeitos principais das  $\alpha$ -toxinas são um retardamento notável na inativação dos canais e mínimas modificações na ativação do canal (Chen et al., 2005). A ligação da  $\alpha$ -toxina de escorpião ao sítio 3 retarda a inativação, impedindo o movimento para fora do segmento S4, do domínio IV, alteração conformacional necessária para a rápida inativação (Cestèle e Catterall, 2000).

Para verificar o efeito da ligação do anticorpo anti-peptídeo alpha aos canais  $Na_v1.3$  expressos em células HEK, ensaios de *patch clamp*, no modo *whole cell*, foram realizados. Para este ensaio foram utilizadas três concentrações de imunoglobulina 60nM, 6nM e 600pM e três da porção Fab, 20 $\mu$ M, 2 $\mu$ M e 200nM. Analisando os resultados preliminares obtidos podemos observar que mesmo utilizando uma pequena quantidade tanto de imunoglobulina (600pM) quanto da porção Fab anti-peptídeo alpha (200nM), a corrente de sódio em células HEK parece aumentar.

Por outro lado, a mesma concentração de IgG pré-imune parece não ter efeito sobre a corrente de sódio, sugerindo, a especificidade da ligação da IgG anti-imunógeno nos canais para sódio presentes na membrana celular das células HEK.

Não obtivemos nenhum gráfico da relação I-V na condição controle e sob ação das imunoglobulinas e, portanto, não podemos afirmar que a ativação e inativação obtidas com as IgGs se dá em potenciais mais hiperpolarizantes.

Curiosamente, observamos que os efeitos da ligação de  $\alpha$ -toxinas em canais para sódio, descritos em outros estudos, é bastante diferente do efeito da ligação das imunoglobulinas anti-peptídeo alpha, descrito neste trabalho. Apesar do sítio de ligação destas duas moléculas serem bastante próximos, foram observadas alterações eletrofisiológicas diferentes, sugerindo que a ligação de cada uma ocorra em diferentes resíduos de aminoácidos deste sítio.

Estudos nesta área apoiam a ideia de que o ácido glutâmico, E1613, presente no segmento extracelular S3-S4 do domínio IV está envolvido na preferência de ligação das  $\alpha$ -toxinas de escorpião em canais para sódio (Rogers et al., 1996; Bosmans e Tytgat, 2008; Wang et al., 2011). Um estudo com a neurotoxina de escorpião LqTx, mostrou que a substituição do E1613 por um resíduo de arginina ou histidina diminui dramaticamente a afinidade desta toxina pelo canal para sódio. Adicionalmente, foi identificado um segundo resíduo, de lisina (K1617), importante para a ligação da LqTx, através da substituição de cada resíduo de aminoácido por um resíduo de alanina, no *loop* S3-S4 (Rogers et al., 1996). No entanto, é descrito que diversas classes de  $\alpha$ -toxinas podem interagir de forma diferente com esta região do canal, de acordo com a superfície bioativa de cada toxina (Leipold et al., 2004).

Os resultados encontrados neste trabalho descrevem pela primeira vez a produção de anticorpos específicos contra um segmento extracelular comum a todos os subtipos do canal para sódio e mostram que o anticorpo anti-peptídeo produzido é capaz de se ligar e alterar o funcionamento do canal, além de ser também, uma ferramenta para estudos imunohistoquímicos de localização de tais canais em diferentes tecidos.



# CONCLUSÕES

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, desenvolvemos uma estratégia experimental eficaz para a produção de anticorpos contra sequências peptídicas dos canais para sódio, e pela primeira vez descrevemos um anticorpo anti-peptídeo dirigido contra uma região extracelular presente em todas as isoformas destes canais. A técnica de SPOT mostrou-se um método eficaz para o mapeamento de sítios específicos do canal para sódio e para a identificação de resíduos de aminoácidos críticos para a interação com o anticorpo. O conhecimento do mecanismo de interação dos anticorpos com o canal para sódio abre novas perspectivas para utilização do anticorpo, descrito neste estudo, em células vivas e em ensaios de competição com drogas e toxinas para determinação de sítios de ligação destas ao canal.

PERSPECTIVAS

## 7. PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho, pretendemos:

- Complementar os estudos imunohistoquímicos e eletrofisiológicos utilizando células HEK Na<sub>v</sub>1.3 e HEK 293;
- Identificar a proteína de 100kDa reconhecida no ensaio de *Western Blott*;
- Testar as imunoglobulinas produzidas, em células HEK transfectadas com outras isoformas do canal para sódio;
- Testar as imunoglobulinas produzidas, em células transfectadas com isoformas mutantes do canal para sódio;
- Produzir anticorpos monoclonais contra o peptídeo comum a todos os subtipos de canal para sódio;
- Testar a interferência na condutância aos íons sódio na presença dos anticorpos;
- Testar através de ensaios de competição, os anticorpos e diferentes neurotoxinas e seus efeitos no canal para sódio;
- Testar os efeitos dos anticorpos em células tumorais.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akopian AN, Silvilotti L & Wood JN. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage gated sodium channel expressed by sensori neurons. *Nature*, 379, 257-262.
- Barela JA, Waddy SP, Lickfett JG, Hunter J, Anido A, Helmers SL, Goldin AL & Escayg A. (2006). An epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A that decreases channel excitability. *J. Neurosci.*, 26, 2714-2723.
- Beckh S. (1990). Differential expression of sodium channel mRNAs in rat peripheral nervous system and innervated tissues. *FEBS Lett.*, 262, 317-322.
- Beneski DA & Catterall WA. (1980). Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 639-643.
- Bosmans F & Tytgat J. (2008). Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion  $\alpha$ -toxins. *Toxicon*, 49, 142-158.
- Burgess DL, Kohrman DC, Galt J, Plummer NW, Jones JM, Spear B & Meisler MH. (1995). Mutation of a new sodium channel gene, Scn8a, in the mouse mutant "motor endplate disease." *Nat. Genet.*, 10, 461-465.
- Cannon SC. (1996). Sodium channel defects in myotonia and periodic paralysis. *Ann. Rev. Neurosci.*, 19, 141-164.
- Catterall WA. (1977). Activation of the action potential  $\text{Na}^+$  ionophore by neurotoxins. An allosteric model. *J. Biol. Chem.*, 252, 8669-8676.
- Catterall WA. (1979). Binding of scorpion toxin to receptor sites associated with sodium channels in frog muscle. *J. Gen. Physiol.*, 74, 375-391.

- Catterall WA. (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 20, 15-42.
- Catterall WA & Risk M. (1981). Toxin T<sub>46</sub> from *Ptychodiscus brevis* (formely *Gymnodinium breve*) enhances activation of voltage-sensitive sodium channels by veratridine. *Mol. Pharmacol.*, 19, 345-348.
- Catterall WA. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26, 13-25.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP & Striessnig. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.*, 57, 411-425.
- Catterall WA, Cestéle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K & Scheuer T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49: 124-141.
- Catterall WA, Dib-Hajj S, Meisler MH & Pietrobon D. (2008). Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases. *The journal of neuroscience*, 28, 11768-11777.
- Catterall WA. (2010). Ion channel voltage sensors: structure, function and pathophysiology. *Neuron*, 67, 915-928.
- Catterall WA, Kalume F & Oakley J. (2010). Na<sub>v</sub>1.1 channels and epilepsy. *J. Physiol.*, 588, 1849-1859.
- Catterall WA. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The journal of physiology*, 590, 2577-2589.

- Cestèle S & Catterall WA. (2000). Molecular mechanism of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, 82, 883-892.
- Chen J, Tan ZY, Zhao R, Feng XH, Shi J, Ji YH. (2005). The modulation effects of BmK I, an alpha-like scorpion neurotoxin, on voltage-gated Na<sup>(+)</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.*, 390, 66–71.
- Chioni AM, Fraser SP, Pani F, Foran P, Wilkin G, Diss J & Djamgoz M. (2005). A novel polyclonal antibody specific for the Nav1.5 voltage-gated Na<sup>+</sup> channel 'neonatal' splice form. *Journal of Neuroscience methods*, 147, 88-98.
- Clamp M, Cuff J, Searle S & Barton G. (2004). The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*, 20, 426-427.
- Cox J, Reimann F, Nicholas A, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente E, Gorman S, Williams R, McHale D, Wood J, Gribble F & Woods G. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*, 444, 894-898.
- Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Escayg A, Wood PM, Meisler MH & Waxman SG. (1999). Coding sequence, genomic organization, and conserved chromosomal localization of the mouse gene SCN1A encoding the sodium channel Na<sub>v</sub>1.1. *Genomics*, 59, 309-318.
- Felipe A, Bielanska J, Comes N, Vallejo A, Roig S, Cajal R, Condom E, Hernández-Losa J & Ferreres JC. (2012). Targeting the voltage-dependent K<sup>(+)</sup> channels Kv1.3 e Kv1.5 as tumor biomarkers for cancer detection and prevention. *Curr. Med. Chem.*, 19, 661-674.



- Fertleman CR, Ferrie CD, Aicardi J, Bednarek N, Eeg-Olofsson O. (2007). Paroxysmal extreme pain disorder (previously familial rectal pain syndrome). *Neurology*, 69, 586-595.
- Goldin AL. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu. Rev. Physiol.*, 63, 871-894.
- Gordon D, Merrick D, Auld V, Dunn R, Goldin A, Davidson N & Catterall WA. (1987). Tissue-specific expression of the R<sub>I</sub> and R<sub>II</sub> sodium channel subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 8682-8686.
- Gordon D, Merrick D, Wollner DA & Catterall WA. (1988). Biochemical properties of sodium channel in a wild range of excitable tissues studied with site-directed antibodies. *Biochemistry*, 27, 7032-7038.
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., et al. (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol. Rev.*, 55, 583–586.
- Hartmann HA, Colom LV, Sutherland ML & Noebels JL. (1999). Selective localization of cardiac SCN5A sodium channels in limbic regions of rat brain. *Nat. Neurosci.*, 2, 593-595.
- Hodgkin AL & Huxley AF. (1952a). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *JPhysiol* 116, 473-496.
- Hodgkin AL & Huxley AF. (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *JPhysiol* 116, 449-472.

- Hodgkin AL & Huxley AF. (1952c). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *JPhysiol* 116, 497-506.
- Hodgkin AL & Huxley AF. (1952d). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *JPhysiol* 117, 500-544.
- Jiang QX & Gonen T. (2012). The influence of lipids on voltage-gated ion channels. *Current opinion in structural biology*, 22, 1-8.
- Karmazinova M & Lacinova L. (2010). Measurement of cellular excitability by whole cell patch clamp technique. *Physiol. Res.*, 59 (Suppl. 1), S1-S7.
- Kearney JA, Plummer NW, Smith MR, Kapur J, Cummins TR, Waxman SG, Goldin AL & Meisler MH. (2001). A gain-of-function mutation in the sodium channel gene *Scn2a* results in seizures and behavioral abnormalities. *Neuroscience*, 102, 307–317.
- Klugbauer N, Lacinova L, Flockerzi V, Hofmann F. (1995). Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO J.*, 14, 1084-90.
- Kullmann D. (2010). Neurological channelopathies. *Annu. Rev. Neurosci.*, 33, 151-172.
- Lai HC & Jan LY. (2006). The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7, 548-562.
- Lampert A, O'Reilly A, Reeh P & Leffler A. (2010). Sodium channelopathies and pain. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 460, 249-263.

- Laune L, Molina F, Ferrieres G, Villard S, Bes C, Rieunier F, Chardes T & Granier C. (2002). Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunol. Method*, 267, 53-70.
- Leipold E, Lu S, Gordon D, Hansel A, Heinemann SH. (2004). Combinatorial interaction of scorpion toxins Lqh-2, Lqh-3, and LqhalphalT with sodium channel receptor sites-3. *Mol. Pharmacol.*, 65, 685– 691.
- Martin-Eauclaire MF & Couraud F. (1992). Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms. In: Chang LW, Dyer RS (Eds.), *Handk. Neurotoxicology*, Marcel Dekker, New York, NY, 683–716.
- Merrifield, RB. (1969). Peptide synthesis: I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149.
- Morera M, Vargas G, Gonzáles C, Rosenmann E & Latorre R. (2007). Ion channel reconstitution. *Methods in molecular biology*, 400, 571-585.
- Noda M, Ikeda T, Kayano T, Suzuki H, Takeshima H, Kurasaki M, Takahashi H & Numa S. (1986). Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature*, 320, 188-192.
- Noda M, Suzuki H, Numa S & Stuhmer H. (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel. *FEBS Lett.*, 259, 213-216.
- Oliva M, Berkovic S & Petrou S. (2012). Sodium channels and the neurobiology of epilepsy. *Epilepsia*, 1-11.

- Onkal R & Djamgoz M. (2009). Molecular pharmacology of the voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. *European Journal of Pharmacology*, 625, 206-219.
- Payandeh J, Scheuer T, Zheng N & Catterall WA. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, 475, 353-358.
- Prevarskaya N, Skryma R & Shuba Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in molecular medicine*, 16, 107-121.
- Rehm H & Tempel BL. (1991). Voltage-gated K<sup>+</sup> channels of the mammalian brain. *FASEB Journal*, 5, 164-170.
- Rogers JC, Qu Y, Timothy NT, Scheuer T & Catterall WA. (1996). Molecular determinants of high affinity binding of  $\alpha$ -scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$  subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 15950-15962.
- Rubinstein ND, Mayrose I, Martz E & Pupko T. (2009). EpiToPIA: a web-server for predicting B-cell epitopes. *BMC Bioinformatics*, 10, 287.
- Savio-Galimberti E, Gollob MH & Darbar D. (2012). Voltage-gated sodium channels: biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Frontiers in pharmacology*, 3, 124.
- Schaller KL, Krzemien DM, Yarowsky PJ, Krueger BK & Caldwell JH. (1995). A novel, abundant sodium channel expressed in neurons and glia. *J. Neurosci.*, 15, 3231-3242.

- Stevens M, Peigneur S & Tytgat J. (2011). Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Frontier in pharmacology*, 2, 71.
- Stryer, L. et al. (2002). Canais e bombas de membrana. In: Stryer, L et al.. Bioquímica. Estados Unidos: W. H. Freeman and Company, 369-378.
- Tejedor FJ & Catterall WA. (1988). Site of covalent attachment of  $\alpha$ -scorpion toxin derivates in domain I of the sodium channel  $\alpha$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8742-8746.
- Think Peptides. Disponível em <<http://www.thinkpeptides.com/peptidedesign.html>>.  
Acesso em: 01 de outubro de 2012.
- Thomsen WJ & Catterall WA. (1989). Localization of the receptor site for  $\alpha$ -scorpion toxins by antibody mapping: Implications for sodium channel topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 10161-10165.
- Trimmer JS, Cooperman SS, Agnew WS & Mandel G. (1990). Regulation of muscle sodium channel transcripts during development and in response to denervation. *Dev. Biol.*, 142, 360-367.
- Trimmer JS & Rhodes KJ. (2004). Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annual Review of Physiology*, 66, 477-519.
- Yu FH & Catterall WA. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4, 207.
- Vacher H, Mohapatra DP & Trimmer JS. (2008). Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol. Rev.*, 88, 1407-1447.

Wang J, Yarov-Yarovoy V, Kahn R, Gordon D, Gurevitz M, Scheuer T & Catterall WA. (2011). Mapping the receptor site for  $\alpha$ -scorpion toxins on a Na<sup>+</sup> channel voltage sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 15426-15431.

Waxman SG. (2007). Channel, neuronal and clinical function in sodium channelopathies: from genotype to phenotype. *Nature neuroscience*, 10, 405-409.

Whitaker W, Faull R, Waldvogel H, Plumpton C, Emson P & Clare J. (2001). Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain. *Molecular brain research*, 88, 37-53.

World Intellectual Property Organization. Roques, E. (2007). Antibodies. WO 2007/023298 A2.

**ANEXO**

## 9. ANEXO

Em paralelo a realização desta dissertação, participei de um estudo sobre a identificação de mimotopos da mutalisina II, uma metaloproteinase do veneno da serpente *Lachesis muta*. Os dados deste trabalho foram compilados e publicados em 2011, na PEPTIDES, com o título “Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits”, Ricardo A. Machado de Avila, **Stephanie Stransky**, Mariana Velloso, Paula Castanheira, Francisco S. Schneider, Evanguedes Kalapothakis, Eládio F. Sanchez, Christophe Nguyen, Frank Molina, Claude Granier, Carlos Chávez-Olórtegui, em anexo.