

Éder Ricardo de Moraes

Efeito diferencial do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em correntes de sódio sensíveis e resistentes a tetrodotoxina em neurônios dos Gânglios da Raiz Dorsal de Ratos.

Dissertação submetida ao departamento
de Fisiologia e Biofísica do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Christopher Kushmerick

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lígia Araujo Naves

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, **José João**, homem íntegro, que me ensinou a trabalhar com afinco para alcançar os meus objetivos e à minha mãe, **Helena**, pessoa de garra e de uma generosidade imensurável.

AGRADECIMENTOS

Agradeço fundamentalmente a **Deus**, por permitir que eu tentasse novamente...

Aos meus queridos orientadores **Lígia Naves**, pela primeira oportunidade de realizar pesquisas no Laboratório de Eletrofisiologia Celular e **Christopher Kushmerick**, por não medir esforços para a conclusão do nosso trabalho.

À Professora **Maria da Glória Machado**, pela confiança em mim depositada ao me apresentar ao Laboratório de Eletrofisiologia Celular.

Ao Professor **Vicente de Paula** e Sra. **Maria das Graças**; aos amigos e ex-colegas **Valdenice Florêncio**, **Jussara Rocha** e **Robson Moraes**; aos ex-alunos da Escola Novaerense pela primeira experiência com a docência.

Ao meu irmão **Allen** e minha cunhada **Jamile**, por me presentear com o meu sobrinho e afilhado **João Marcus**.

Ao Professor e amigo **Márcio Marçal**, por todas as oportunidades em Saúde Ocupacional.

Aos meus queridos **tios** e **primos**, pela força e encorajamento constantes. À **Vovó Áurea** e **Vovó Heroína**, pelas orações!

Ao Dr **Norberto Sá**, Dra **Cibelle Vasconcellos**, Dr **Marco Antônio Castro**, Enf^a **Mirtes de Sena**, Dra **Christina Chiavegatto**, amigos e ex-colegas do Hospital Nossa Senhora do Carmo pela credibilidade e generosidade.

À **Rogéria Vieira** pelo auxílio constante durante a graduação. Ao **Paulo Motta**, **Thiago** e **Luccas Vieira Motta**, por tornarem a permanência em Caratinga menos penosa.

Aos amigos **Michelle Malatesta**, **Sabrina** e **Márvio Silveira**, **Elma Vieira**, **Thais Andrade**, **Melissa Reis**, **Ana Paula Silva**, **Marcus Alcântara**, **Cristina Cota**, **Alessandro de Barros**, **Sérgio Santos**, **Breno Sales**, **Luciano Rosa**, **Júnia**

Freitas, Carolina Soares, Daniela Sá, Fabiano Soares, Fabiano Batista, Emerson Martins, Sabrina Lima, Leonardo Alvisi, Fernanda Corrêa, Josiane Frigini, Josiane Giacomini, Kamilla Sartore, Karla Garonci, Letícia Brandão, pela amizade que resistiu ao tempo e à minha ausência por longos períodos.

À Sra. **Aldatides Pinheiro**, pelo carinho. Ao amigo e irmão **Juliano Pinheiro Scofield**, companheiro de todas as horas e situações.

Aos amigos de longa data **Fernando, Luciana e Laura Carvalho, Emanuela Duarte, Fabiano Nunes, Rodrigo “Mamão” Santos, Douglas Vidal, Djaine “Chaveiro” Costa, Patrícia Sartori** pelo companheirismo em cada fase da minha vida.

Aos Professores **Miguel Lopes, Leida Botion, Silvia Guatimosim, Maria Aparecida Vieira e Jerome Baron** pelas conversas que sempre renderam oportunidades de aprendizado.

À família Eletrocel: **Paula Scalzo, Márcia Alves, Marina Ladeira, Mariana Rosa, Mariana Gaviolli, Pedro Almeida, Fabrício Peixoto, Enéas Gomes, Aline Alves, Juliana Martins, Vitor Xavier, Leonardo Greco, Jussara Resende, Letícia Alberto, Verônica Morini, Naiara Silveira, Daniella Almeida**, por fazerem do convívio diário um prazer.

Aos colegas **Maira Lima, Gabriel Perfeito, Vinicius Cota, Daniela Fontes, Suellem Capettini, Patrícia Guidine, Luciana Drumomond (NNC); Carolina Horta, Aline Costa, Rafael Resende (Farmacologia); Paula Campos (Angiogênese); Ana Paula Corrêa, Rubens Neto (Sinaptossomas); Diogo Galan, Fernando Oliveira, Eva Pfannes, Rafaela Dantas, Fabiana Vasconcelos, Carolina Gioda, Hugo Duarte, Sandra Lauton, Phillipe Pessoa, Tales Prímola, Izabella Araújo (Lamex); Kênia Pompermayer, Kátia Silveira, Lucio Diniz, Viviane Portella, Lílian Pacheco e Ana Paula Araújo (Renal); Cristina Martins, Célio de Castro, Ana Cristina, Alessandra Hübner, Fabiana Andrade, Monalise Costa, Daniela Valadão**

(Neurofarmacologia); Adaliene Versiane, Jonas Baêta, Laura Porto (Metabolismo Celular) por ajudarem direta ou indiretamente.

À **Roseli Martins**, por todos os seus conselhos e experiência de vida que tem o prazer em compartilhar, além de ter ombros e ouvidos sempre à disposição.

Ao Professor **Evanguedes Kalapothakis**, por fornecer os venenos utilizados neste trabalho.

Aos Professores **Paulo Beirão e Jader Cruz**, por disponibilizarem materiais e equipamentos primordiais para a execução e conclusão deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório **José Roberto - Zezé (Hipertensão), Adriane Pereira (Neurofarmacologia), José Eustáquio - Taquinho (NNC) e Darci Santos**, por encurtarem os caminhos dentro do ICB.

À **Celinha**, pela eficiência e presteza.

À **Anita Oliveira**, pelo carinho, paciência e generosidade.

À **Flaviana Fernandes**, pela alegria contagiante.

À **Priscila Silveira**, pela amizade amadurecida a cada dia.

Ao **Ricardo Lima**, meu irmão, pela oportunidade de crescimento que o convívio diário proporciona.

Ao **Adriano Silva**, pelos bons conselhos.

À **Érica Guilhen**, pelo otimismo!

À **Flaviana Contadini**, pela credibilidade e confiança.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ATP: adenosina trifosfato.

Ca_v: canais para cálcio ativados por voltagem

DRG: gânglios da raiz dorsal (do inglês *Dorsal Root Ganglions*)

GMP: guanosina monofosfato

K_v: canais para potássio ativados por voltagem

Na_v: canais para sódio ativados por voltagem

STX: saxitoxina

TTX: tetrodotoxina.

TTX-R: canais para sódio ativados por voltagem resistentes a tetrodotoxina

TTX-S: canais para sódio ativados por voltagem sensíveis a tetrodotoxina

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Solução de Ringer Mamífero, sem adição de cálcio e magnésio.	28
Tabela 2: Solução de Pipeta.	33
Tabela 3: Solução Externa 1.	34
Tabela 4: Solução Externa 2.	35
Tabela 5: Componentes rápidos e lentos da inativação da corrente de sódio.	48
Tabela 6: Efeito do veneno de <i>Tityus bahiensis</i> em parâmetros da ativação da corrente de sódio.	55
Figura 1: Organização das subunidades dos canais para sódio.	15
Figura 2: Grau de similaridade entre as seqüências de aminoácidos de canais para sódio ativados por voltagem (Na_v).	18
Figura 3: Eficiência do sistema de perfusão celular.	39
Figura 4: Curso temporal da troca de soluções.	41
Figura 5: Corrente de cauda.	43
Figura 6: Correntes de sódio em neurônios DRG e sua modulação pelo veneno de <i>Tityus bahiensis</i>	45
Figura 7: Comparação da cinética de inativação.	49
Figura 8: Efeitos do veneno de <i>Tityus bahiensis</i> versus tempo.	51
Figura 9: Relação dose-resposta do efeito do veneno de <i>Tityus bahiensis</i>	53
Figura 10: Dependência de voltagem da ativação da corrente de sódio.	56

Figura 11: Efeito do pré-pulso despolarizante.	58
Figura 12: Dependência de voltagem no estado-estacionário da inativação rápida..	60
Figura 13: Relação I-V na presença de veneno de <i>Tityus bahiensis</i> e TTX.	63
Figura 14: Efeitos do veneno de <i>Tityus bahiensis</i> versus tempo em canais para sódio resistentes a tetrodotoxina.	64
Figura 15: Dependência de voltagem da ativação da corrente de sódio em canais para sódio resistentes a tetrodotoxina.	66
Figura 16: Dependência de voltagem no estado estacionário da inativação rápida do canal para sódio resistente a tetrodotoxina na presença do veneno de <i>Tityus bahiensis</i>	67
Figura 17: Alinhamento dos aminoácidos do sitio 3.	71

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
5. RESULTADOS.....	37
6. DISCUSSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

RESUMO

Verificamos neste trabalho os efeitos do veneno do escorpião brasileiro *Tityus bahiensis* sobre correntes de sódio em corpos celulares de neurônios dos gânglios da raiz dorsal (DRG) submetidos a registros eletrofisiológicos na modalidade *whole-cell patch clamp*. Em condições de controle, a inativação da corrente de sódio a 0 mV exibiu dois componentes cinéticos, um rápido ($\tau = 2,15 \pm 0,18$ ms) e um mais lento ($\tau = 13,19 \pm 3$ ms). Em condições experimentais, quando utilizamos o veneno de *Tityus bahiensis* numa diluição de 1:500 (concentração da proteína de 5,74 $\mu\text{g/mL}$), houve uma redução na fração da corrente que se inativa rapidamente (de 80 ± 14 para 60 ± 9 %). O aumento na constante de tempo que se inativa rapidamente não foi alterado significativamente ($\tau = 2,37 \pm 0,4$ ms), mas houve um incremento na constante de tempo da inativação lenta ($25,74 \pm 3,18$ ms). Houve, ainda, um aumento na fração da corrente que se inativa lentamente (de $14,1 \pm 0,6$ para $36 \pm 0,4$ %) e surgimento de um componente persistente da corrente que não inativou mesmo durante pulsos despolarizantes longos (50 a 100 ms). Adicionalmente, na presença do veneno de *Tityus bahiensis* em condições experimentais, houve o surgimento de um componente que ativa rapidamente as correntes de sódio, independentemente da presença de um pré-pulso com potencial intensamente despolarizante (+50 mV). Nossos resultados concordam com Campos *et al.* (2007) e mostram que um pré-pulso não tem efeito nas correntes de sódio geradas, diferentemente da hipótese levantada por Cestèle *et al.* (2006). Na tentativa de constatar sobre quais isoformas de canais para sódio o veneno de *Tityus bahiensis* age, utilizamos tetrodotoxina (0,25 - 1 μM) com a finalidade de isolar farmacologicamente as correntes de sódio resistentes a tetrodotoxina, submetê-las a pulsos despolarizantes a 0 mV e verificar o efeito do veneno na cinética das suas correntes. O veneno não foi capaz de gerar efeitos nestas condições experimentais. Assim como os venenos de outros escorpiões, o veneno de *Tityus bahiensis* contém toxinas capazes de interferir na cinética de ativação e inativação dos canais para sódio sensíveis à tetrodotoxina, realizando ações típicas de toxinas de escorpião do tipo α e β .

ABSTRACT

In this study, we tested the effects of *Tityus bahiensis* scorpion venom on sodium currents recorded from the cell bodies of rat dorsal root ganglion neurons using the whole-cell patch clamp technique. In control conditions, sodium current inactivation at 0 mV exhibited two kinetic components, one fast ($\tau = 2.15 \pm 0.18$ ms) and one slow ($\tau = 13.19 \pm 3$ ms). In the presence of *Tityus bahiensis* venom at a dilution of 1:500 (concentration of 5.74 $\mu\text{g/mL}$), there was a decrease in the fraction of current comprising the fast component of inactivation (from 80 ± 14 to 60 ± 9 %). The fast time constant of inactivation was not altered significantly ($\tau = 2.37 \pm 0.4$ ms), but there was an increase in time constant of slow inactivation ($\tau = 25.74 \pm 3.18$ ms). In addition, there was an increase in the fraction of current that inactivated slowly (from 14.1 ± 0.6 to 36 ± 0.4 %), and the appearance of a persistent component of current that did not inactivate even after long depolarizations (50 – 100 ms). Additionally, in the presence of *Tityus bahiensis* venom in experimental conditions there was a very fast component of activation which appeared independently of the presence of a depolarizing pre-pulse (+50 mV). Our results thus agree with those obtained by Campos *et al.* (2007), and show that a pre-pulse is not necessary for effects on the sodium channel, different from the hypothesis presented by Cestèle *et al.* (2006). In an attempt of probe which sodium channels isoforms the *Tityus bahiensis* venom act upon, we used tetrodotoxin (0.25 - 1 μM) in order to isolate pharmacologically tetrodotoxin-resistant sodium currents and submitted these currents to depolarizing pulses to 0 mV and verified the effect of the venom on currents kinetic. Under these experimental conditions, the venom did not produce any effects. Therefore like the venom of the others scorpion, *Tityus bahiensis* venom contain toxins able to interfere in the kinetics of activation and inactivation of tetrodotoxin-sensitive sodium channels, resulting in alterations typical of α - and β - type toxins.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CANAIS IÔNICOS

Os canais para íons são poros constituídos por proteínas integrais presentes nas membranas celulares e representam elementos fundamentais para o funcionamento das células excitáveis, tais como: neurônios, miócitos e células secretoras (Hille, 2001). Estes poros protéicos são responsáveis por mediar o transporte seletivo e rápido de íons através da membrana das células, e desta forma estão relacionados a diversas funções fisiológicas (Terlau e Stühmer, 1998). A membrana plasmática atua como uma barreira separando os meios intra e extracelular, de tal forma que a concentração iônica dentro da célula pode ser mantida em níveis consideravelmente diferentes da concentração de íons dos fluídos extracelulares. Os canais geram permeabilidade seletiva na membrana para determinados íons. A combinação de diferenças nas concentrações iônicas e permeabilidade seletiva mediada por canais resultam na diferença de potencial elétrico entre o citoplasma e o meio externo e um gradiente eletroquímico através da membrana plasmática para cada espécie iônica. Células usam esses gradientes eletroquímicos para várias funções celulares, incluindo a geração e propagação de potenciais de ação (Goldin, 1995; Goldin *et al.*, 2000).

Os canais iônicos podem ser divididos em três grandes grupos, tendo como base o estímulo mais importante para sua ativação. O primeiro grupo inclui os canais que são ativados por ligantes intracelulares, tais como: íons cálcio, ou os metabólicos ATP, AMPc ou GMPc, incluindo, por exemplo, os canais para potássio e cloreto ativados por cálcio. Outro grupo inclui canais que são ativados por ligantes extracelulares como os receptores para neurotransmissores e os canais sensíveis a ácido. Um terceiro grupo é constituído por canais que são ativados pela alteração no potencial de membrana e eles são descritos como canais ativados por (ou dependentes de) voltagem. Os canais ativados por voltagem exibem seletividade para um determinado íon fisiológico (por exemplo, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), e são nomeados de acordo com esta seletividade (“canal para Na^+ ”, “canal para K^+ ”, etc). O principal papel fisiológico destes canais é o seu envolvimento na geração de sinais

elétricos ou químicos (no caso de canais para Ca^{2+}) nas células (Terlau e Stühmer, 1998).

1.2. CANAIS PARA SÓDIO

Há duas classes gerais de canais iônicos seletivos a sódio em humanos. A primeira classe é composta por canais para sódio epiteliais (ENaCs – do inglês **E**pithelial **Na**⁺ **C**hannels) que facilitam o fluxo de sódio através da monocamada da membrana epitelial. Estes canais não são regulados pelo potencial de membrana, mas sim por outros mecanismos tais como a fosforilação, a presença de fosfolipídios aniônicos e o processamento de domínios extracelulares por proteases específicas. (Hughey *et al.*, 2003 e Diakov e Korbmacher, 2004).

A segunda classe é composta pelos canais para sódio ativados por voltagem. Estes canais passam transitoriamente pelo estado ativado, ou seja, o estado que conduz íons em resposta à despolarização da membrana que os contém. Logo após a sua ativação, estes canais passam para um estado não-condutor chamado “inativado”. Desta forma, ativação destes canais conduz a uma despolarização transitória da membrana plasmática (revisado por Pearce e Kleyman, 2007).

1.3. CANAIS PARA SÓDIO ATIVADOS POR VOLTAGEM

Canais para sódio ativados por voltagem são responsáveis por responder a alterações no potencial de membrana e com isto, gerar e propagar os potenciais de ação em células excitáveis, incluindo as células nervosas, musculares e neuroendócrinas (Catterall *et al.*, 2005).

A estrutura dos canais para sódio é semelhante à estrutura dos canais para cálcio, ambos dependentes de voltagem. A principal subunidade do canal, chamada α , é formadora do poro condutor e possui aproximadamente 260kDa. A subunidade α de canais para sódio e cálcio apresenta-se em quatro módulos simétricos (chamados domínios), que sofrem mudanças conformacionais em resposta a alterações no potencial de membrana (Catterall *et al.*, 2002). Estudos que correlacionam estrutura e função têm mostrado a importância de várias partes da subunidade α (Figura 1). Alças presentes em cada um dos quatro domínios se juntam para formar o poro, cuja

constituição central determina as propriedades de seletividade e condutância do canal. Uma parte desse poro, a região do “segmento P”, exibe refinada conservação entre canais de mesma seletividade, mas não entre canais com diferentes seletividades. Canais para sódio existentes em diversas espécies como águas-vivas, enguias, drosófila e humanos têm segmentos P muito semelhantes, e mutações nessa região alteram a seletividade (Heinemann *et al.*, 1992), sugerindo que o segmento P determina, pelo menos parcialmente, a seletividade do canal. Além disso, a estratégia geral da comporta de ativação é altamente conservada: o quarto segmento transmembrana (S4), dotado de resíduos positivamente carregados move-se para fora em resposta à despolarização (Kontis *et al.*, 1997; Mitrovic *et al.*, 1998). O movimento do segmento S4 dos domínios I, II e III está associado com a ativação do canal (Stühmer *et al.*, 1989), enquanto o segmento S4 do domínio IV está relacionado com a inativação do canal (Chanda e Bezanilla, 2002).

Além das subunidades α , existem polipeptídios auxiliares que são multifuncionais e são designados subunidades β (Sharkey *et al.*, 1984). Elas modulam as propriedades biofísicas das subunidades α (Patton *et al.*, 1994), e regulam o nível da expressão deste canal na membrana plasmática; funcionam como molécula para adesão de células, permitindo interações com a matriz extracelular; estão envolvidas na regulação da migração e agregação celular; além de interagir com o citoesqueleto (Isom, 2002). A modulação nas subunidades α pelas subunidades β é manifestada de diversas formas, como por exemplo, na cinética e na dependência de voltagem da ativação e inativação (Patton *et al.*, 1994). Além disso, estudos em canais para potássio têm mostrado que suas subunidades β alteram sua sensibilidade às toxinas (Dworetzky *et al.*, 1996).

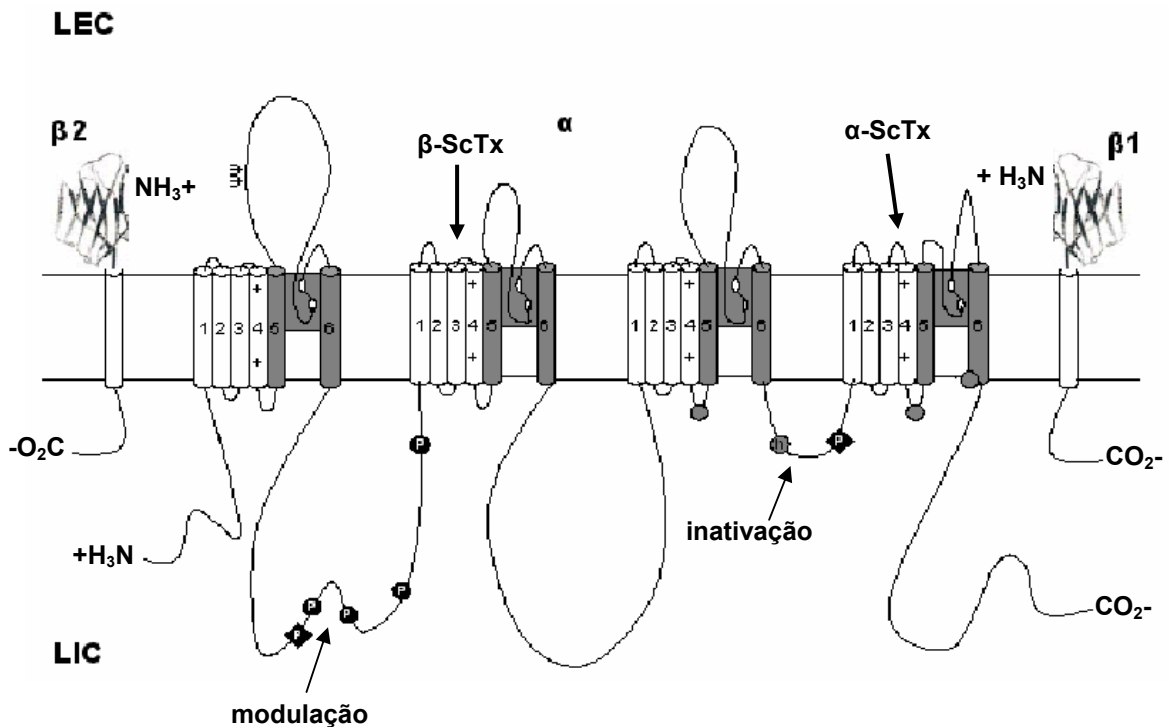


Figura 1: Organização das subunidades dos canais para sódio.

Estruturas primárias das subunidades dos canais iônicos ativados por voltagem. LEC representa o Líquido Extracelular e LIC, o Líquido Intracelular. Os cilindros representam os segmentos α -helicoidais. As linhas cheias representam as cadeias polipeptídicas de cada subunidade com um tamanho aproximadamente proporcional para o número de resíduos de aminoácidos nos subtipos de canais para sódio cerebrais. Ψ , sítios de provável glicosilação. P, sítios de demonstrada fosforilação pela proteína cinase A (círculos) e proteína cinase C (diamantes). Sombreado, alinhamento dos segmentos S5-P-S6. Nesta região estão localizados anéis brancos externos (constituídos pelos aminoácidos EEDD) e internos (pelos aminoácidos DEKA) que formam o filtro de seletividade iônica e o sítio de ligação da tetrodotoxina. ++, sensores de voltagem S4; h no círculo sombreado, partícula de inativação na alça de inativação da comporta; círculos abertos, sítios implicados na formação do receptor da comporta de inativação. α -ScTx indica o sítio de ligação da toxina- α de escorpião (alça extracelular que liga o segmento S3 ao segmento S4 do domínio IV). β -ScTx indica o sítio de ligação da toxina- β (alça extracelular entre S3 e S4 do domínio II). Esta figura foi baseada em dados de Catterall (2000).

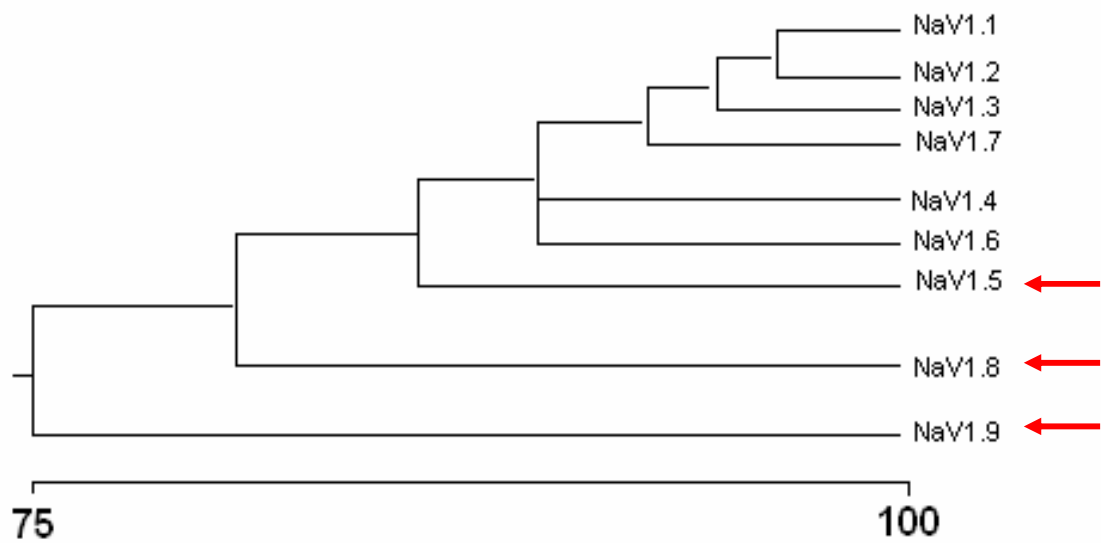
Canais para sódio têm papel essencial na geração dos potenciais de ação. Em repouso, estes canais estão, na maioria, fechados. Sob a despolarização da

membrana, eles se sujeitam a mudanças conformacionais que os convertem em uma configuração aberta. Quando abertos, eles conduzem seletivamente íon sódio (a seletividade relativa entre sódio: cálcio: potássio é tipicamente da ordem de 1: <0,1: 0,05 - dados de miócito esquelético de rã), numa velocidade elevada, da ordem de 10^6 íons/s (Hille, 2001). Um aumento na condutância ao sódio promovido pela abertura de alguns canais para este íon deflagra uma despolarização, e essa aumenta a probabilidade de outros canais se abrirem. Devido a este ciclo, uma despolarização modesta pode desencadear uma despolarização progressivamente maior, deflagrando um potencial de ação.

Devido ao fenômeno da inativação, a condutividade dos canais para sódio durante um potencial de ação é transitória. Na inativação, porções citoplasmáticas do canal ocluem o seu poro resultando em estado não condutor, o que permite que se estabeleça a fase de repolarização da membrana (Hille, 2001) e conseqüentemente o seu retorno ao potencial de repouso (Anderson *et al.*, 2005). O estado inativado é distinto do estado fechado, e a volta para o estado fechado acontece à medida que a inativação é removida. Dessa forma, a inativação contribui para os períodos refratários (intervalos de tempo imediatamente após um potencial de ação nos quais um neurônio é menos excitável), e assim determina a freqüência máxima de potenciais de ação (Leão *et al.*, 2005). Como as informações no sistema nervoso são codificadas pela freqüência de potenciais de ação, a cinética e a dependência de voltagem da inativação são parâmetros importantes para entender as funções fisiológicas e patológicas dos canais para sódio dependentes de voltagem. Como serão descritas abaixo, as várias isoformas de canais têm parâmetros de inativações distintos, de forma que o fenótipo eletrofisiológico de um neurônio é determinado pelo(s) tipo(s) de canal(is) para sódio que ele expressa.

Goldin *et al.*, (2000) propuseram uma nomenclatura padronizada para canais para sódio ativados por voltagem. Esta nomenclatura seguiu o modelo já existente para canais para potássio (Chandy, 1991). Ela utiliza um sistema numérico para definir as subfamílias e os subtipos baseados na similaridade entre as seqüências de aminoácidos dos canais. O nome consiste do símbolo químico do principal íon

permeante (Na), e com o principal regulador fisiológico (voltagem) indicado como um subscrito (Na_V). O número seguinte ao subscrito indica o gene da subfamília (normalmente Na_V1), e o número seguinte ao ponto decimal identifica a isoforma específica do canal (por exemplo, $\text{Na}_V1.1$). A figura 2 mostra a porcentagem da identidade da seqüência de aminoácidos das 9 isoformas de canais para sódio ativados por voltagem.



Identidade da seqüência de aminoácidos (%)

Figura 2: Grau de similaridade entre as seqüências de aminoácidos de canais para sódio ativados por voltagem (Na_v).

Seqüência de similaridade de aminoácidos e relação filogenética das subunidades α de canais para sódio ativados por voltagem. Comparação da identidade de aminoácidos dos canais para sódio Na_v1.1 - Na_v1.9 de rato. As isoformas identificadas pelas setas vermelhas são resistentes a tetrodotoxina (modificado de Catterall *et al.*, 2002).

1.4. UTILIZAÇÃO DE TOXINAS NO ESTUDO DE CANAIS PARA SÓDIO

Existem várias toxinas que agem em diferentes componentes funcionais do canal para sódio. Uma classe, a dos “modificadores da ativação e inativação” (do inglês *gating modifiers*), que inclui a batracotoxina, brevetoxina, ciguatoxina e toxinas de escorpiões e anêmonas marinhas, altera a dependência de voltagem e a cinética de ativação e inativação do canal. Uma segunda classe muito importante é formada pelos “bloqueadores de poros” (do inglês *pore blockers*), como é o caso da tetrodotoxina (TTX), da saxitoxina (STX), e das μ -conotoxinas. Essas toxinas obstruem o poro do canal ao se ligarem a ele. (Catterral *et al.*, 1992; Cestèle e Catterral, 2000). Evidências sugerem que o sítio da TTX e da STX (ambas positivamente carregadas) localiza-se próximo ao orifício externo do canal, numa região contendo grupos carregados negativamente. A ligação é inibida por agentes carboxi-modificadores, assim como por cátions monovalentes, íons metálicos bivalentes e prótons (Terlau *et al.*, 1991).

Os canais para sódio sensíveis a tetrodotoxina (TTX-S) presentes em neurônios são bloqueados por concentrações nanomolares de tetrodotoxina. Segundo Elliott e Elliott (1993), uma concentração de 100 nM de TTX é suficiente para bloquear 97% das correntes TTX-S. Estes canais tendem a ter um baixo ponto médio para ativação (entre -55 e -40 mV) e sua ativação e inativação acontecem com cinéticas relativamente rápidas. A dependência de voltagem da inativação desses canais é tal que aproximadamente 50% destes canais estão disponíveis para ativação a -65 mV, um valor que é próximo ao potencial de repouso de neurônios (Ogata e Tatebayashi, 1993).

Existem também canais para sódio resistentes a tetrodotoxina (TTX-R), representados pelas isoformas Na_v1.5, Na_v1.8 e Na_v1.9 (Rush *et al.*, 2007). Trabalhos realizados por Satin *et al.* (1992) têm demonstrado que um único aminoácido na posição 374 desta proteína (previsto a fazer parte da alça do poro do domínio I) desenvolve um importante papel na sensibilidade a TTX. Em canais sensíveis a TTX, o aminoácido que ocupa a posição análoga (baseado no alinhamento das seqüências) é a fenilalanina ou tirosina, mas em canais TTX-R o

aminoácido é a cisteína ou a serina (Satin *et al.*, 1992; Akopian *et al.*, 1996). Esta diferença é importante para a ligação de TTX porque a mutação C374Y aumenta dramaticamente a afinidade de canais $\text{Na}_v1.5$ pela TTX (Satin *et al.*, 1992). No texto abaixo, serão considerados canais TTX-R quando forem resistentes a tetrodotoxina em concentrações superiores a 10 μM . Estes canais são divididos em três classes de correntes iônicas tomando como base suas propriedades biofísicas.

Uma dessas classes, que agrupa correntes TTX-R rápidas (Scholz *et al.*, 1998), apresenta propriedades biofísicas semelhantes às das correntes TTX-S, com um baixo ponto médio de ativação e velocidades de ativação e inativação relativamente rápidas. Vários estudos têm mostrado que estas classes de correntes apresentam propriedades biofísicas e farmacológicas compatíveis com as correntes geradas por canais $\text{Na}_v1.5$ (Lai *et al.*, 2004).

Outra classe de correntes TTX-R, que tem sido referida como TTX-R1, exibe propriedades biofísicas bem distintas das correntes TTX-S (Ogata e Tatebayashi, 1993, Rush *et al.*, 1998). O ponto médio da ativação dessa corrente é alto (mais positivo que -36mV). Além disso, a cinética da ativação e inativação dessas correntes é relativamente lenta, mas essa se recupera da inativação rapidamente (Ogata e Tatebayashi, 1993). Pelo fato dessas correntes continuarem disponíveis para a ativação durante despolarização sustentada de membrana e se recuperarem rapidamente da inativação com hiperpolarização da membrana, essas correntes podem sustentar atividade enquanto outros subtipos de canais estão inativados (Elliott e Elliott, 1993). Existem evidências que sugerem que canais $\text{Na}_v1.8$ são isoformas responsáveis pela corrente TTX-R1 (Rush *et al.*, 1998)

Existe ainda uma outra classe de correntes TTX-R. Essas correntes têm características biofísicas peculiares comparadas às outras famílias de canais para sódio ativados por voltagem. Elas apresentam um ponto médio de ativação muito baixo (entre -90 e -70 mV) e uma curva de inativação no estado estacionário com um ponto médio em valores próximos a -44 mV (Cummins *et al.*, 1999). Essas duas propriedades geram corrente persistente que pode contribuir para a determinação do potencial de repouso e para a despolarização associada a estímulos sublimiáres

(Herzog *et al.*, 2001). A cinética de ativação desta corrente é muito lenta, tornando improvável que contribua para a despolarização rápida do potencial de ação. Devido à sua cinética lenta, essa corrente ativa somente na fase de repolarização do potencial de ação, e dessa forma pode prolongar essa fase. Vários dados sugerem que os canais $Na_v1.9$ são os responsáveis por essa corrente persistente porque (a) há uma grande correlação entre as propriedades de neurônios que expressam a corrente persistente e aquelas que expressam $Na_v1.9$ (Fjell *et al.*, 2000 e Cummins *et al.*, 1999), (b) esta corrente é detectável em neurônios dos gânglios da raiz dorsal (do inglês DRG – **D**orsal **R**oot **G**anglions) de camundongos $Na_v1.8$ *knockout*, e (c) a seqüência de $Na_v1.9$ prediz um canal que seja resistente a TTX (Dib-Hajj *et al.*, 1998 e Tate *et al.*, 1998).

Canais TTX-R têm importante papel fisiológico nos DRG. Neurônios dos DRG expressam uma variedade de isoformas de canais para sódio, permitindo um preciso controle da excitabilidade celular (Rush *et al.*, 2007). Os DRG são estruturas que agrupam os corpos celulares dos neurônios que transmitem vários tipos de informações sensoriais da periferia para a medula espinhal. Estes neurônios constituem uma população física e funcional heterogênea, com os corpos celulares em ratos adultos variando de tamanho entre 20 e 50 μ m de diâmetro. Nos últimos anos tem aumentado a aceitação de que células de diferentes tamanhos e de diferentes modalidades sensoriais expressam variedades de canais iônicos distintos, incluindo subtipos de canais para sódio (Kostyuk *et al.*, 1981). Essas células expressam correntes de sódio TTX-S e TTX-R (Zhou e Zhao, 2000), em diferentes proporções dependendo basicamente do diâmetro do corpo celular, mas os papéis desses dois tipos de corrente na eletrofisiologia celular de neurônios sensoriais ainda não estão completamente elucidados.

A ausência de bloqueadores específicos para os diferentes canais TTX-R tem impedido o progresso no entendimento de suas funções celulares, e tem incentivado a sua procura. O interesse geral é ilustrado por um recente trabalho publicado por Wang *et al.*, (2006), que descreve um novo conopeptídeo, a μ -conotoxina SIIIA, do caramujo *Conus striatus*, que inibe canais TTX-R e não TTX-S. Infelizmente, ainda

não se sabe qual é a seletividade dessa toxina entre as várias isoformas de canal TTX-R ou entre os canais para sódio e os demais canais dependentes de voltagem.

1.5. SÍTIOS PARA A LIGAÇÃO DE TOXINAS ESCORPIÔNICAS EM CANAIS PARA SÓDIO.

Dos seis sítios de ligação para as toxinas descritos até hoje em canais para sódio, chama-nos a atenção dois sítios relacionados à ligação de toxinas escorpiônicas.

No sítio 3, que compreende a alça extracelular entre os segmentos S3 e S4 do domínio IV, ligam-se toxinas do tipo α de escorpião, além de toxinas de anêmonas e de algumas toxinas de aranha (Catterall, 1980). Essas toxinas inibem a inativação dos canais para sódio (Lazdunski, *et al.*, 1986; Meves *et al.*, 1986).

O sítio 4 localiza-se na alça compreendida entre os segmentos S3 e S4 do domínio II, onde se ligam toxinas escorpiônicas do tipo β . De la Vega e Possani (2007) propõem um modelo para explicar a ação deste tipo de toxina nos canais para sódio, mais especificamente nos sensores de voltagem do segmento S4. A hipótese destes autores é a de que a toxina se liga ao sensor de voltagem acima citado promovendo um travamento deste sensor em um estado pré-ativado. Uma vez pré-ativado, uma segunda despolarização de menor amplitude seria capaz de abrir o canal, permitindo que este canal seja ativado em potenciais mais negativos do que acontece na ausência da toxina.

Segundo os mesmos autores, os venenos de escorpiões são compostos por quantidades consideráveis de peptídeos que constituem neurotoxinas de cadeias longas (58-76 resíduos de aminoácidos, estabilizados por quatro pontes dissulfeto). A toxicidade destes venenos constitui um preocupante problema de saúde pública em nosso país, uma vez que os escorpiões cobrem uma vasta área territorial (Becerril, *et al.*, 1996).

As toxinas de escorpião que atuam em canais para sódio de mamíferos podem ser divididas em α - ou β -toxinas. O efeito básico de cada toxina atribuído a elas consiste no local e no efeito causado por sua ligação em diferentes sítios do canal (para

revisão ver De la Vega e Possani, 2007), sendo suas respectivas funções também distintas. Como já descrito anteriormente, enquanto as toxinas- α se ligam aos canais para sódio inibindo sua inativação através do sítio 3, as toxinas- β se ligam ao sítio 4, afetando sua ativação.

2. JUSTIFICATIVA

Toxinas produzidas por plantas e animais têm desenvolvido importantes papéis no estudo de todos os canais iônicos ativados por voltagem (Hille, 2001). Isto é especialmente verdade para canais para sódio nos quais tetrodotoxina, saxitoxina, e toxinas de escorpiões foram essenciais para a definição da sua natureza molecular, inicialmente em enguias (Noda *et al.*, 1984) e posteriormente em ratos (Hartshorne e Catterall, 1984). Algumas diferentes neurotoxinas e drogas têm sido mostradas como sendo capazes de agir na subunidade α dos canais para sódio causando diversos efeitos que podem variar da ativação ao bloqueio. Até o momento, contudo, sabe-se pouco sobre agonista ou antagonista com especificidade para diferentes subunidades Na_V . Ao contrário, antagonistas seletivos para canais para cálcio têm sido descritos para a maioria das suas subunidades, sendo assim usados para determinar o papel específico dos tipos de canais em um dado processo fisiológico.

Toxinas são importantes não só no estudo da fisiologia de canais, mas também como potenciais agentes terapêuticos baseados na sua capacidade de regulá-los. Por exemplo, conotoxinas específicas para canais para cálcio tipo-N são usadas para tratamento da dor crônica (Atanassoff *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Ziconotide, um peptídeo sintético equivalente ao conopeptídeo presente no veneno do caramujo marinho *Conus magnus* e que contém 25 aminoácidos, já está disponível para o tratamento em humanos, segundo informações da Agência Norte-Americana que regulamenta a administração de alimentos e drogas (FDA, do inglês *Food and Drugs Administration*). Estas toxinas causam analgesia por inibição dos canais para cálcio pré-sinápticos na via da dor. Neste aspecto, é importante notar que canais para sódio TTX-R são expressos especificamente em neurônios sensoriais nociceptores, mas não por neurônios de outras modalidades sensoriais (Rush *et al.*, 2007). Além disso, níveis de expressão de canais TTX-R aumentam em modelos animais de hiperalgesia inflamatória (England *et al.*, 1994; Matzner e Devor, 1994). Estes dados sugerem que canais TTX-R podem ser um importante alvo terapêutico no qual seu bloqueio pode causar analgesia sem causar anestesia de outras modalidades

sensoriais. Infelizmente, pouquíssimos antagonistas de canais TTX-R têm sido descritos.

Os venenos de escorpiões do gênero *Tityus* contém um grande número de neurotoxinas peptídicas ativas em canais para sódio (para revisão ver De la Vega e Possani, 2007). O membro deste gênero mais profundamente estudado é o *Tityus serrulatus* e seu veneno (De Lima *et al.*, 1986; Kirsch, *et al.*, 1989), assim como o de *Tityus bahiensis*, possui tanto a toxina- α quanto a toxina- β (De Lima e Martin-Eauclaire, 1995 e Becerril *et al.*, 1996) com afinidade muito alta para canais para sódio. Até o momento, não existem registros dos efeitos das toxinas de *Tityus* em canais para sódio TTX-R. Comparado ao *Tityus serrulatus*, o veneno do *Tityus bahiensis* é relativamente pouco explorado. Análises proteômicas mostram a sobreposição das toxinas de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*, mas ainda não constam na literatura medidas diretas do veneno de *Tityus bahiensis* em correntes de sódio em DRG de mamíferos. A fim de caracterizar os efeitos do veneno de *Tityus bahiensis* em correntes de sódio TTX-R e TTX-S, nós então propusemos os seguintes objetivos específicos:

3. OBJETIVOS

Implementar a preparação de culturas primárias de neurônios dos Gânglios da Raiz Dorsal de ratos no Laboratório de Eletrofisiologia Celular.

Estabelecer rotinas de registros de correntes de sódio sensíveis e resistentes a Tetrodotoxina;

Verificar os possíveis efeitos do veneno de *Tityus bahiensis* nestas correntes de sódio, examinando:

- A amplitude da corrente de sódio a 0 mV;
- As cinéticas de inativação;
- A dependência de voltagem da ativação e da inativação rápida no estado estacionário.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais:

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 220 e 280g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os procedimentos de utilização dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais com o protocolo número 43/2005.

4.2. Dissociação de neurônios DRG:

Os métodos utilizados para dissociação de neurônios DRG foram baseados no protocolo estabelecido por Eckert *et al.* (1997).

4.3. Soluções:

As seguintes soluções foram usadas na dissociação e cultura de neurônios dos Gânglios da Raiz Dorsal.

4.4. Dissecção e dissociação:

Solução de Ringer mamífero, sem adição de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

RINGER MAMÍFERO SEM ADIÇÃO DE Ca^{2+} / Mg^{2+}

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	140,0
KCl	2,5
Hepes	10,0
Glicose	7,5

pH ajustado em 7,4 com NaOH.

Tabela 1: Solução de Ringer Mamífero, sem adição de cálcio e magnésio.

4.5. Tratamento Enzimático:

Solução Enzimática 1: Papaína (1 mg/mL), ativada pela adição de cisteína (0,03 mg/mL) diluídas em solução de Ringer filtrada.

Solução Enzimática 2: Colagenase (2,5 mg/mL), diluída em solução de Ringer filtrada.

4.6. Plaqueamento dos neurônios:

Meio de cultura F12, com 10% V/V soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina na concentração de 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

4.7. Manutenção de neurônios em cultura:

Meio de cultura L15 com 10% V/V soro fetal bovino e concentração de 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina

4.8. Superfícies para plaqueamento:

Discos de vidro (5 mm de diâmetro) foram autoclavados e cobertos com aproximadamente 30 µL de poli-L-lisina (20 µg/mL). Foram mantidos a 4°C por no mínimo 12 horas. Foram lavados com água deionizada estéril. Em seguida, esses discos foram estocados a 4°C.

No dia em que foram utilizados para o plaqueamento, os discos de vidro foram cobertos com laminina (20 mg/mL) diluída em Ringer e mantidos a 4 °C por 6 horas. A laminina foi removida instantes antes do plaqueamento dos neurônios.

4.9. Dissecção:

Os ratos foram decapitados por guilhotinamento. A pele do dorso foi removida, assim como a parte anterior do gradil costal e vísceras torácicas. Também foram removidos os corpos vertebrais, deixando expostos a medula e os nervos que chegam a ela. Nos nervos posteriores (que conduzem informações aferentes) estão localizados os Gânglios da Raiz Dorsal (DRG). Esses gânglios formam coleções de corpos neuronais responsáveis por conduzir da periferia ao Sistema Nervoso Central as informações sobre o ambiente em que este indivíduo habita.

Dos DRG obtidos foram removidos o excesso de tecido conjuntivo e as meninges, e foram seccionados para expor seu interior durante o tratamento enzimático.

4.10. Dissociação:

Os DRG foram incubados a 37°C em tubos de centrifugação de 15 mL contendo 3mL da Solução Enzimática 1 por 20 min, gentilmente agitados a cada 5 min. Foram centrifugados por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado.

A Solução Enzimática 2 foi adicionada e o procedimento de incubação e centrifugação foi repetido.

Quando o tratamento enzimático estava completo, o meio de cultura F12 contendo 10% soro fetal bovino foi adicionado para interromper a ação enzimática. O processo de centrifugação foi realizado e o sobrenadante descartado. Um mL de F12 foi acrescentado e os DRG foram submetidos à trituração mecânica realizada com pipetas de vidro com as pontas polidas em fogo com diâmetro interno final em torno de 2 mm.

Após a trituração mecânica, o meio de cultura encontrava-se repleto de corpos celulares neuronais em suspensão. Esses neurônios foram transferidos para as placas de vidro previamente cobertas com poli-L-lisina e posteriormente com laminina. Para permitir a adesão dos neurônios aos discos de vidro, estes foram colocados em estufa (37°C, 5% CO₂, 100% de umidade) por no mínimo 2 horas. Após as 2 h de repouso para adesão celular, foi adicionado meio de cultura L15 para nutrir os neurônios.

4.11. Manutenção dos neurônios:

Os neurônios foram mantidos com meio de cultura L15, permanecendo em temperatura ambiente por 24 horas, para que se tornassem viáveis para os registros eletrofisiológicos. Os neurônios foram utilizados dentro de 72 horas após o seu isolamento.

4.12. Eletrofisiologia:

As correntes de sódio foram registradas através da técnica de *patch clamp*, na modalidade *whole-cell* (Hamill *et al.*, 1981). Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente com variação entre 20 – 25°C de acordo com a época do ano. Durante um dia de experimentos a temperatura variou menos que 2°C. Os experimentos foram realizados em uma mesa antivibratória produzida com o auxílio da serralheria do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, com visualização em microscópio invertido modelo CK2 Olympus (Japan) com oculares de 20x e objetiva de 40x de aumento. O posicionamento da micropipeta era realizado através de dois sistemas de micromanipulação independentes: um mecânico Mitutoyo (Japan) e outro piezoelétrico (Newport M-42 – Irvine, CA, USA) com controle remoto triaxial (PCS-201 – Burleigh Instruments Inc., Fishers, NY, USA). As correntes foram registradas através de um amplificador (*Axonpatch* 200B - Axon Instruments, USA), ligado a um conversor analógico-digital (Digidata série 1200, Axon Instruments, USA), gerenciado pelo aplicativo pClamp 7 (Axon Instruments, USA). As pipetas eram acopladas ao sistema através do *pipete holder*, que mantinha um eletrodo de Ag/AgCl mergulhado na solução de pipeta. O circuito elétrico foi fechado pelo eletrodo de referência de Ag/AgCl, que se encontrava mergulhado na solução de banho.

Pipetas com resistência entre 1,0 e 1,5 MΩ foram fabricadas a partir de capilares de vidro (Patch Glass, PG150T-7.5, Warner Instrument) usando um estirador vertical de pipetas de dois estágios (PP 830 Narishige, Tokyo, Japan), tendo as pontas polidas em uma micro forja (MF 830 Narishige, Tokyo, Japan). As pipetas foram cobertas com cera dental até aproximadamente 0,1 mm da ponta a fim de reduzir a sua capacitância elétrica.

Para a medida das correntes, um selo de alta resistência, com valores superiores a 1 GΩ, chamado de giga-selo, era formado entre a membrana celular e a parede interna da pipeta, aplicando-se uma pequena pressão negativa. Posteriormente, uma sucção adicional permitia a ruptura da membrana da celular, ocorrendo a difusão da solução da pipeta para dentro da célula e a obtenção da configuração *whole-cell*, quando a

capacitância da membrana e a resistência de acesso eram compensadas. Os protocolos de voltagem utilizados são dados nas figuras. As correntes lineares foram subtraídas utilizando um protocolo P/4 (Bezanilla e Armstrong, 1977).

SOLUÇÃO DE PIPETA

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO (mM)
CsF	100
NaCl	20
HEPES	10
EGTA	11
TEA-Cl	10
MgCl ₂	5

pH ajustado para 7,2 com CsOH.

Tabela 2: Solução de Pipeta.

SOLUÇÃO EXTERNA 1

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	115
KCl	5
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1
HEPES	10
TEA-Cl	20
CdCl ₂	0,2
NiCl ₂	0,2
Glicose	5

pH ajustado para 7,4 com NaOH.

Tabela 3: Solução Externa 1.

SOLUÇÃO EXTERNA 2

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO (mM)
ChoCl	115
KCl	5
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1
HEPES	10
TEA-Cl	20
CdCl ₂	0,2
NiCl ₂	0,2
Glicose	5

pH ajustado para 7,4 com TEAOH.

Tabela 4: Solução Externa 2

As correntes de sódio foram isoladas essencialmente como descrito por Omri e Meiri (1990). Correntes de potássio foram bloqueadas utilizando Cs⁺ como o cátion presente em maior concentração no meio intracelular e pela presença de TEA na solução de pipeta (interna) e externa. Canais para Ca²⁺ foram bloqueados por cádmio (0.2 mM) e níquel (0.2 mM). Estas concentrações de cádmio e níquel são relacionadas com a redução da condutância de canais TTX-R em neurônios do DRG e outros neurônios sensoriais (Ikeda e Schofield, 1987; Kuo *et al.*, 2002). Entretanto, estes bloqueios não alterariam os nossos resultados porque as correntes de sódio TTX-R remanescentes ainda era mais do que suficientemente grandes para serem registradas com precisão. A solução final utilizada para registrar correntes de sódio foi obtida por combinação de 30% da solução externa 1 e de 70% solução externa 2. Desta forma a concentração final de sódio na solução externa era 40 mM. Esta concentração não-fisiológica de sódio foi escolhida para evitar correntes do íon sódio exageradamente grandes.

4.13. Preparação e armazenamento do veneno:

O veneno de *Tityus bahiensis* foi fornecido pelo Professor Evanguedes Kalapothakis, do departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Recebemos 2,5 mg do veneno total liofilizado. O veneno foi ressuspenso em 750 µL de água deionizada, centrifugado, e o sobrenadante foi dividido em alíquotas de 20 µL, que foram mantidas em -80°C. A concentração de proteína neste extrato foi estimada em 2,87 µg de proteína/µL, usando o método de Bradford (1976) e tendo a albumina bovina como padrão. As alíquotas de veneno foram descongeladas em gelo na hora dos experimentos e o veneno foi adicionado diretamente na solução extracelular, juntos com 50 µg/mL de Citocromo C (Sigma, C-3006) para prevenir a ligação não específica do veneno (Leão *et al.*, 2000). O Citocromo C foi incluído também na solução externa controle (sem veneno).

5. RESULTADOS

5.1. Eficiência do sistema de perfusão celular:

A fim de conservar o veneno, utilizamos um sistema de perfusão em miniatura constituído por um capilar de vidro (comprimento: 45 mm, diâmetro interno: 0,7 mm), usado para perfundir o veneno diretamente sobre a célula em estudo. Uma válvula solenóide em miniatura foi usada para conectar o capilar a uma das duas soluções (controle ou experimental). Visto que o capilar foi acoplado diretamente à válvula solenóide, o espaço morto foi limitado ao volume do capilar mais o espaço morto da válvula solenóide, com um total de aproximadamente 20 μ L. Admitindo-se que nossa vazão usual era de 3 – 4 μ L/s, este espaço morto resulta em um tempo de troca teórico da solução de 5 – 7 s (figura 4).

Nós testamos este sistema de troca entre a solução extracelular controle com sódio normal e uma solução experimental livre de sódio (substituído por colina). Usando estas soluções, nós medimos o tempo necessário para a corrente de entrada do sódio desaparecer na presença da solução livre de sódio e para reaparecer quando a solução controle foi reaplicada. Nós observamos que a velocidade efetiva de troca da solução depende de modo importante do correto posicionamento do capilar em relação à célula em estudo. Se o capilar não estivesse corretamente posicionado, a substituição da solução seria muito lenta e somente parcialmente eficiente (ou seja, a corrente de entrada poderia reduzir, mas não seria abolida).

Na figura 3, apresentamos um resultado típico após a otimização do sistema de perfusão. Correntes de sódio foram registradas durante degraus de voltagem de -80 mV para 0 mV, e a solução perfundida foi trocada de uma solução extracelular controle contendo 120 mM de sódio para uma solução experimental livre de sódio. Na solução extracelular controle, neurônios de DRG expressam amplas correntes de entrada de sódio a 0 mV. Quando o gradiente de sódio é invertido, a corrente de sódio se torna de saída. Corrente de saída a 0 mV indica que a concentração extracelular de sódio foi reduzida a uma concentração menor que a intracelular. No experimento mostrado, a solução de pipeta continha 20 mM de sódio. Pressupondo a

diálise completa da célula com solução de pipeta este resultado indica que a concentração extracelular de sódio foi reduzida de 120 mM para menos que 20 mM, e desta forma a perfusão foi no mínimo 83% completa.

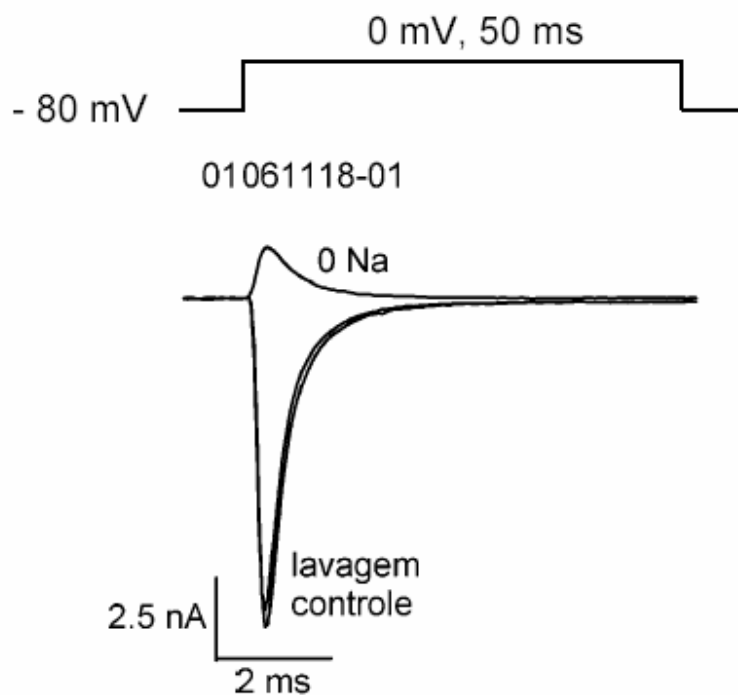


Figura 3: Eficiência do sistema de perfusão celular.

Correntes obtidas na presença de solução extracelular controle contendo 120 mM Na (controle), após a troca para a solução experimental livre de sódio (0Na) e durante a lavagem com solução extracelular controle (linhas sobrepostas).

Para melhor quantificar a eficiência da troca da solução, medimos uma família de correntes em potenciais variando de -60 mV para +60 mV em incrementos de 5 mV em solução extracelular controle e solução experimental livre de sódio (dados não mostrados). Em solução extracelular controle, as correntes de sódio se reverteram em potenciais entre +45 e +50 mV, próximo do potencial de equilíbrio de Nernst para o sódio (+45 mV nestas condições). Na presença de solução livre de sódio, as correntes de sódio eram de saída, mesmo no potencial de -40 mV. O potencial de reversão do sódio na presença de perfusão com solução livre de sódio é, portanto, mais negativa que -40 mV e a concentração extracelular de sódio, pela equação de Nernst, é menor que 4,3 mM. Estes dados indicam que a eficiência da perfusão é superior a 95%. Este cálculo representa um limite inferior porque em potenciais mais negativos que -40 mV não havia corrente mensurável. O potencial de reversão para o sódio pode ter sido mais negativo.

Para medir as cinéticas das trocas de solução, registramos o pico da corrente a cada 5 segundos durante a transição da solução extracelular controle para a solução livre de sódio, e em seguida o retorno à solução controle. Como mostrado na figura 4, quando o sistema de perfusão foi adequadamente otimizado, a troca de solução ocorreu rapidamente. As linhas sólidas representam o ajuste de uma equação exponencial. Este ajuste foi feito a partir do ponto no qual a solução extracelular controle foi substituída pela solução livre de sódio, até o ponto em que este evento alcançou um platô. O mesmo procedimento foi adotado quando a solução livre de sódio foi substituída pela solução extracelular controle. As constantes de tempo foram identificadas como 3,8 s para a substituição pela solução livre de sódio e 5 s para a volta para a solução controle.

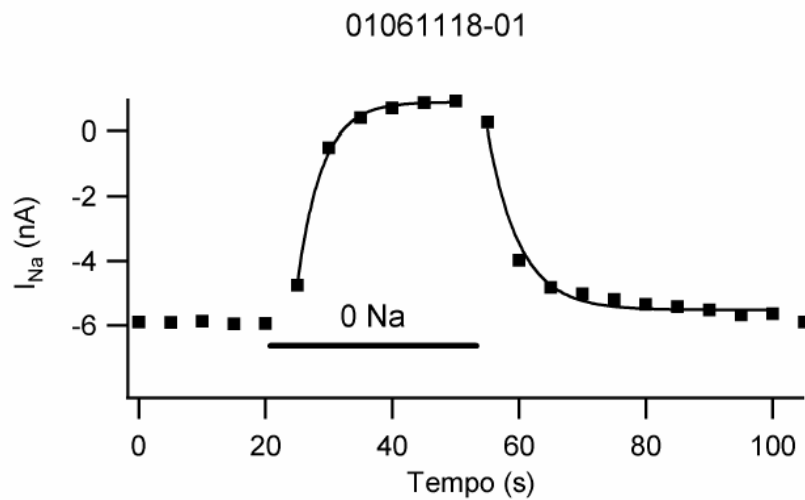


Figura 4: Curso temporal da troca de soluções.

Curso temporal da corrente de sódio (I_{Na}) da mesma célula apresentada na figura 3 durante a troca da solução de sódio controle para solução livre de sódio e retorno para a solução padrão como indicado pela linha pontilhada. A linha sólida representa o ajuste exponencial da inibição e recuperação da I_{Na} . A constante de tempo melhor ajustada foi 3,8 s para a inibição e 5 s para a recuperação.

Como mostrado na figura 5, as correntes de sódio registradas em neurônios DRG nestas condições freqüentemente (mas não sempre) exibiam amplas correntes de entrada durante a repolarização. Consideramos a possibilidade de que estas eram correntes de sódio causadas por inativação incompleta (isto é, correntes de cauda) ou correntes de sódio ressurgentes que ocorriam se canais inativados passavam através do estado aberto antes de desativarem (Kuo e Bean, 1994; Bean, 2005). Para testar estas possibilidades, examinamos a dependência de sódio extracelular destas correntes usando a solução livre de sódio. Nós concluímos que estas correntes de entrada não eram carregadas pelo sódio, porque elas ou se mantinham inalteradas ou aumentavam discretamente sua amplitude quando a concentração extracelular de sódio era reduzida para próximo de 0 mM. Estas correntes podem refletir o movimento de fluoreto através de canais para cloreto. Como será mostrado abaixo, estas correntes de cauda não foram alteradas pelo veneno de *Tityus bahiensis* e, por este motivo, não serão caracterizadas mais.

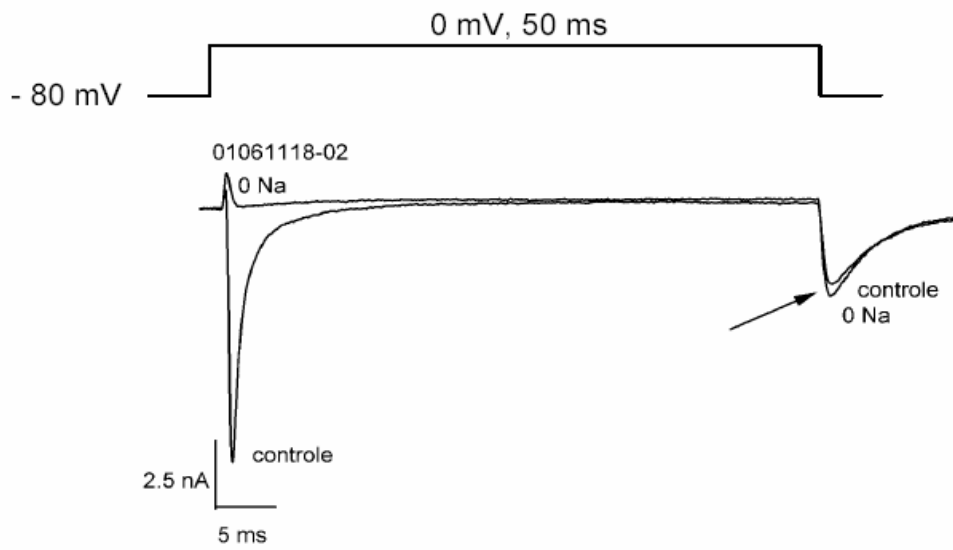


Figura 5: Corrente de cauda.

Correntes registradas em sódio controle (controle) e durante perfusão com solução livre de sódio (0Na) demonstrando que a ampla corrente de cauda que muitas vezes acompanha a repolarização (seta) é relativamente insensível à concentração de sódio extracelular.

5.2. Efeito do veneno de *Tityus bahiensis* na inativação da corrente de sódio registradas em neurônios DRG:

Venenos de escorpiões do gênero *Tityus* contêm toxinas que retardam a inativação dos canais para sódio ativados por voltagem (De la Vega e Possani, 2007). Para avaliar a atividade de nosso estoque de veneno de *Tityus bahiensis* a este respeito, mensuramos as famílias de correntes de sódio de neurônios DRG e observamos o efeito do veneno na cinética de inativação. Exceto onde for especificado, todos os experimentos foram realizados usando o veneno na concentração de 5,74 µg/mL de proteína (ver resumo e métodos). Neurônios DRG expressam uma grande densidade de correntes de sódio ativadas por voltagem. O pico da corrente de sódio dos neurônios DRG medido usando *voltage clamp* em concentrações fisiológicas de sódio extracelular pode alcançar 50 nA (Rush *et al.*, 2007). Para reduzir as correntes de sódio para níveis controláveis por *whole-cell patch clamp*, utilizamos uma solução extracelular contendo baixa concentração de sódio (40 mM). A osmolaridade foi mantida pela substituição equimolar por colina. A figura 6 mostra uma família de correntes medidas sob estas condições, e o efeito do veneno de *Tityus bahiensis* nestas correntes. Em todos os potenciais que geraram correntes de sódio, o veneno de *Tityus bahiensis* tornou mais lenta a inativação e gerou uma corrente persistente que não inativou durante os 100 ms de despolarização. A lavagem do veneno restaurou a inativação a valores próximos aos níveis controle.

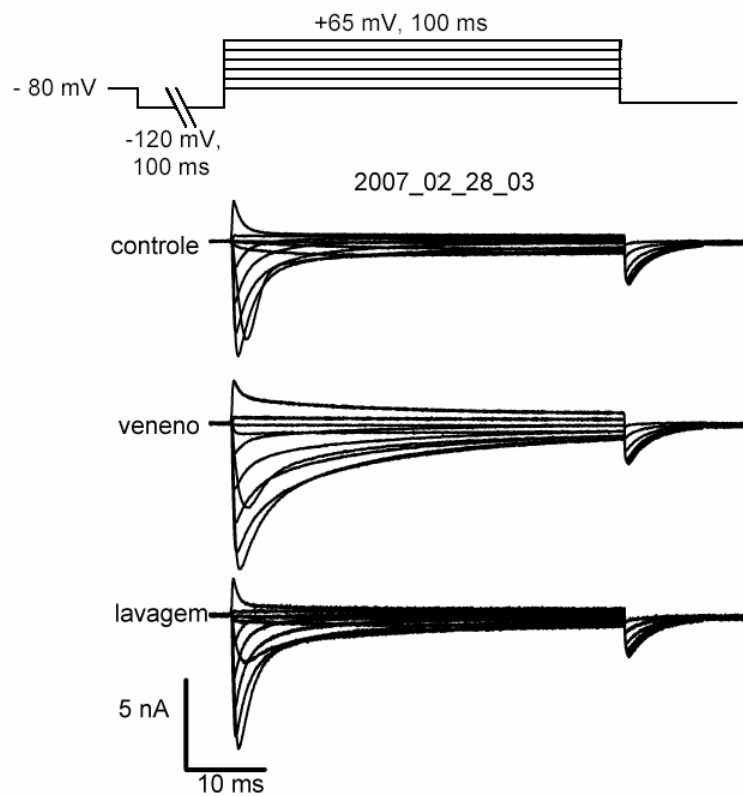


Figura 6: Correntes de sódio em neurônios DRG e sua modulação pelo veneno de *Tityus bahiensis*.

Famílias de correntes de sódio obtidas em condições de controle, após tratamento com veneno de *Tityus bahiensis* e sob lavagem do veneno. As células foram mantidas em -80 mV, hiperpolarizadas a -120 mV por 100 ms para remover a inativação rápida, e então eram submetidas a alterações do potencial que variava -60 mV até +65 mV em incrementos de 5 mV para provocar as correntes mostradas.

Para analisar o efeito do veneno *Tityus bahiensis* na cinética de inativação, focamos nas correntes obtidas a 0 mV. Este potencial foi escolhido porque ele é 20 - 30 mV mais positivo do ponto médio de ativação das correntes de sódio (veja abaixo) garantindo a completa ativação de todos os canais para sódio disponíveis. Além disso, a menor amplitude da corrente de sódio a 0 mV comparado ao pico da corrente de sódio minimiza erros gerados pela resistência em série que pode comprometer a análise da cinética de inativação, que é dependente de voltagem (Hodgkin e Huxley, 1952).

A figura 7 mostra uma corrente de sódio representativa a 0 mV em uma escala vertical expandida para facilitar a comparação da cinética de inativação e o efeito do veneno de *Tityus bahiensis* neste parâmetro. Na grande maioria dos casos, o ajuste da inativação da corrente de sódio a 0 mV precisou da soma de duas exponenciais. Em somente 1 das 15 células examinadas, a corrente pôde ser ajustada com uma única exponencial. O componente rápido da inativação tinha uma constante de tempo de $2,15 \pm 0,18$ ms (aqui e abaixo, valores são dados como média \pm seu limite de confiança de 95%; uma descrição completa da significância estatística é dada na Tabela 1). Embora o veneno de *Tityus bahiensis* não afete o valor desta constante de tempo, ele reduz a fração da corrente que se inativa rapidamente de 80 ± 14 % para 60 ± 9 %. O componente lento da inativação tem uma constante de tempo de $13,19 \pm 3,0$ ms em controle e aumentou para $25,74 \pm 3,18$ ms na presença do veneno. O veneno também aumentou a fração da corrente que inativa lentamente de $14,1 \pm 0,6$ para $36 \pm 0,4$ %. Finalmente, o veneno causou o surgimento de um componente persistente da corrente que não inativou durante um pulso despolarizante de 50 a 100 ms e representava $6,5 \pm 1,9$ % da corrente de sódio total.

Condições		Componentes da inativação				Persistente (% do total)
		Rápidos		Lentos		
		Constante de tempo (ms)	Fração inativante da corrente (%)	Constante de tempo (ms)	Fração inativante da corrente (%)	
Sem TTX	controle	2.15 ±0.18	80 ±14	13.19±3	14.1±0.6	0
	veneno	2.37±0.4	60±9	25.74±3.18	36±0.4	6.5±1.9
	<i>p</i>	>0.1	>0.1	<0,005	>0.3	<0.05
Com TTX	controle	2.96	100	---	---	0
	veneno	2.74±0.2	100	---	---	0±5
	<i>p</i>	>0.1	---	---	---	>0.9

Tabela 5: Componentes rápidos e lentos da inativação da corrente de sódio.

O veneno em todos os experimentos apresentados nesta tabela foi utilizado na concentração 5,74 µg/mL.

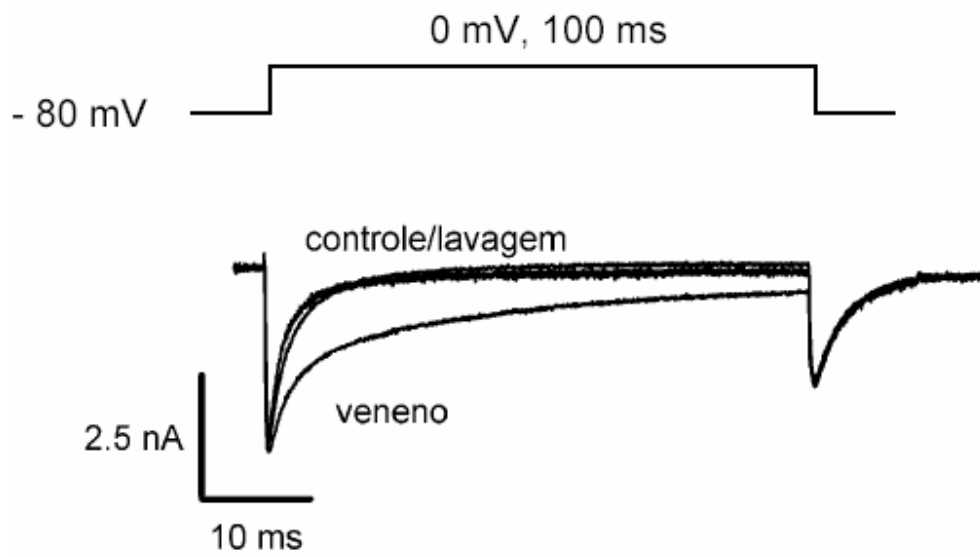


Figura 7: Comparação da cinética de inativação.

Correntes registradas sob três condições (controle, veneno, lavagem), apresentadas juntas para comparação das cinéticas de inativação. Dados obtidos da mesma célula de figura 6.

Como será mostrado abaixo, as correntes de sódio em células DRG são heterogêneas, contendo uma ou mais correntes de sódio TTX-S e outras TTX-R, todas potencialmente alteradas pelo veneno. Desta forma, a cinética da inativação da corrente bruta reflete esta mistura e não admite uma interpretação física simples. Para caracterizarmos o efeito do veneno na cinética da corrente bruta, optamos então por definir uma constante de tempo fenomenológica, composta pelas constantes de tempo obtidas pelo ajuste bi-exponencial, $\tau_{\text{rápido}}$ e τ_{lento} , ponderados por sua respectiva contribuição à corrente inativante total ($f_{\text{rápido}}$, f_{lento}).

Equação 1: $\tau_{\text{composto}} = \tau_{\text{rápido}} \cdot f_{\text{rápido}} + \tau_{\text{lento}} \cdot f_{\text{lento}}$

Este parâmetro tornou-se aumentado de 3.3 ± 0.39 ms no controle para 10 ± 1.3 ms durante o tratamento com o veneno de *Tityus bahiensis*.

A técnica de *patch clamp* na modalidade *whole-cell* resulta na diálise do líquido intracelular e isto pode alterar as propriedades do canal para sódio. Além disso, nossa solução de pipeta continha fluoreto (F^-), que é conhecido por alterar a ativação do canal para sódio (Qu *et al.*, 2000). Embora nós tenhamos esperado 10 minutos após o estabelecimento da condição *whole-cell patch clamp* para permitir as mudanças devidas da diálise com a solução contendo F^- para estabilizar previamente ao início de algum experimento, nós nos preocupamos se parte dos efeitos observados na inativação poderiam ser devidos a fatores outros além da aplicação do veneno. Por este motivo, nós analisamos o curso temporal do efeito do veneno para verificar as alterações na corrente de sódio e se este se correlacionava com a aplicação do veneno. A constante de tempo média, o pico da corrente e a corrente sustentada registrados estão plotados *versus* tempo na Figura 8. Os dados mostram linhas de base estáveis que se alteram abruptamente após perfusão com veneno. Além da lentificação da inativação e geração da corrente persistente, o veneno (na concentração $5,74 \mu\text{g/mL}$) causou um pequeno aumento no pico da corrente. Visto que as correntes foram registradas em um potencial consideravelmente mais positivo do que o ponto médio da ativação, o aumento na corrente observado provavelmente resulta da inativação lenta e não do aumento do número de canais que se abrem.

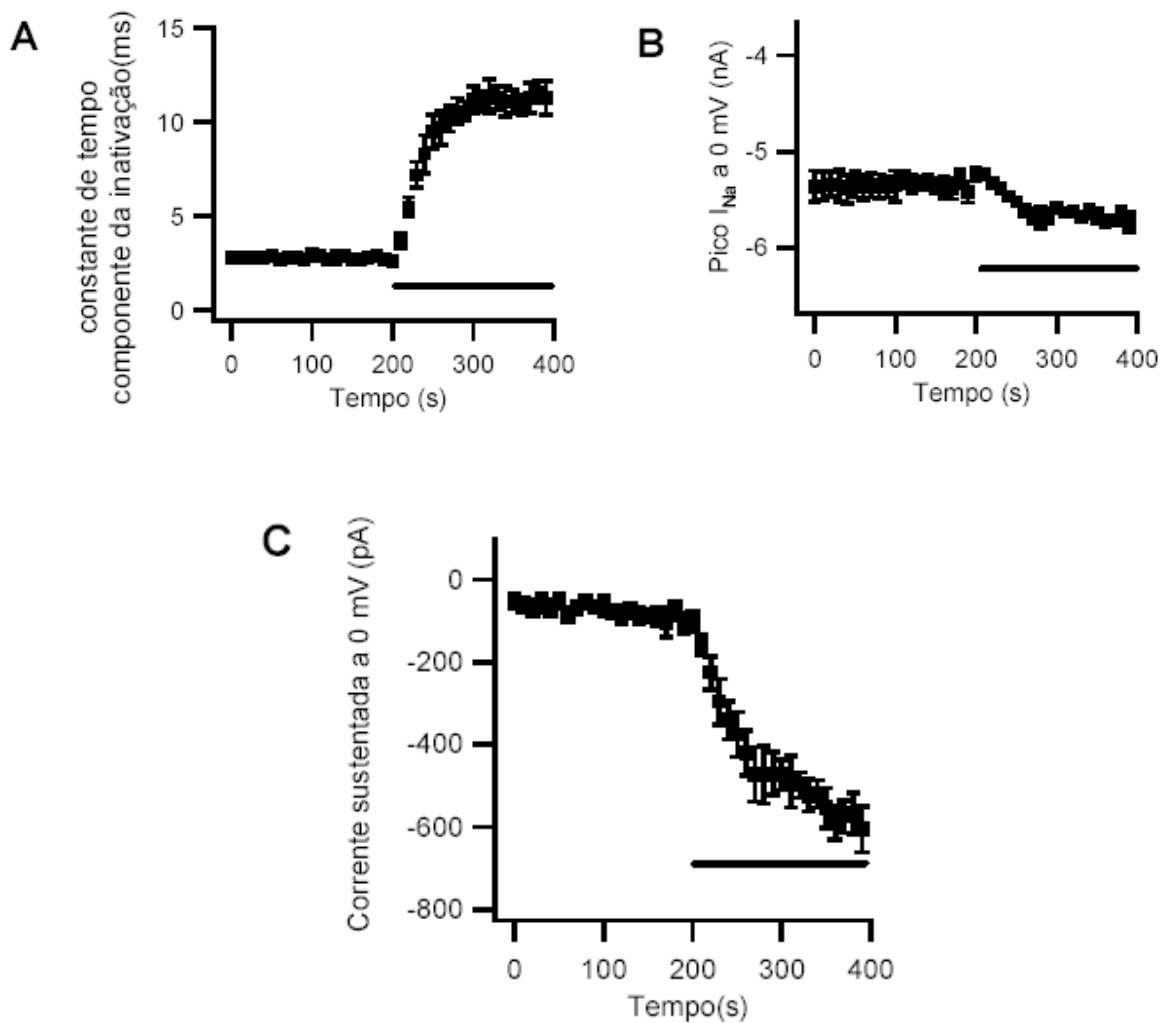


Figura 8: Efeitos do veneno de *Tityus bahiensis* versus tempo.

Média do curso temporal ($n = 7$ neurônios) do efeito do veneno de *Tityus bahiensis* na corrente de sódio bruta. Correntes registradas a 0 mV foram usadas para ajustar uma equação exponencial dupla para determinar a constante de tempo do componente de inativação (**A**, calculado como a média das constantes de tempo rápida e lenta, ponderados por sua contribuição relativa), o pico da amplitude da corrente a 0 mV (**B**) e a corrente de sódio sustentada (**C**) medida no final dos 100 ms de despolarização. As barras posicionadas na parte inferior de cada gráfico informam o momento em que o veneno (na concentração 5,74 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado à solução externa.

5.3. Avaliação da potência do veneno:

Para avaliarmos a potência do veneno, testamos o seu efeito na corrente de sódio em mais três concentrações: 0,574 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 2$ neurônios), 1,92 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 5$ neurônios), e 17,2 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 2$ neurônios). Como mostrado na figura 9 (A1 e A2), o veneno em concentração de 0,574 $\mu\text{g/mL}$ já mostrou o seu efeito. Na concentração de 17,2 $\mu\text{g/mL}$ o efeito do veneno foi pouco maior que o efeito em 5,74 $\mu\text{g/mL}$. Estes dados são quantificados na figura 9 (B), onde o efeito de cada dose é expresso relativo ao efeito da dose 5,74 $\mu\text{g/mL}$ obtido na mesma célula. Baseado nestes dados, concluímos que a dose de 5,74 $\mu\text{g/mL}$ é perto da dose máxima para os efeitos medidos.

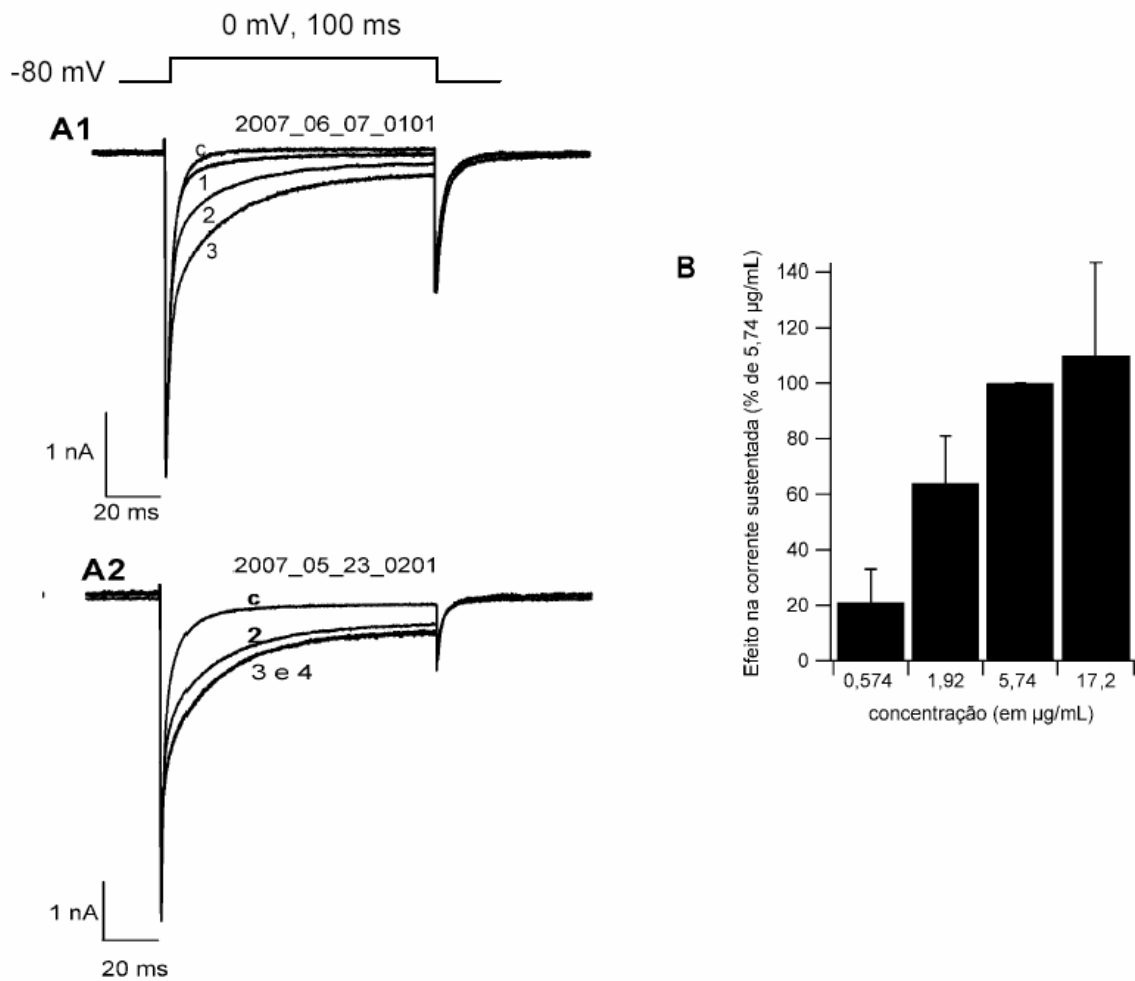


Figura 9: Relação dose-resposta do efeito do veneno de *Tityus bahiensis*.

Dose-resposta do efeito do veneno de *Tityus bahiensis* na cinética de corrente de sódio medida em 0 mV. **A1:** Corrente de sódio em controle (c), e após tratamento com veneno nas concentrações 0,574µg/mL (1), 1,92 µg/mL (2), e 5,74 µg/mL (3). **A2:** Corrente de sódio em controle (c), e após tratamento com veneno nas concentrações 1,92 µg/mL (2), 5,74 µg/mL (3), e 17,2 µg/mL (4). **B:** Resumo do efeito do veneno na geração de corrente persistente. Para cada dose testada, a corrente persistente foi normalizada à corrente produzida pelo veneno na concentração 5,74 µg/mL na mesma célula.

5.4. Efeito do veneno de *Tityus bahiensis* na dependência de voltagem da ativação da corrente de sódio:

Para estudar os possíveis efeitos do veneno de *Tityus bahiensis* na ativação, nós mantivemos os neurônios a -80 mV e registramos correntes de sódio durante pulsos despolarizantes que variavam entre -80 mV e +25 mV em incrementos de 5 mV. Para formar a curva mostrada na figura 10, os dados foram normalizados para seu pico antes de calcular a média. Dados normalizados de células individuais foram usados para ajustar a equação:

Equação 2:
$$I(V) = g (V - E_{Na}) / (1 + \exp(-(V - V_{ha})/k_a))$$

Onde E_{Na} é o potencial de reversão do sódio, V_{ha} é o potencial necessário para alcançar 50% da ativação máxima, e k_1 determina o grau da inclinação da dependência de voltagem da ativação. Como mostrado na tabela 2, destes, o único parâmetro afetado pelo veneno de *Tityus bahiensis* foi k_a , que aumentou de $4,2 \pm 0,45$ para $7,3 \pm 2,1$ mV. Embora a interpretação usual deste efeito possa ser uma redução na carga que move no campo elétrico durante a ativação (Hodgkin e Huxley, 1952), este efeito pode também ser devido ao aparecimento de um componente da corrente de sódio que se ativou em potenciais discretamente mais negativos que o normal, ou seja, um efeito do tipo β causado pelo veneno. Não fomos capazes de distinguir estas possibilidades simplesmente ajustando as curvas. Resolvemos então estudar em detalhes o efeito de veneno na ativação de correntes de sódio em potenciais mais negativos.

Efeito do veneno de *Tityus bahiensis* sem TTX

	A ₁	V _{h1} (mV)	K ₁ (mV)	V _{rev} (mV)
Controle (média)	0.02 ± 0.007	-30.7 ± 11.6	4.2 ± 0.45	38.9 ± 14.1
<i>Tityus bahiensis</i> (média)	0.02 ± 0.012	-31.7 ± 21.1	7.3 ± 2.1	37.2 ± 8.4
<i>Tityus bahiensis</i> – Controle (média)	0.002 ± 0.005	-0.97 ± 10.8	3.13 ± 2.5	-1.7 ± 5.7

Efeito do veneno de *Tityus bahiensis* com TTX

	A ₁	V _{h1} (mV)	K ₁ (mV)	V _{rev} (mV)
Controle (média)	0.02 ± 0.006	-19.6 ± 7.45	3.35 ± 0.94	37.4 ± 0.94
<i>Tityus bahiensis</i> (média)	0.02 ± 0.006	-21.1 ± 8.1	3.8 ± 0.855	37.6 ± 8.8
<i>Tityus bahiensis</i> – Controle (média)	0.001 ± 0.002	-1.5 ± 1.96	0.46 ± 0.27	0.19 ± 2.09

Tabela 6: Efeito do veneno de *Tityus bahiensis* em parâmetros da ativação da corrente de sódio.

Nesta tabela, **A** representa a amplitude relativa das correntes de sódio; **V_h**, o potencial necessário para que 50% dos canais alcancem a ativação; **K**, o fator de inclinação da curva e **V_{rev}**, o potencial de reversão para o sódio.

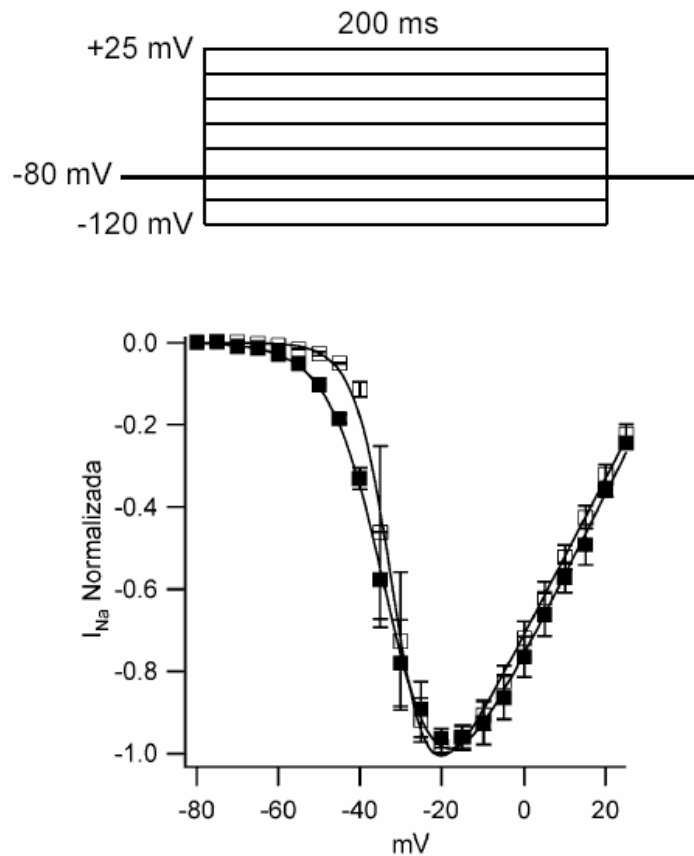


Figura 10: Dependência de voltagem da ativação da corrente de sódio.

Dependência de voltagem da ativação da corrente de sódio em solução extracelular (quadrados vazios) ou após tratamento com veneno (quadrados cheios). Células ($n = 3$) foram mantidas a -80 mV e a corrente registrada durante degraus dos potenciais indicados no gráfico. Para cada célula, o pico da corrente em cada potencial foi normalizado para a maior corrente na série e as curvas I-V normalizadas eram as médias (barras de erro representam 1 S.E.M.). As linhas representam o melhor ajuste da equação:

Equação 3:
$$I(V) = g (V - V_{rev}) / (1 + \exp(-(V - V_h)/k))$$

Onde V é o potencial de membrana; g é a condutância do canal ao sódio; V_{rev} é o potencial de reversão da corrente de sódio; V_h é o potencial necessário para que 50% dos canais alcancem a ativação; k é o grau de inclinação da curva.

Para algumas toxinas escorpionicas do tipo β , a sua modificação da ativação é fortemente facilitada por um breve pré-pulso despolarizante aplicado dentro de uma

fração de um segundo anterior ao pulso teste (Cestèle *et al.*, 2006). Com a finalidade de testar se um protocolo com estas características pode revelar um efeito do tipo β do veneno de *Tityus bahiensis* (ou seja, dois componentes da ativação), nós aplicamos despolarizações de 1 ou 2 ms para +50 mV que ocorriam 60 ms antes de um pulso teste a -60 mV. Estes parâmetros foram escolhidos porque eles se mostraram eficientes para promover um forte efeito da toxina de escorpião do tipo β de *Centruroides suffusus suffusus* (Cestèle *et al.*, 2006).

Como mostrado na figura 11, pulsos teste para -60 mV em condições controle geram correntes de sódio com ativação lenta. Será mostrado abaixo que esta probabilidade é representada por correntes resistentes a TTX. Após tratamento com veneno de *Tityus bahiensis*, um componente de corrente com ativação rápida também estava presente. Assim, veneno de *Tityus bahiensis* acentua a ativação da corrente de sódio em potenciais negativos indicando a presença de toxinas do tipo β . Contudo, fortes despolarizações aplicadas previamente à despolarização teste nunca realçaram este efeito do veneno (n = 8 neurônios testados com pré-pulso de 1 ms; n = 5 neurônios testados com um pré-pulso de 2 ms), estando de acordo com os resultados obtidos por Campos *et al.* (2007). Contudo, o mecanismo deste efeito tipo β é provavelmente diferente do modelo de “travamento do sensor de voltagem” proposto por Cestèle *et al.* (2006).

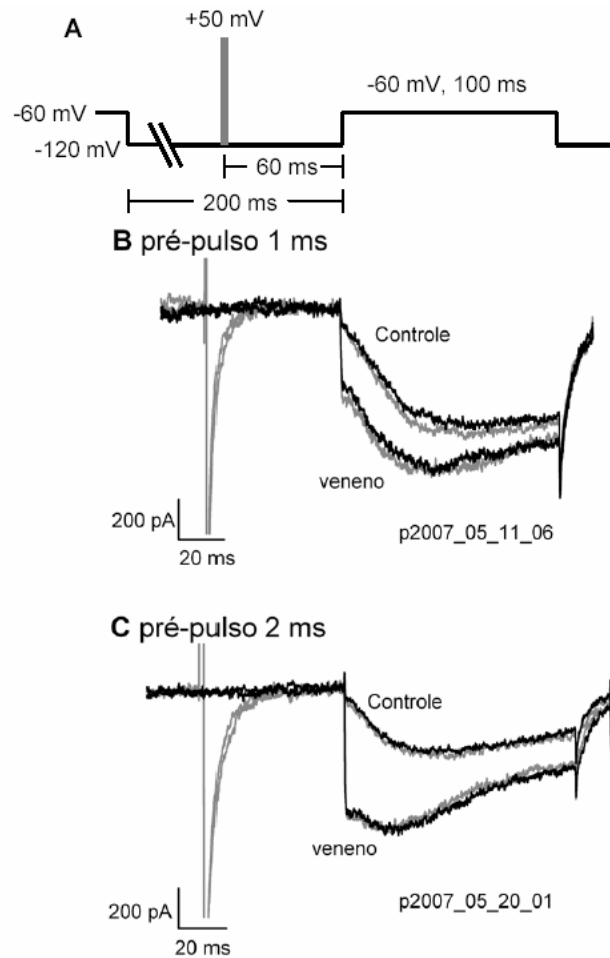


Figura 11: Efeito do pré-pulso despolarizante.

A. Protocolo de voltagem usado para medir o limiar da corrente de sódio e efeitos do pré-pulso. A partir de um potencial de *holding* de -60 mV, as células eram submetidas a uma hiperpolarização de -120 mV por 200 ms para remover a inativação rápida antes do pulso teste de -60 mV. Quando um pré-pulso despolarizante de 1 ou 2 ms de duração a $+50$ mV foi usado (linha cinza), ele foi utilizado 60 ms antes do pulso teste. A linha pontilhada indica o segmento do protocolo correspondendo às correntes mostradas abaixo. **B e C.** Correntes registradas em solução extracelular controle ou após tratamento com veneno de *Tityus bahiensis*, como identificado. A escala de tempo é expandida em relação ao protocolo de voltagem para permitir a visualização do componente muito rápido da ativação na presença do veneno. Traços pretos foram registrados sem pré-pulso, traços cinzas foram registrados com um pré-pulso.

5.5. Efeito do veneno de *Tityus bahiensis* na dependência de voltagem da inativação rápida:

Para estudar a inativação rápida da corrente de sódio, nós utilizamos protocolos padrões de dois pulsos (Hodgkin e Huxley, 1952), no qual o pré-pulso para um potencial variável é usado para estabilizar a inativação rápida no estado estacionário e o segundo pulso é usado para avaliar a corrente remanescente disponível de sódio.

Como mostrado na figura 12, a inativação no estado estacionário *versus* potencial do pré-pulso para correntes de sódio em condições controle exibe dois componentes, um que inativa em um ponto médio de -79 ± 6 mV e um segundo componente que inativa em um ponto médio de -36 ± 5 mV. Como mostrado previamente (Rush *et al.*, 2007) e abaixo, o primeiro componente representa corrente de sódio TTX-S enquanto o segundo componente é TTX-R. Note, contudo, que estes componentes não se somam linearmente por causa das suas cinéticas de ativação e inativação muito diferentes. Assim, a contribuição relativa de cada uma das correntes de sódio total não pode ser lida diretamente deste gráfico, e a contribuição aparente do primeiro componente ($29 \pm 9\%$) subestima a amplitude do componente TTX-S.

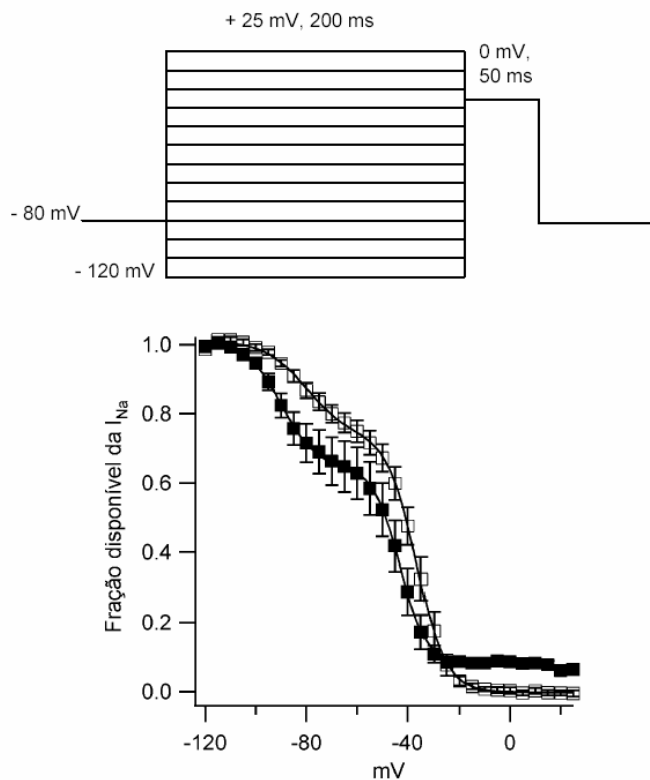


Figura 12: Dependência de voltagem no estado-estacionário da inativação rápida.

Dependência de voltagem no estado-estacionário da inativação rápida em solução extracelular controle (quadrados vazios) ou após tratamento com veneno (quadrados cheios). Células ($n = 6$ neurônios) foram mantidas a -80 mV, condicionadas com um pré-pulso de 200 ms nos potenciais indicados no gráfico, e então submetidas a um pulso teste a 0 mV pra medir $F_{\text{disponível}}$, a fração disponível da corrente de sódio. As correntes obtidas em cada potencial foram normalizadas para a corrente disponível a -120 mV. Os dados resultantes foram usados para ajustar a soma das duas relações de Boltzman representando os dois componentes da inativação somada a uma constante representando o componente não inativante que aparece após o tratamento com o veneno.

$$\text{Equação 4: } F_{\text{disponível}}(V) = a_1/(1+\exp((V-V_{h1})/k_1))+a_2/(1+\exp((V-V_{h2})/k_2))+(1-a_1-a_2)$$

Onde $F_{\text{disponível}}$ é a fração da corrente de sódio disponível após a utilização do protocolo descrito; V é o potencial de membrana; a_1 e a_2 são as amplitudes relativas dos componentes de inativação; V_{h1} e V_{h2} , o potencial necessário para inativar 50% do respectivo componente da corrente; k_1 e k_2 , fator de inclinação da curva de inativação do respectivo componente.

Sobre o tratamento com o veneno de *Tityus bahiensis*, duas alterações estavam claramente presentes na relação da inativação do estado estacionário *versus* o

potencial do pré-pulso. Os pontos médios de ambos os componentes estavam alterados em direção a potenciais mais negativos (tabela 2) e o primeiro componente crescia em consequência à existência do segundo componente. Além disso, o tratamento com veneno gera o surgimento de um componente não inativante que representa $8 \pm 2\%$ da corrente total do sódio. Assim como outros venenos de escorpiões, o veneno de *Tityus bahiensis* contém toxinas que causam um deslocamento negativo na inativação rápida dependente de voltagem (Kirsch *et al.*, 1989), o que ocasiona correntes persistentes que não se inativam dentro dos 200 ms em altas voltagens, tais como +20 mV.

5.6. Ausência de efeito do veneno de *Tityus bahiensis* na cinética de correntes de sódio resistentes a tetrodotoxina:

Correntes de sódio TTX-R foram medidas sob condições idênticas à corrente total de sódio exceto pela presença de 0,25 - 1 μ M de TTX. A figura 13 mostra uma família de correntes de sódio registradas sob estas condições em controle e após o tratamento com o veneno de *Tityus bahiensis*. Note que o forte efeito do veneno na cinética de inativação visto na corrente total de sódio está ausente na corrente de sódio TTX-R.

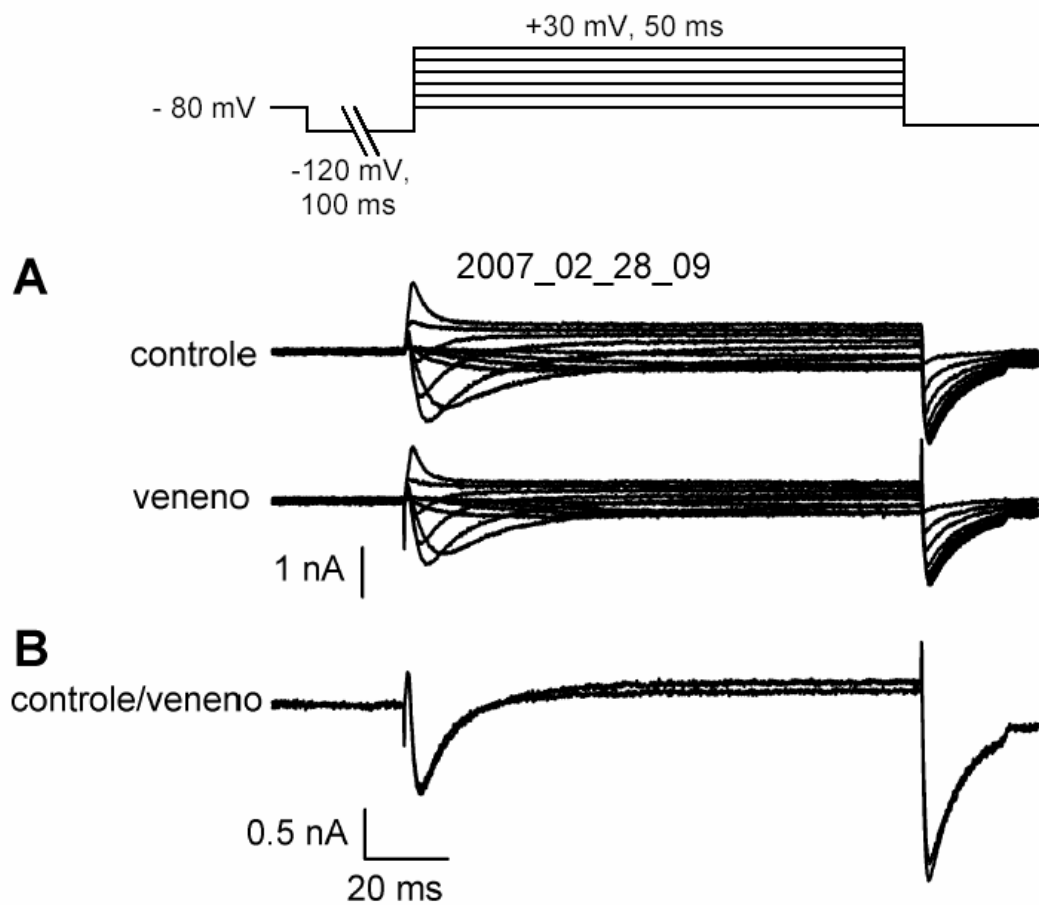


Figura 13: Relação I-V na presença de veneno de *Tityus bahiensis* e TTX.

Correntes de sódio registradas de um neurônio DRG na presença de solução extracelular contendo 0,1 μ M de TTX. **A.** Famílias de correntes de sódio obtidas em condições controle e após tratamento com veneno de *Tityus bahiensis*. **B.** Correntes registradas a 0 mV sob as condições controle e na presença do veneno e sobrepostas para comparação da cinética de inativação. Note a diferença na escala vertical em A e B.

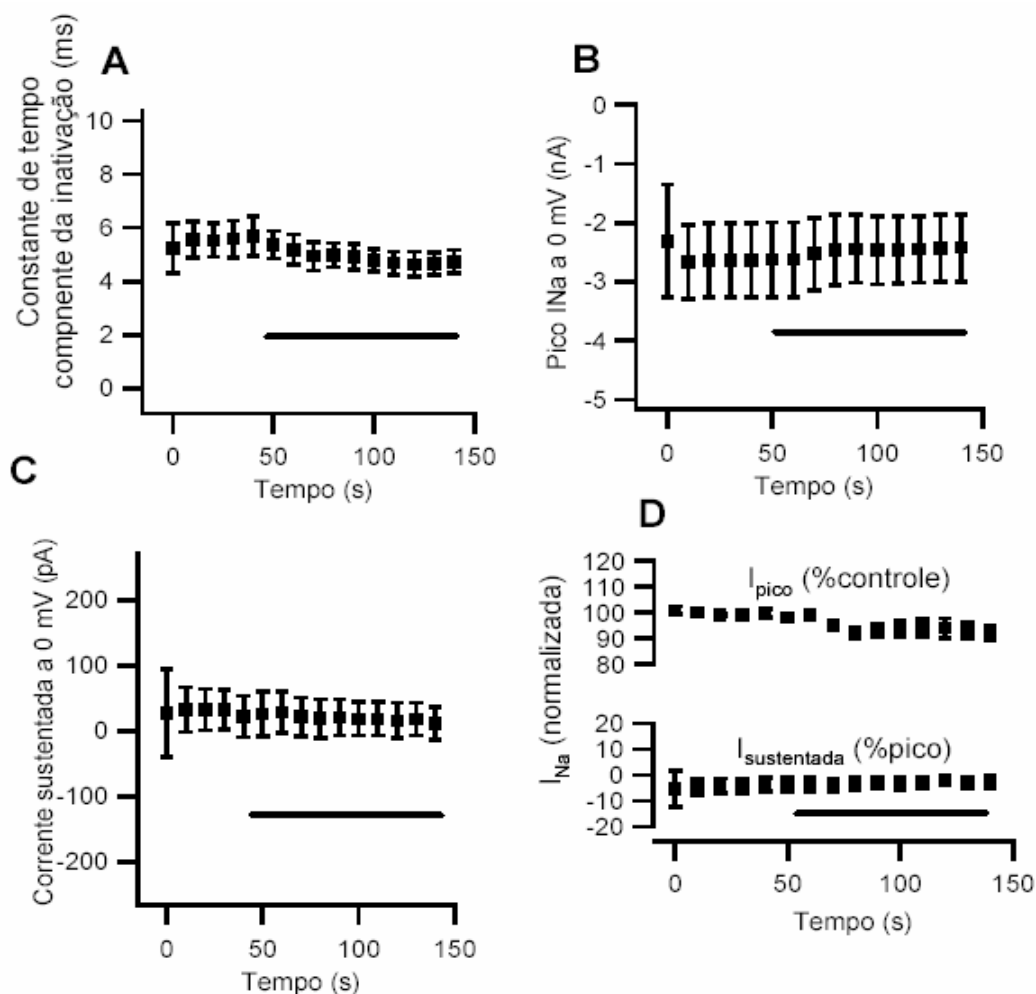


Figura 14: Efeitos do veneno de *Tityus bahiensis* versus tempo em canais para sódio resistentes a tetrodotoxina.

Média do curso temporal ($n = 8$ neurônios) do efeito do veneno de *Tityus bahiensis* na inativação rápida da corrente de sódio. Correntes registradas a 0 mV foram usadas para ajustar uma equação exponencial dupla, determinando assim a constante de tempo do componente da inativação (**A**, calculada a média das constantes de tempo rápida e lenta, ponderado por sua contribuição relativa), a amplitude do pico da corrente a 0 mV (**B**) e a corrente de sódio medida no final dos 100 ms de despolarização (**C**). Em **D**, os dados mostrados em B e C foram agrupados após normalização para valores controle (pico da corrente) ou para o pico da corrente sustentada para reduzir a variância. As barras posicionadas na parte inferior de cada gráfico informam o momento em que o veneno (na concentração 5,74 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado à solução externa.

A cinética de inativação a 0 mV foi ajustada com a soma de duas exponenciais. Como mostrado na figura 14, não havia efeito do veneno de *Tityus bahiensis* neste parâmetro; a corrente sustentada, medida no final do degrau de 50 ou 100 ms para 0 mV foi positiva na presença de TTX e inalterada pelo veneno de *Tityus bahiensis*; o pico da corrente a 0 mV foi também inalterado pelo veneno. Por causa da grande variação na amplitude de correntes entre neurônios, nós também calculamos o pico normalizado (figura 15) e a corrente sustentada normalizada (figura 16) para determinar se pequenas alterações nestes parâmetros foram ocultos na variação. O pico da corrente foi normalizado para seu valor imediatamente após a aplicação do veneno e a corrente sustentada foi normalizada pelo pico da corrente. Mesmo após a normalização, efeitos do veneno de *Tityus bahiensis* não foram vistos.

Examinamos também o efeito do veneno de *Tityus bahiensis* na dependência de voltagem da ativação e da inativação. Estes experimentos foram realizados usando dois diferentes potenciais de *holding*, -80 mV e -120 mV. Os dados obtidos com um potencial de -80 mV foram usados para comparar diretamente com os dados obtidos na ausência de TTX. O potencial de *holding* de -120 mV foi usado para remover a inativação lenta da corrente gerada pelo canal TTX-R (Herzog *et al.*, 2001)

Como mencionado acima, a figura 15 mostra a dependência de voltagem da ativação e da inativação sob estes dois potenciais de *holding* em condições controle e após o tratamento com o veneno de *Tityus bahiensis*.

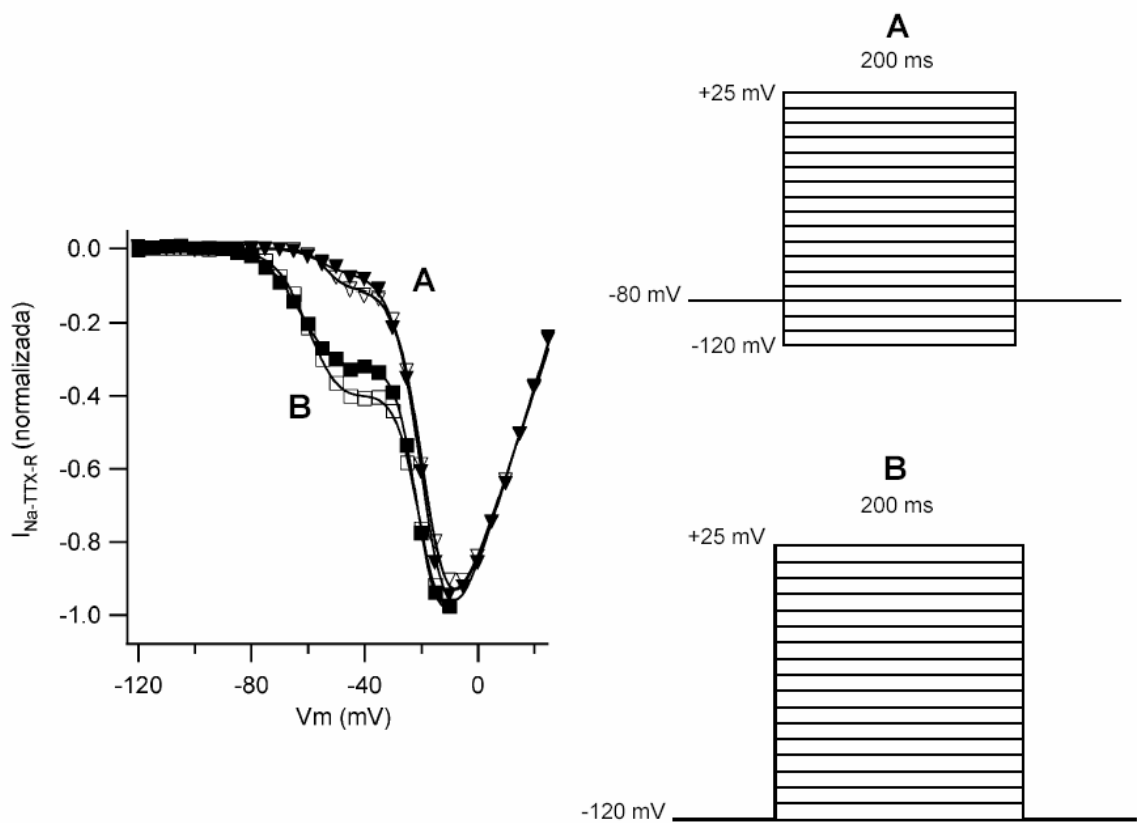


Figura 15: Dependência de voltagem da ativação da corrente de sódio em canais para sódio resistentes a tetrodotoxina.

Dependência de voltagem da ativação da corrente de sódio em solução extracelular controle (quadrados vazios) ou após tratamento com veneno (quadrados cheios) ambos na presença de TTX. Células ($n = 3$ neurônios) foram mantidas a -80 mV (protocolo A) e a -120 mV (protocolo B) e as correntes foram registradas de acordo com os degraus dos potenciais indicados no gráfico. Para cada célula, o pico da corrente em cada potencial foi normalizado para a maior corrente na série antes de calcular a média (barras de erro representam 1 S.E.M.). As linhas representam o melhor ajuste da equação:

Equação 5:
$$I(V) = g(V - V_{rev}) / (1 + \exp(-(V - V_h)/k))$$

Onde V é o potencial de membrana; g é a condutância do canal ao sódio; V_{rev} é o potencial de reversão da corrente de sódio; V_h é o potencial necessário para que 50% dos canais alcancem a ativação; k é o grau de inclinação da curva.

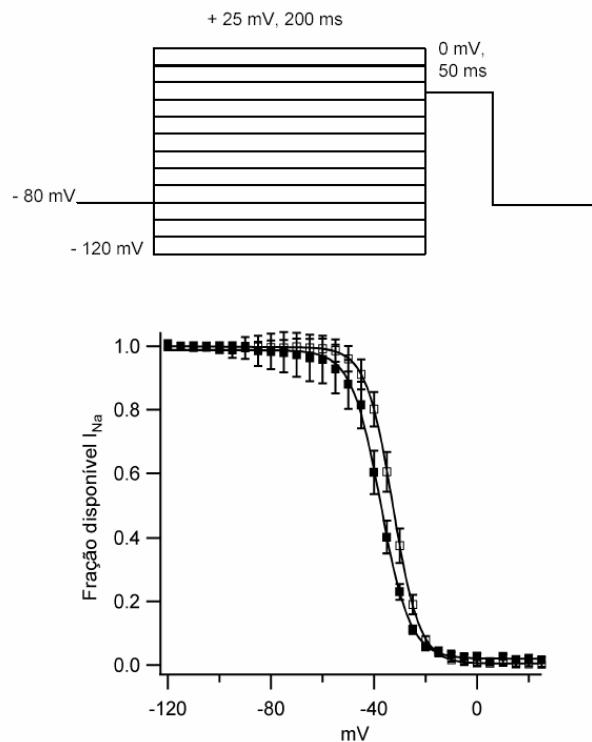


Figura 16: Dependência de voltagem no estado estacionário da inativação rápida do canal para sódio resistente a tetrodotoxina na presença do veneno de *Tityus bahiensis*.

Dependência de voltagem no estado estacionário da inativação rápida em solução extracelular controle (quadrados vazios) ou após tratamento com veneno (quadrados cheios) ambos na presença de TTX. Células ($n = 6$ neurônios) foram mantidas em -80 mV, condicionadas com um pré-pulso de 200 ms nos potenciais indicados no gráfico, e então submetidas a um pulso teste a 0 mV pra medir $F_{\text{disponível}}$, a fração disponível da corrente de sódio. As correntes obtidas em cada potencial foram normalizadas para a corrente disponível a -120 mV. Os dados resultantes foram usados para ajustar a soma das duas relações de Boltzman representando os dois componentes da inativação somada a uma constante representando o componente não inativante que aparece após o tratamento com o veneno.

$$\text{Equação 6: } F_{\text{disponível}}(V) = a_1/(1+\exp((V-V_{h1})/k_1))+a_2/(1+\exp((V-V_{h2})/k_2))+(1-a_1-a_2)$$

Onde $F_{\text{disponível}}$ é a fração da corrente de sódio disponível após a utilização do protocolo descrito; V é o potencial de membrana; a_1 e a_2 são as amplitudes relativas dos componentes de inativação; V_{h1} e V_{h2} , o potencial necessário para inativar 50% do respectivo componente da corrente; k_1 e k_2 , fator de inclinação da curva de inativação do respectivo componente.

6. DISCUSSÃO

Como mencionado na Justificativa, toxinas de animais e plantas têm tido um papel vital na descoberta da natureza, mecanismos de função, e o papel fisiológico dos canais iônicos. Além disso, tem-se investido em toxinas ativas em canais iônicos específicos como possíveis agentes terapêuticos (por exemplo, conotoxinas ativas em canais para cálcio já são usadas no tratamento da dor). Algumas neurotoxinas são ativas em canais para sódio, mas mesmo assim existem poucos registros na literatura sobre neurotoxinas específicas para suas subunidades. Isto se torna importante porque diferentes subunidades de canais para sódio desenvolvem funções específicas no seu contexto fisiológico. No sistema nervoso sensorial isto é particularmente elucidado pelas vias de dor. Humanos com mutações no código genético de canais $Na_v1.7$ (um canal para sódio TTX-S presente em nociceptores) que abole sua capacidade para conduzir corrente, e conseqüentemente a sensação de dor não existe (Cox *et al.*, 2006). Por outro lado, a expressão de canais TTX-R é especificamente elevada em condições inflamatórias (England *et al.*, 1994; Matzner e Devor, 1994), e a resultante supraexpressão pode estar associada a hiperalgesia. Desta forma, canais para sódio se tornam um tantalizado alvo terapêutico, e há uma necessidade urgente de encontrar agentes que atuem seletivamente em subunidades destes canais.

Escorpiões do gênero *Tityus* produzem venenos contendo um grande número de toxinas polipeptídicas. O veneno de *Tityus serrulatus* tem sido extensivamente explorado, mas este não é o caso do *Tityus bahiensis*. Estudos proteômicos têm confirmado as similaridades entre estes venenos, mas eles não são idênticos (Becerril *et al.*, 1996 e Nascimento *et al.*, 2006). Baseado nos resultados de conotoxinas (Terlau e Olivera, 2004), é esperado que diferentes venenos de *Tityus* contenham diferentes tipos de toxinas, o que pode acarretar na possibilidade de descobertas de uma nova toxina com seletividade por uma subunidade de Na_v . Nós investigamos e apresentamos o primeiro passo na caracterização eletrofisiológica do veneno de *Tityus bahiensis* medindo seu efeito nas correntes sensíveis e resistentes a tetrodotoxina presentes em neurônios de DRG.

6.1. Sensibilidade ao veneno:

Habitualmente aceitamos que as características eletrogênicas de células excitáveis são desenvolvidas pelo canal para sódio, mas temos que considerar que não é o papel de um único tipo de canal. Atualmente admitimos que a existência de múltiplas isoformas de canais para sódio ativados por voltagem estão presentes e distribuídas pela superfície da membrana celular de corpos neuronais dos DRG (Catterall *et al.*, 2005). De acordo com os nossos resultados, podemos admitir que nossa preparação possui dois tipos de canais para sódio em relação à sensibilidade a TTX. Segundo a caracterização realizada por Rush *et al.*, (2007) distribuídas dentro destes dois tipos é possível encontrar as isoformas TTX-S $Na_v1.1$, $Na_v1.6$ e $Na_v1.7$ e TTX-R $Na_v1.8$ e $Na_v1.9$ em neurônios DRG. A associação destas isoformas exhibe um misto de suas características durante registros eletrofisiológicos.

A existência de um único aminoácido em posições definidas para cada isoforma confere sensibilidade ou resistência a TTX. Estes canais são separados farmacologicamente pela adição às soluções de perfusão de 0,25 - 1 μ M de TTX.

Toxinas α de escorpiões que provocam inativação lenta se ligam ao sítio 3 do canal para sódio, o mesmo sítio ao qual se ligam as toxinas de anêmonas, que também provocam inativação lenta (Catterall, 1980; Rogers, *et al.*, 1996). Os aminoácidos que compõem o sítio 3 podem ser distribuídos ao longo da seqüência primária do canal, e presumidamente são mantidos juntos quando a proteína se dobra para dentro da membrana. Várias porções extracelulares do canal têm sido implicadas na formação do sítio 3, incluindo a alça que conecta os segmentos 3 e 4 do domínio IV. Estudos sobre mutações têm mostrado que um resíduo glutamato nesta região (E1613 em $Na_v1.2$ de ratos) é essencial para a ligação da toxina α de escorpião (LqTx – toxina de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*; Rogers *et al.*, 1996), levando-nos a examinar a seqüência dos canais resistentes a TTX em neurônios DRG para verificar as diferenças nesta região.

Usando a ferramenta de alinhamento de seqüência BLAST, nós analisamos as seqüências homólogas de todos os 9 canais para sódio de ratos (figura 17). Os

resultados mostraram que os aminoácidos análogos a E1613 em Na_v1.2 são ou glutamato ou aspartato. Nas isoformas TTX-R Na_v1.8 e Na_v1.9, os aminoácidos análogos são a alanina e a arginina, respectivamente. As toxinas de escorpiões descritas até então são moléculas geralmente básicas, e sua ligação é presumivelmente estabilizada pela interação com aminoácidos ácidos na proteína do canal. Nós então sugerimos que a substituição deste importante glutamato por um aminoácido neutro (alanina em Na_v1.8) ou básico (arginina em Na_v1.9) é um fator crucial que explica o motivo pelo qual estes dois canais TTX-R também são resistentes as toxinas α de escorpião.

Nav1.1	SCN1a	1590	LKLISLRHYYFTIGWNIFDFVWVILS IVGMFLAELIEKYFVSPTLPRVIRL	1640
Nav1.2	SCN2a	1580	LKLISLRHYYFTIGWNIFDFVWVILS IVGMFLAELIEKYFVSPTLPRVIRL	1630
Nav1.3	SCN3a	1526	LKLISLRYYYFTIGWNIFDFVWVILS IVGMFLAELIEKYFVSPTLPRVIRL	1576
Nav1.4	SCN4a	1526	LKMPALRHYYFTIGWNIFDFVWVILS IVGLALSDLIQKYFVSPTLPRVIRL	1576
Nav1.5	SCN5a	1579	VKMAALRHYYFTNSWNIFDFVWVILS IVGTVLSDIIQKYFVSPTLPRVIRL	1629
Nav1.6	SCN8a	1569	LKMPALRHYYFTIGWNIFDFVWVILS IVGMFLADIIEKYFVSPTLPRVIRL	1619
Nav1.7	SCN9a	1562	LKLISLRHYYFTIGWNIFDFVWVILS IVGMFLAEMIEKYFVSPTLPRVIRL	1612
Nav1.8	SCN10a	1527	MKMPALRQYYFTNGWNVDFPIVVILS IGSLLFSAILKSLENYF-SPTLFRVIRL	1579
Nav1.9	SCN11a	1395	IKVFALRQHYFTNGWNLFDVCVWVLS IISTLVSRLEDSDISFPPTLPRVVRL	1446

Figura 17: Alinhamento dos aminoácidos do sítio 3.

Alinhamento das seqüências referentes a cada uma das 9 isoformas de canais para sódio de ratos. Os segmentos 3 e 4 do domínio IV estão representados pela seqüências de aminoácidos (em preto) nas duas extremidades do sítio 3 (em vermelho). A alça extracelular que conecta este dois segmentos e que forma o sítio 3 é o local onde o veneno do escorpião *Tityus bahiensis* se liga ao canal para sódio. A posição ocupada pelo importante glutamato E1613 do Nav1.2 de rato é mostrado em negrito. Note que a alanina em Nav1.8 (verde) e arginina em Nav1.9 (azul) substituem resíduos aminoácidos de natureza ácida.

6.2. Mecanismo de Ação do Veneno Escorpiônico:

Os venenos de escorpiões do gênero *Tityus* possuem uma alta afinidade pelos canais para sódio (De la Vega e Possani, 2007). Apesar da espécie mais estudada deste gênero ser *Tityus serrulatus* (De Lima *et al.*, 1986; Kirsch *et al.*, 1989), é sabido que o veneno de *Tityus bahiensis* também possui tanto toxina α quanto a toxina β (Becerril *et al.*, 1996; De Lima e Martin-Eauclaire, 1995). A similaridade imunológica entre venenos de escorpiões do gênero *Tityus* foi estudada por Becerril *et al.* (1996) e estava de acordo com os resultados apresentados por Nishikawa *et al.* (1994). Ambos os trabalhos consideram que os venenos das duas espécies acima citadas são semelhantes em termos de reatividade cruzada e da titulação pelo soro equino.

Cestèle *et al.* (2006) utilizaram a toxina β purificada a partir do veneno do escorpião *Centruroides suffusus suffusus* para verificar a estrutura e avaliar a função do sensor de voltagem do canal para sódio. Como resultado, observaram que a toxina se ligava ao canal e seu efeito induziria a geração de correntes iônicas mais intensas após a utilização de um pré-pulso despolarizante. Os resultados obtidos a partir da utilização de venenos ou toxinas de escorpiões do gênero *Tityus* estão de acordo entre si. Assim como nossos resultados, Campos *et al.* (2007) observaram que venenos e toxinas deste gênero de escorpiões não necessitam de um pré-pulso. Portanto, a presença do veneno de *Tityus bahiensis* é capaz de gerar correntes de amplitude cerca de 5 vezes maior que as correntes geradas na ausência do veneno, comprovando assim o efeito da toxina β .

Nossos resultados também estão de acordo com os efeitos da toxina α em canais para sódio (Becerril *et al.*, 1996; Pimenta *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2004; Campos e Beirão, 2006), nos quais observamos que em condições experimentais o veneno bruto do escorpião *Tityus bahiensis* foi capaz de interferir na cinética do canal para sódio de forma a tornar sua inativação mais lenta e de permitir o surgimento de um componente persistente da corrente que não inativou mesmo durante pulsos despolarizantes longos.

Após a verificação do efeito do veneno de *Tityus bahiensis* nas cinéticas de ativação e inativação do canal para sódio, nós realizamos a lavagem da nossa preparação com solução externa controle e observamos que o efeito do veneno é prontamente reversível. Ao contrário, a toxina utilizada por Campos *et al.* (2004); Campos e Beirão (2006) só foi removida após a utilização de pulsos intensamente despolarizantes (variando entre potenciais de + 120 a + 180 mV) com durações que variavam de 5 a 20 ms. O número de eventos para que a toxina se desligasse do canal guardava proporcionalidade com a intensidade da despolarização ou a duração do pulso despolarizante, sendo que quanto maior o tempo ou a despolarização, mais eficiente era a remoção da toxina.

Apesar de divergências entre os nossos resultados e os resultados de outros trabalhos, algumas informações apresentadas até o momento estão consistentemente de acordo. Para Cestèle *et al.* (2006) e Campos *et al.* (2007) a toxina β deve se ligar ao sensor de voltagem S4 do domínio II no estado ativado, imobilizando-o nesta posição e permitindo sua abertura com menor dependência da alteração no potencial elétrico da membrana celular. Campos *et al.* (2004), Campos e Beirão (2006), e De la Vega e Possani (2007) consideram que a toxina α pode impedir a realização do movimento completo do sensor de voltagem S4 do domínio IV, ou seja, impedindo a ação da estrutura responsável pela inativação do canal (Chanda e Bezanilla, 2002). Portanto, a ligação do veneno bruto ao canal para sódio ativado por voltagem parece confirmar os efeitos tanto da toxina α quanto da toxina β .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akopian, A.N.; Sivilotti, L.; Wood J.N., 1996. A tetrodotoxin resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379: 257–62.
- Atanassoff, P.; Hartmannsgruber, M.; Thrasher, J.; Wermeling, D.; Longton, W.; Gaeta, R.; Singh, T.; Mayo, M.; McGuire, D.; Luther, R., 2000. Ziconotide, a new N-type calcium channel blocker, administered intrathecally for acute postoperative pain. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 25 (3): 274-278.
- Anderson, P.A.V.; Roberts-Misterly, J.; Greenberg, R. M., 2005. The evolution of voltage-gated sodium channels: were algal toxins involved? *Harmful Algae* 4, 95–107.
- Bean, B.P., 2005. The Molecular Machinery of Resurgent Sodium Current Revealed. *Neuron*, 45 (2): 185-187.
- Bezanilla, F.; Armstrong, C.M., 1977. Inactivation of the Sodium Channel. *Sodium Currents Experiments. The Journal of General Physiology*, 70: 549-566.
- Becerril, B.; Corona, M.; Coronas, F.I.V.; Zamudio, F.; Calderon-Aranda, E.S.; Fletcher Jr., P.L.; Martin, B.M.; Possani, L.D., 1996. Toxic peptides and genes encoding toxin γ of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. *J. Biochem*, 313: 753-760.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Campos, F.V.; Coronas, F.I.V.; Beirão, P.S.L., 2004. Voltage-dependent displacement of the scorpion toxin Ts3 from sodium channels and its implication on the control of inactivation. *British Journal of Pharmacology*, vol. 142, p. 1115-1122.
- Campos, F.V.; Beirão, P.S.L., 2006. Effects of bound ts3 on voltage dependence of sodium channel transitions to and from inactivation and energetics of its unbinding. *Cell Biochem Biophys.*, 44(3):424-30.

- Campos, F.V.; Chanda, B.; Beirão, P.S.L.; Bezanilla, F., 2007. β -Scorpion Toxin Modifies Gating Transitions in All Four Voltage Sensors of the Sodium Channel. *J Gen Physiol.*, 130 (3): 257-68.
- Catterall, W.A., 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 20: 15-43.
- Catterall, W.A., 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26: 13–25.
- Catterall W.A.; Trainer V.L.; Baden D.G., 1992. Molecular properties of the sodium channel: a receptor for multiple neurotoxins. *Bull Soc Pathol Exot* 85: 481-485.
- Catterall, W.A.; Goldin, A.L.; Waxman, S.G., 2002. Voltage-gated sodium channels International Union of Pharmacology. *Pharmacol Rev* 57: 11-15.
- Catterall, W.A.; Goldin, A.L.; Waxman, S.G., 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57: 397–409.
- Cestèle, S.; Catterall, W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82: 883-892.
- Cestèle, S.; Yarov-Yarovoy, V.; Qu, Y.; Sampieri, F.; Scheuer, T.; Catterall, W. A., 2006. Structure and Function of the Voltage Sensor of Sodium Channels Probed by a β -Scorpion Toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (30): 21332–21344.
- Chanda, B.; Bezanilla, F., 2002. Tracking Voltage-dependent Conformational Changes in Skeletal Muscle Sodium Channel during Activation. *J. Gen. Physiol.* 120, 629–645.
- Chandy, K.G., 1991. Simplified gene nomenclature. *Nature (Lond.)*, 352: 26.
- Cox, J.J.; Reimann, F.; Nicholas, A.K.; Thornton, G.; Roberts, E.; Springell, K.; Karbani, G.; Jafri, H.; Mannan, J.; Raashid, Y.; Al-Gazali, L.; Hamamy, H.; Valente, E.M.; Gorman, S.; Williams, R.; McHale, D.P.; Wood, J.N.; Gribble, F. M.; Woods, C.G., 2006. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*, 444: 894-898.

- Cummins, T.R.; Dib-Hajj, S.D.; Black, J.A.; Akopian, A.N.; Wood, J.N.; Waxman, S.G., 1999. A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *J. Neurosci.* 19: 1–6.
- De la Vega, R.C.R.; Possani L.D., 2007. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon*, 49: 171-180.
- De Lima, M. E., Martin, M. F., Diniz, C. R.; Rochat, H., 1986. *Tityus serrulatus* toxin VII bears pharmacological properties of both beta-toxin and insect toxin from scorpion venoms. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 139, 296-302.
- De Lima, M.E., Martin-Eauclaire, M.F., 1995. The toxins purified from *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello) venom. *J. Toxicol. – Toxin Reviews* 14 (3), 457- 481.
- Diakov, A.; Korbmayer, C., 2004. A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha-subunit. *J. Biol. Chem.* 279: 38134–38142.
- Dib-Hajj, S.D.; Tyrrell, L.; Black, J.A.; Waxman, S.G., 1998. NaN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8963–68.
- Dworetzky, C.G.; Boissard, J.T.; Lum-Ragan, M.C.; McKay, D.J.; Post-Munson; J.T. Trojnacki *et al.*, 1996. Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlo beta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation, *J Neurosci* 16, 4543–4550.
- Eckert, S.P.; Taddese, A.; McCleskey, E. W., 1997. Isolation and culture of rat sensory neurons having distinct sensory modalities. *Journal of Neuroscience Methods* Volume 77, Issue 2, 183-190.
- Elliott, A. A.; Elliott, J. R., 1993. Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J. Physiol.* 463: 39 –56.
- England, J.D.; Gamboni F.; Ferguson M.A.; Levinson S.R., 1994. Sodium channels accumulate at the tips of injured axons. *Muscle and Nerve*, 17:593-598.

- Fjell, J.; Hjelmstrom, P.; Hormuzdiar, W.; Milenkovic, M.; Aglieco, F., 2000. Localization of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na_v in nociceptors. *Neuroreport* 11:199–202.
- Goldin, A.L., 1995. Voltage-gated sodium channels. In: North, R.A. (Ed.), *Handbook of Receptors and Channels: Ligand and Voltage-Gated Ion Channels*. CRC Press, Boca Raton, pp. 73–111.
- Goldin, A.L.; Barchi, R.L.; Caldwell, J.H.; Hofmann, F.; Howe, J.R.; Hunter, J.C.; Kallen, R.G.; Mandel, G.; Meisler, M.H.; Netter, Y.B.; Noda, M.; Tamkun, M.M.; Waxman, S.G.; Wood, J.N.; Catterall, W.A., 2000. Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* 28, issue 2, 365-368.
- Hamill, O.P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F., 1981. Improved patch clamp techniques for high current resolution from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391:85–100
- Hartshorne, R.P.; Catterall, W.A., 1984. The sodium channel from rat brain: Purification and subunit composition. *J Biol Chem* 259, 1667–1675.
- Heinemann, S.H.; Terlau, H.; Imoto, K., 1992. Molecular basis for pharmacological differences between brain and cardiac sodium channels. *Pflug. Arch.* 422, 90–92.
- Herzog, R.I.; Cummins, T.R.; Waxman, S.G., 2001. Persistent TTX-resistant Na⁺ current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 86: 1351–1364.
- Hille, B., 2001. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 607.
- Hodgkin, A.L.; Huxley, A.F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol (Lond)* 117:500-544.
- Hughey, R.P.; Mueller, G.M.; Bruns, J.B.; Kinlough, C.L.; Poland, P.A.; Harkleroad, K.L.; Carattino, M.D.; Kleyman, T.R., 2003. Maturation of the epithelial Na⁺ channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits. *J. Biol. Chem.* 278:37073–37082.

- Ikeda, S.R.; Schofield, G.G., 1987. Tetrodotoxin-resistant sodium current of rat nodose neurones: monovalent cation selectivity and divalent cation block. *J. Physiol.*, 389: 255-270.
- Isom, L. L., 2002. Beta subunits: players in neuronal hyperexcitability? *Novartis Found Symp* 241: 124-138.
- Kirsch, G.E.; Skatebol, A.; Possani, L.D.; Brown, A.M., 1989. Modification of Na channel gating by an alpha scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. *J. Gen. Physiol.* 93, 67-83.
- Kostyuk, P.G.; Veselovsky, N.S.; Tsyndrenko, A.Y., 1981. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurones. Sodium currents. *Neuroscience* 6, 2423-2430.
- Kontis, K.J.; Rounaghi, A.; Goldin, A.L., 1997. Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J. Gen. Physiol.* 110, 391–401.
- Kuo, C-C. ; Bean, B.P., 1994. Na⁺ channels must deactivate to recover from inactivation. *Neuron*, 12 (4): 819-829.
- Kuo, C-C; Lin, T-J.; Hsieh, C-P., 2002. Effect of Na⁺ Flow on Cd²⁺ Block of Tetrodotoxin-resistant Na⁺ Channels. *Journal of General Physiology*, 120 (2): 159-172.
- Lai, J.; Porreca, F.; Hunter, J.C.; Gold, M.S., 2004. Voltage-Gated Sodium Channels and Hyperalgesia. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44:371–97.
- Lazdunski, M.; Frelin, C.; Barhanin, J.; Lombet, A.; Meiri, H.; Pauron, D.; Romey, G.; Schmid, A.; Schweitz, H.; Vigne, P., 1986. Polypeptide toxins as tools to study voltage sensitive Na⁺ channels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 479, 204–220.
- Leão, R.M.; Kushmerick, C.; Pinaud, R.; Renden, R.; Li, G.L.; Taschenberger, H.; Spirou, G.; Levinson S.R.; von Gersdorff, H., 2005. Presynaptic Na⁺ channels: locus, development, and recovery from inactivation at a high-fidelity synapse. *J. Neurosci.*, 25 (14): 3724-3738.
- Leão, R.M.; Cruz, J.S.; Diniz, C.R.; Cordeiro, M.N.; Beirão, P.S.L., 2000. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the ω -*Phoneutria nigriventer* Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology* 39, 1756–1767

- Matzner O.; Devor M., 1994. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na¹ channels. *J Neurophysiol*, 72: 349-359.
- Meves, H.; Simard, J.M.; Watt, D.D., 1986. Interactions of scorpion toxins with the sodium channel. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 479, 113–132.
- Mitrovic, N.; George, A.L.; Horn, R., 1998. Independent versus coupled inactivation in sodium channels. Role of the domain 2 S4 segment. *J. Gen. Physiol.* 111, 451–462.
- Nascimento, D.G.; Rates, B.; Santos, D.M.; Verano-Braga, T.; Barbosa-Silva, A.; Dutra, A.A.A.; Biondi, I.; Martin-Eauclaire, M.F.; De Lima, M.E.; Pimenta, A. M.C., 2006. Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon* 47, 628–639.
- Nishikawa, A.K.; Caricati, C.P.; Lima, M.L.S.R.; Dos Santos, M.C.; Kipnis, T.L.; Eickstedt, V.R.D.; Knysak, I.; Da Silva, M.H.; Higashi, H.G.; Dias Da Silva, W., 1994. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon*, 32 (8): 989-998.
- Noda, M.; Shimizu, S.; Tanabe, T.; Takai, T.; Kayano, T.; Ikeda, T.; Takahashi, H.; Nakayama, H.; Kanaoka, Y.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, H.; Raftery, M.A.; Hirose, T.; Inayama, S.; Hayashida, H.; Miyata, T.; Numa, S., 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312:121-127.
- Ogata, N.; Tatebayashi, H., 1993. Kinetic analysis of two types of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglia. *J. Physiol. (London)* 466:9–37.
- Omri, G.; Meiri, H., 1990. Characterization of sodium currents in mammalian sensory neurons cultured in serum-free defined medium with and without nerve growth factor. *Journal of Membrane Biology* 115, 13-29.
- Patton, D.E.; Isom, L.L.; Catterall, W.A.; Goldin A.L., 1994. The adult rat brain beta 1 subunit modifies activation and inactivation gating of multiple sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem* 269 (26): 17649-55.
- Pearce D.; Kleyman T.R., 2007. Salt, sodium channels, and SGK1. *J. Clin. Invest.* 117 (3): 592-595.

- Pimenta, A.M.C.; Martin-Eauclaire, M.F.; Rochat, H.; Figueiredo, S.G.; Kalapothakis, E.; Afonso, L.C.C.; De Lima, M.E., 2001. Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). *Toxicon* 39: 1009-1019.
- Qu, W.; Moorhouse, A.J.; Rajendra, S.; Barry, P.H., 2000. Very Negative Potential for Half-inactivation of, and Effects of Anions on, Voltage-dependent Sodium Currents in Acutely Isolated Rat Olfactory Receptor Neurons. *J. Membrane Biol.* 175: 123–138.
- Rogers, J. C.; Qu, Y.; Tanada, T. N.; Scheuer, T.; Catterall, W. A., 1996. Molecular Determinants of High Affinity Binding of α -Scorpion Toxin and Sea Anemone Toxin in the S3-S4 Extracellular Loop in Domain IV of the Na⁺ Channel α Subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(27):15950–15962.
- Rush, A.M.; Brau, M.E.; Elliott, A.A.; Elliott, J.R., 1998. Electrophysiological properties of sodium current subtypes in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J. Physiol. (London)* 511: 771–89.
- Rush, A.M.; Cummins, T.R.; Waxman, S.G., 2007. Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol* 579: 1-14.
- Satin, J.; Kyle, J.W.; Chen, M.; Bell, P.; Cribbs, L.L.; Fozzard, H.A.; Rogart, R.B., 1992. A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science*, 256: 1202–1205.
- Scholz, A.; Appel, N.; Vogel, W., 1998. Two types of TTX-resistant and one TTX-sensitive Na⁺ channel in rat dorsal root ganglion neurons and their blockade by halothane. *Suppl. Eur. J. Neurosci.* 10:2547–56.
- Sharkey, R.G.; Beneski, D.A.; Catterall, W.A., 1984. Differential Labeling of the α and β 1 Subunits of the Sodium Channel by Photo reactive Derivatives of Scorpion Toxin. *Biochemistry* 23, 6078-6086.
- Stühmer, W.; Conti, F.; Suzuki, H.; Wang, X.; Noda, M.; Yahagi, N.; Kubo, H.; Numa, S., 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339, 597-603.

- Tate, S.; Benn, S.; Hick, C.; Trezise, D.; John, V., et al., 1998. Two sodium channels contribute to TTX-R sodium current in primary sensory neurons. *Nat. Neurosci.* 1: 653–55
- Terlau, H.; Olivera, B.M., 2004. *Conus* Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. *Physiol Rev* 84: 41–68, 2004.
- Terlau, H.; Heinemann, S. H.; Stühmer, W.; Pusch, M.; Conti, F.; Imoto, K.; Numa, S., 1991. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS letters* 10413, Volume 293, number 1, 2. 93-96.
- Terlau, H.; Stühmer, W, 1998. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften* 85, 437–444.
- Wang, Y.X.; Gao, D.; Pettus, M.; Phillips, C.; Bowersox, S.S., 2000. Interactions of intrathecally administered ziconotide, a selective blocker of neuronal N-type voltage-sensitive calcium channels, with morphine on nociception in rats. *Pain* 84 (2-3): 271-81.
- Wang, C-Z.; Zhang, H.; Jiang, H.; Lu, W.; Zhao, Z-Q.; Chi, C-W., 2006. A novel conotoxin from *Conus striatus*, μ -SIIIA, selectively blocking rat tetrodotoxin-resistant sodium channels. *Toxicon* 47. 122–132.
- Zhou, Z.S.; Zhao, Z.Q., 2000. Ketamine blockage of both tetrodotoxin (TTX)-sensitive and TTX-resistant sodium channels of rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research Bulletin*, Vol. 52, No. 5, pp. 427–433.