

Figura 6 – Mecanismos de *inativação* do K_V . Após a abertura do canal, este pode inativar-se por intermédio de três mecanismos distintos: “*Ball-and-chain*”, “*C-type*” e “*S6 gate*”. Figura modificada de (Yellen, 2002).

Inativação mediada por subunidades auxiliares

Subunidades auxiliares, também denominadas de β -subunidades, podem estar associadas às subunidades principais (α -subunidades) de diferentes subtipos de canais, modulando sua cinética (Isom et al, 1994). Por exemplo, alguns canais da subfamília *Shaker* ($K_V1.1$ e $K_V1.4$) podem se associar a uma β -subunidade ($K_V\beta1$) citoplasmática que estará envolvida com o aumento da velocidade da cinética de *inativação* (Rettig et al, 1994). Outro exemplo é a modulação da cinética de *inativação* de subtipos de canais da subfamília de K_V4 pela $K_V\beta2$ (Nakahira et al, 1996). No entanto, nem todas as β -subunidades auxiliares estão estritamente relacionadas à cinética do canal, como é o caso da subunidade $K_V\beta2$, a qual também está envolvida com a facilitação da formação do tetrâmero e o aumento e/ou inibição da expressão

do canal de determinados subtipos de K_V (Xu & Li, 1998). Mais recentemente, uma proteína chaperona (KChAP) também foi caracterizada como moduladora da função e expressão dos subtipos de canais $K_V1.3$, $K_V2.1$ e $K_V4.3$ (Kuryshv et al, 2000).

Seletividade iônica

A seletividade dos canais aos diferentes íons é consequência de diferentes fatores físico-químicos, energéticos e elétricos. Os canais voltagem – dependentes de K^+ são extremamente seletivos aos íons K^+ , porém permitem também a passagem dos íons com raios atômicos semelhantes ao do K^+ , tais como o Rubídio e o Césio, cuja permeabilidade assemelha-se à do íon K^+ (permeabilidades: $K^+ \cong Rb^+ > Cs^+$). No entanto, a permeabilidade a íons com raios atômicos menores (por exemplo: Na^+ e Li^+) é praticamente nula e, por isso, muitos estudos vêm sendo realizados para se elucidar o mecanismo envolvido na seletividade iônica (Doyle et al, 1998).

O poro do canal voltagem – dependentes de K^+ é a região de conexão entre as duas hélices (denominadas de “*inner hélix*” e “*outer helix*”) dos segmentos transmembranares S5 e S6. É formado por aproximadamente 30 aminoácidos e, consiste da “*região do Turret*”, da “*Hélice do poro*” e, do “*Filtro de Seletividade*”, onde se encontra uma sequência de três aminoácidos Gly – Tyr – Gly (denominada de “*signature sequence*”), a qual é encontrada em todos os canais de K^+ , desde os que possuem somente dois segmentos transmembrana, até os canais voltagem – dependentes (Choe, 2002).

Tanto no meio extracelular, quanto no meio intracelular, a região de entrada dos íons é carregada negativamente, para que se tenha uma atração elétrica aos cátions (consequentemente uma alta concentração de cátions) e, uma repulsão dos ânions. Ao longo da cavidade interna do poro, a qual é preenchida com água, tem-se uma predominância de aminoácidos hidrofóbicos, os quais são importantes, pois atuam como uma superfície inerte, incapaz de interagir com os íons K^+ e influenciar na sua difusão ao longo do canal. Por sua vez, a água que está presente na cavidade interna do poro é

importante para a estabilização do campo eletrostático do íon K^+ , facilitando sua difusão ao longo da membrana plasmática. (Doyle et al, 1998; MacKinnon, 1991b).

O *Filtro de Seletividade* é extremamente importante para a seletividade iônica, uma vez que os átomos de oxigênio do grupo carbonila dos aminoácidos, presentes em cada uma das quatro subunidades do canal, interagem com os íons K^+ para desidratá-lo. Esta desidratação é importante, pois quando em solução, os íons K^+ estão solvatados, ou seja, cercados por uma “gaiola” de átomos polares de oxigênio das moléculas de água, que fisicamente impediriam a passagem dos íons pela abertura do poro (~2.5 Å de diâmetro). Dessa forma, para que a passagem seja possível, o íon deve ser desidratado e, para que o campo eletrostático do cátion seja mantido estável, os átomos de oxigênio da água são substituídos pelos átomos de oxigênio do grupo carbonila, dos aminoácidos do *Filtro de Seletividade* (Biggin et al, 2000; Choe, 2002).

Ao longo do *Filtro de Seletividade*, têm-se cinco repetições de grupos carbonilas (dos aminoácidos Thr–Val–Gly–Tyr–Gly) que interagem com os íons K^+ , formando seis sítios de ligação. Quatro destes sítios se localizam internamente e, dois deles nas extremidades (um no meio extracelular e outro no meio intracelular) do *Filtro de Seletividade*. Os quatro sítios de interação internos estão localizados entre os grupos carbonila de dois aminoácidos consecutivos, conferindo ao íon K^+ oito pontos de interação. No meio extracelular, o íon K^+ interage com quatro átomos de oxigênio da água e com quatro grupos carbonila das Glicinas (Gly) de cada uma das subunidades (uma vez que o momento dipolo do grupo carbonila é mais forte que o das moléculas de água). Já no meio intracelular, o potássio torna a interagir completamente com a água (Choe, 2002). Por sua vez, os íons K^+ que se encontram alinhados ao longo do *Filtro de Seletividade* exercem uma força de repulsão entre si, forçando o deslocamento unidirecional, no sentido do seu gradiente eletroquímico (Biggin et al, 2000; Choe et al, 1999; Hille & Schwarz, 1978).

Para se compreender o motivo da baixa permeabilidade do íon Na^+ , se comparado ao íon K^+ (íons K^+ são pelo menos 10.000 vezes mais permeáveis

que os íons Na^+), deve-se levar em consideração a energia envolvida na ligação entre o canal e o íon. Medidas experimentais *in silico* demonstraram que a barreira energética necessária para a condutividade do íon Na^+ é maior que a do K^+ , uma vez que seu raio atômico é menor (raios atômicos: Na^+ (0.95 Å) e K^+ (1.33 Å)). Essa explicação, apesar de paradoxal, está diretamente relacionada à dinâmica molecular do *Filtro de Seletividade*, ou seja, esta região do canal não é capaz de se contrair suficientemente para que o íon Na^+ interaja com os quatro grupos carbonila presentes no poro (sendo capaz de interagir com somente dois), consequentemente aumentando sua energia eletrostática e diminuindo sua permeabilidade ao longo do canal. Contrariamente, o raio do íon K^+ permite que este se encaixe perfeitamente aos grupos carbonila do poro do canal e, então seja conduzido rapidamente através do canal (Figura 7) (Armstrong, 2003; Berneche & Roux, 2001; Dryga et al, 2012; Morais-Cabral et al, 2001; Zhou et al, 2001).

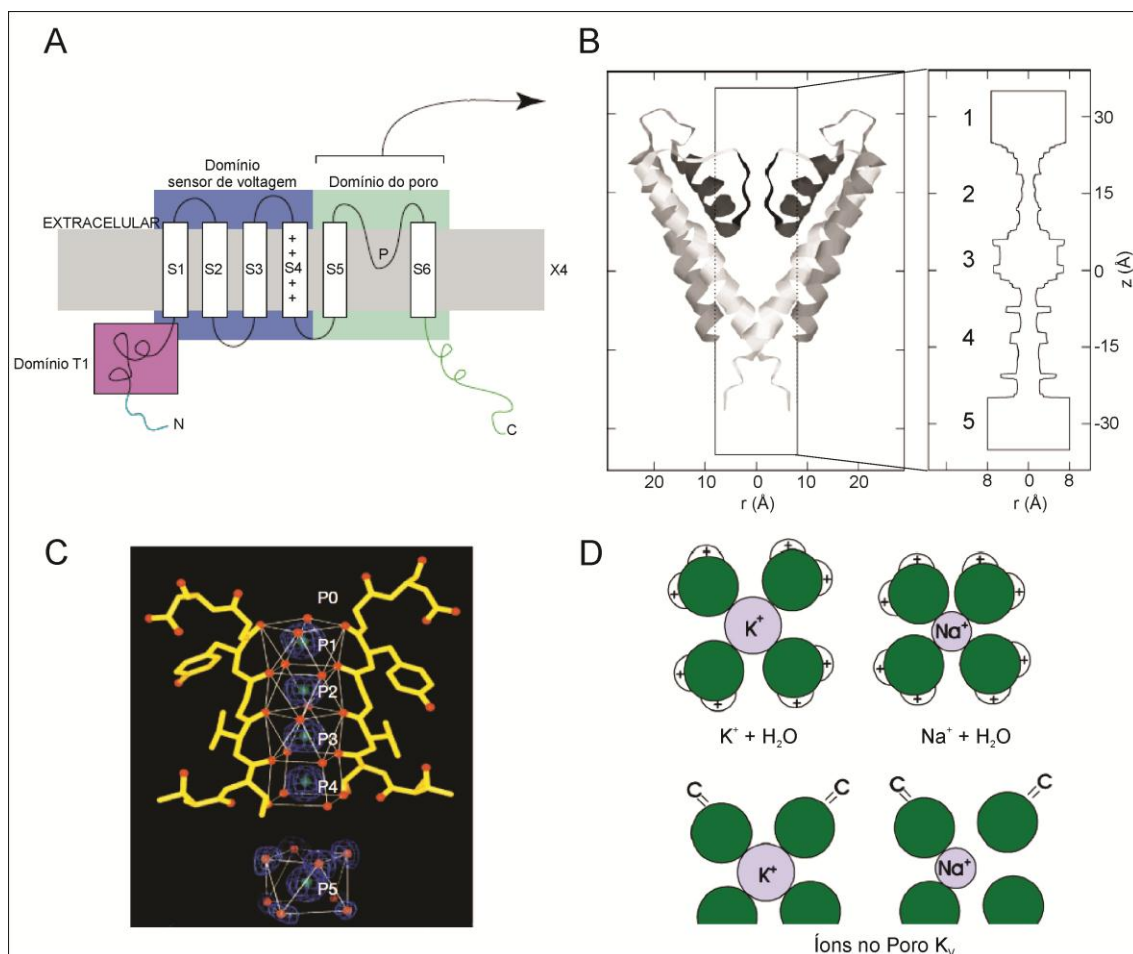


Figura 7 – Propriedades físico-químicas envolvidas na seletividade iônica. **A** – Estrutura de uma subunidade de um canal voltagem – dependente de K^+ , apresentando o “domínio sensor de voltagem” e o “domínio do poro”. **B** – Topologia do “domínio do poro” do canal, onde 1 indica a região extracelular; 2, *Filtro de Seletividade*; 3, câmara interna contendo água e aminoácidos hidrofóbicos; 4, poro hidrofóbico para desidratação dos íons K^+ ; 5, região do canal exposta ao meio intracelular. **C** – Representação do *Filtro de Seletividade* com os seis sítios de ligação para o íon K^+ . **D** – Ilustração da solvatação dos íons Na^+ e K^+ e quando estão em contato com os grupos carbonila dos aminoácidos do *Filtro de Seletividade*. Figura modificada de (Allen et al, 2000; Armstrong, 2003; Choe, 2002; Yellen, 2002)

1.2.3. Farmacologia e Importância médica (“Canalopatias”)

Em paralelo ao notável progresso da compreensão da diversidade molecular, estrutural e funcional dos canais voltagem – dependentes de K^+ , um número cada vez mais crescente de descobertas têm ligado mutações genéticas e/ou disfunções destes canais a várias doenças. A caracterização mais aprofundada dos mecanismos moleculares envolvidos nessas doenças contribuiu para sua etiologia e permitiram o desenvolvimento de estratégias para o tratamento (Shieh et al, 2000).

Vários subtipos de canais de K^+ de diferentes subfamílias, com diferentes cinéticas de *ativação/inativação* e *desativação*, regulam a frequência cardíaca, definindo o potencial de repouso da membrana, a amplitude e duração do potencial de ação e seus períodos refratários (Barry & Nerbonne, 1996; Roden & Kupersmidt, 1999; Snyders, 1999). A insuficiência cardíaca pode ocorrer por consequência de inúmeras etiologias, tais como o enfarte do miocárdio, hipertensão e miocardite (Wilson, 1997). Porém, a insuficiência cardíaca é sempre caracterizada pelo prolongamento do potencial de ação, decorrente de uma alteração da cinética de *ativação* e *inativação* dos subtipos de $K_v1.4$ e $K_v4.2$ (Dixon et al, 1996; Kong et al, 1998).

A Síndrome do QT longo é um tipo de taquiarritmia ventricular congênita, caracterizada por uma repolarização ventricular prolongada ou tardia, gerando um alongamento temporal entre o início da onda Q e o término da onda T, ao longo do ciclo elétrico cardíaco. Esta síndrome está relacionada a um risco elevado de fibrilação ventricular, podendo evoluir para uma síncope e morte súbita (Ackerman & Clapham, 1997; Sanguinetti & Spector, 1997; Vincent et al, 1999). Mutações que ocorrem na região Amino-terminal do subtipo de canal *hERG* causam um retardo na sua *inativação* e, conseqüentemente, um prolongamento no intervalo QT. Pacientes com estas mutações são caracterizados como tendo a Síndrome do QT longo do tipo 2, a qual pode ter diferentes graus de implicações clínicas, dependendo da diversidade das mutações (Chen et al, 1999; Smith et al, 1996; Spector et al, 1996).

Outra doença envolvendo o coração é a Fibrilação Atrial, a qual pode ser assintomática ou causar palpitação, fadiga, cansaço decorrente de esforços físicos, falta de ar, desmaios, tontura e dor no peito. O subtipo de $K_V1.5$ é expresso numa variedade de tecidos em humanos, porém sua presença exclusiva na musculatura dos átrios do coração, tornou-o foco de grande interesse da indústria farmacêutica. Este canal é responsável pela repolarização do potencial de ação atrial, através de uma condutância específica de íons K^+ , denominada de “*ultra rapid delayed rectifier*” (IKur) e, em pacientes com Fibrilação Atrial, este tipo específico de corrente apresenta uma disfunção (Fedida et al, 1993; Wang et al, 1993).

Dentre as doenças neuronais, pode-se destacar a Ataxia Episódica, uma doença autossômica, na qual os indivíduos afetados têm episódios breves de falta de coordenação dos movimentos (ataxia), desencadeada por estresse físico e/ou emocional. Mutações encontradas em pacientes com Ataxia Episódica são responsáveis pela (1) redução da expressão do subtipo de $K_V1.1$ no sistema nervoso central e periférico e (2) alteração da função do $K_V1.1$, causando uma *ativação* do canal em valores mais positivos de membrana (entre 10 a 40 mV), aumento da cinética de *desativação*, ou ainda alteração da taxa de *inativação* do tipo “*C-type*” (Adelman et al, 1995; Boland et al, 1999; Bretschneider et al, 1999).

O subtipo de $K_v1.1$, bem como o subtipo de $K_v1.6$, também teve sua disfunção relacionada a doenças neuromusculares. Essa disfunção causa uma hiperexcitabilidade das fibras musculares, as quais, por conseguinte, causam miopatias miotônicas e paralisias periódicas, doenças estas que se caracterizam por rigidez muscular, fraqueza e dores intermitentes ou constantes. Outro exemplo é a Síndrome de Isaac, uma neuromiotonia adquirida, que também está relacionada aos canais da subfamília *Shaker*. Nesta síndrome, os anticorpos produzidos pelo próprio organismo bloqueiam a corrente dos $K_v1.1$ e $K_v1.6$, causando a hiperexcitabilidade dos nervos motores periféricos (Hart et al, 1997; Nagado et al, 1999; Shillito et al, 1995).

O subtipo de $K_v1.3$ é expresso predominantemente em linfócitos humanos e tem sido amplamente explorado como alvos farmacológico para a terapia imunossupressora. Bloqueadores seletivos desses canais despolarizam a membrana plasmática, atenuando o fluxo de Ca^{2+} para o meio intracelular. Inibindo, conseqüentemente, a ativação das células T quando *in vitro* e, em condições *in vivo*, causam a imunossupressão do paciente. Portanto, este subtipo de canal é muito importante para tratamento de doenças autoimunes, tais como a esclerose múltipla, psoríase e hepatite autoimune (Cahalan & Chandy, 1997).

Por fim, entre muitos outros exemplos que podem ser citados do envolvimento de canais voltagem – dependentes de K^+ em doenças, vale ressaltar a doença de Alzheimer. Esta doença é a causa mais comum da diminuição progressiva da função cognitiva, perda de memória e deterioração física em idosos. É caracterizada pela presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares e placas neuríticas extracelulares, causados pelo depósito de um peptídeo (39 a 43 amino ácido) β -amilóide, resultante da degradação proteolítica da proteína precursora β -amilóide (β -APP) (Shieh et al, 2000).

Na doença de Alzheimer, verifica-se uma significativa morte celular neuronal no córtex temporal e parietal, hipocampo, amígdala e prosencéfalo basal do sistema colinérgico. Vários mecanismos têm sido associados a essa doença neurodegenerativa, como, por exemplo, alterações no metabolismo da

β -APP, na transmissão colinérgica, na homeostase do Ca^{2+} , no metabolismo oxidativo e nos sistemas de transdução de sinal mediados pela proteína cinase C (Hensley et al, 1994; Ito et al, 1994; Mattson et al, 1993; Yankner, 1996).

Estudos *in vitro* com células colinérgicas (SN56), demonstraram que a presença do peptídeo β -amilóide na cultura celular aumentava em 44 a 66% a corrente de íons K^+ dos canais da subfamília *Shaker* e, diminuía a viabilidade celular. Também se demonstrou que a despolarização prolongada da membrana ou o bloqueio da corrente mediada pela aplicação de TEA, causavam um aumento da duração do potencial de ação e, elevava os níveis de Ca^{2+} intracelular, prevenindo em mais de 68% a toxicidade mediada pelo peptídeo β -amilóide. Tais achados permitiram inferir que os canais da subfamília *Shaker* desempenham um importante papel na regulação da toxicidade mediada pela β -amilóide (Colom et al, 1998)

1.3. Canais voltagem – dependentes de K^+ são alvos biológicos de neurotoxinas animais

Ao longo da evolução, várias espécies de animais desenvolveram um arsenal de compostos tóxicos para a captura de presas, defesa contra predadores e disputas territoriais. Esses animais desenvolveram um aparelho especializado responsável pela produção da peçonha e sua inoculação no organismo de outro animal. A maioria das peçonhas são misturas complexas de compostos biologicamente ativos, muitas vezes com ações sinérgicas, mas que também podem atuar isoladamente, sendo capazes de alterar a homeostasia do outro animal (Chippaux & Goyffon, 2006).

Animais peçonhentos fornecem um “reservatório” praticamente inexplorado de milhões de peptídeos neurotóxicos, com sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais altamente diversas, que são extremamente seletivos, sendo capazes de bloquear ou ativar canais voltagem – dependentes de K^+ de importância clínica e terapêutica e, por isso, passaram

a ser importantes ferramentas farmacológicas para o estudo da estrutura e função desses canais (Lewis & Garcia, 2003).

As anêmonas do mar, assim como outros animais peçonhentos, produzem neurotoxinas que atuam em canais voltagem – dependentes de K^+ e, inclusive, já tiveram sua importância farmacológica comprovada (Chandy et al, 1998). No entanto, suas peçonhas vêm sendo pouco exploradas, se comparada a de outros animais peçonhentos e, por isso, decidimos fazer das neurotoxinas de anêmonas do mar uma ferramenta para a análise fisiológica dos canais voltagem – dependentes de K^+ .

1.4. Anêmonas do mar – Aspectos ecológicos, fisiológicos e evolutivos

O Filo Cnidaria é constituído por animais aquáticos bênticos e pelágicos, divididos nas classes Anthozoa, Hydrozoa, Scyphozoa e Cubozoa. Apesar dos diferentes formatos e habitats, o corpo de todos os cnidários possui simetria radial e o desenvolvimento embrionário é formado por duas camadas celulares: a ectoderme que recobre a parte externa do corpo e a endoderme que envolve o seu interior, e entre estas camadas celulares há a mesoglêia. Não possuem uma especialização celular em diferentes órgãos e o sistema nervoso é difuso ao longo do corpo. Estes animais divergiram da linhagem dos animais com simetria bilateral (Bilateria) logo no início do estágio evolutivo, há cerca de 600 milhões de anos (Ball et al, 2004).

Anêmonas do mar pertencem à classe Anthozoa e são agrupadas dentro da ordem Actiniaria, com pelo menos 45 famílias já descritas. São predadores ancestrais que vivem no ambiente marinho, desde o costão rochoso até regiões oceânicas profundas, espalhadas pelo mundo todo e podem ou não estar em simbiose com peixes, crustáceos, zooxantelas e dinoflagelados (Dunn, 1981). Possuem o corpo formado por um pé adesivo, com uma coluna levando a um disco oral com tentáculos que circundam a abertura central da boca. Nos tentáculos e em outras partes do corpo são encontradas cnidócitos,

células compostas por uma cnida, organela subcelular também conhecida como cnidocisto, a qual se especializa estrutural e funcionalmente em:

1- Espirocistos, os quais são constituídos de mucoproteínas ou glicoproteínas que ajudam na captura da presa, pois aderem ao seu corpo;

2- Pticocistos, também são compostos por mucoproteínas, porém são utilizados na fixação do animal ao substrato;

3- Nematocistos, utilizados para captura de presas, defesa contra predadores e disputas territoriais (Brusca & Brusca, 2003).

Nos nematocistos é encontrado um túbulo enrolado que é geralmente farpado para facilitar a penetração e a fixação na presa ou predador. O seu disparo é possível devido ao aumento da pressão osmótica causada por um gradiente de prótons que atravessa a membrana que envolve o nematocisto. Quando a anêmona sofre um estímulo químico ou mecânico, ocorre a eversão do túbulo que é expelido através do opérculo na região apical celular (Anderson & Bouchard, 2009). Dessa forma, a peçonha contida nos nematocistos penetra na presa, causando sua imobilização, ou ainda, podendo ser útil na defesa contra predadores e para disputas territoriais (Thorington & Hessinger, 1998).

1.5. Composição do veneno das anêmonas do mar

Em geral, as peçonhas das anêmonas do mar são complexas misturas contendo proteínas e peptídeos com diferentes propriedades, além de compostos não protéicos, derivados do metabolismo secundário. Estes compostos divergem de uma espécie para outra, quanto a sua estrutura e seu potencial alvo de ação. Alguns são encontrados em várias peçonhas, enquanto outros são espécie-específicos (Frazao et al, 2012). Os componentes já descritos nas peçonhas das anêmonas são:

1- Fosfolipases A_2 , capazes de romper fosfolipídios de membranas de células nervosas e musculares, causando danos aos nervos e inflamações musculares (Talvinen & Nevalainen, 2002);

2- Citolisinas que atuam em membranas celulares, causando alterações na osmorregulação e conseqüentemente a lise celular (Anderluh & Macek, 2002);

3- Neurotoxinas que interferem na transmissão do impulso nervoso, afetando canais voltagem-dependente de sódio e potássio e canais iônicos sensíveis à acidez (Castaneda & Harvey, 2009; Diochot et al, 2004; Honma & Shiomi, 2006);

4- Compostos não protéicos (purinas e aminas biogênicas) que se acredita estarem envolvidos na dor durante o envenenamento (Welsh, 1964; Zaharenko et al, 2012).

1.5.1. Neurotoxinas – Importância, seletividade e mecanismos de ação

Neurotoxinas interferem com a transmissão do impulso nervoso, modificando a função de algum tipo particular de canal na membrana do nervo ou músculo. São ferramentas muito importantes para o estudo dos diferentes tipos de canais presentes em membranas excitáveis e, por conseguinte, para investigar os mecanismos envolvidos durante a transmissão de impulsos nervosos. Algumas delas são muito seletivas e por isso têm permitido rápidos progressos na identificação e caracterização de novos receptores de membrana (Rees & Bilwes, 1993).

Os peptídeos neurotóxicos de anêmonas do mar possuem massas moleculares que variam entre 2,5 e 6 KDa e têm como principal alvo os canais iônicos. Até o momento, o que mais se tem descrito na literatura são neurotoxinas que atuam sobre canais voltagem-dependente de sódio (Na_v) e potássio (K_v) e um pouco sobre canais iônicos sensíveis à acidez (ASIC`s). Em geral, os estudos de neurotoxinas de anêmonas têm sido realizados com o intuito de elucidar:

1- Aspectos evolutivos das sinapses, diferenciação tecidual e desenvolvimento (Dunn et al, 2006; Holland, 2004; Miller et al, 2005);

2- Comunicação e a simbiose química (Mebis, 1994);

3- Importância médica, tendo em vista que algumas espécies são nocivas aos seres humanos durante o envenenamento (Sanchez-Rodriguez et al, 2001);

4- Importância farmacológica e fisiológica exercida pelos efeitos biológicos dos diferentes compostos neuroativos encontrados na peçonha (Oliveira et al, 2006; Pennington et al, 1995a);

5- Potencial terapêutico desses compostos (Beeton et al, 2002; Chandy et al, 1998; Kalman et al, 1999).

1.5.2. Toxinas que atuam em canais voltagem – dependentes de K^+

Atualmente são conhecidos pelo menos 23 diferentes peptídeos, sendo 10 purificados de seis espécies da família Actiniidae, 7 purificados de anêmonas da família Stichodactylidae, 3 da família Thalassianthidae e um da família Hormathiidae. Essas toxinas são classificadas em quatro diferentes grupos de acordo com sua estrutura primária e atividade biológica (Castaneda & Harvey, 2009; Honma & Shiomi, 2006).

Toxinas do tipo 1

Doze peptídeos que possuem entre 34 e 37 aminoácidos representam este grupo: Aek (da anêmona do mar *Actinia equina*) (Minagawa et al, 1998), AETX-K (*Anemonia erythraea*) (Hasegawa et al, 2006), AsKs (*A. sulcata*) (Schweitz et al, 1995), Bgk (*Bunodosoma granulifera*) (Cotton et al, 1997), HmK (*Radianthus magnifica*) (Gendeh et al, 1997), ShK (*Stichodactyla helianthus*) (Pennington et al, 1995a), κ 1.3-SHTX-Sha1a (*S. haddonii*), κ 1.3-SHTX-Sg1a (*S. gigantean*), κ 1.3-SHTX-Sm1a (*S. mertensii*), κ 1.3-TLTX-Ca1a (*Cryptodendrum adhaesivum*), κ 1.3-TLTX-Hh1a (*Heterodactyla hemprichi*), e κ 1.3-TLTX-Ta1a (*Thalassianthus aster*) (Yamaguchi et al, 2010). Estes peptídeos possuem seis resíduos de Cisteína que formam um padrão de pontes dissulfeto C1–C6, C2–C4 e C3–C5 e apresenta uma sequência primária com moderada similaridade estrutural (entre 39 e 100%).

Recentemente, propôs-se a subdivisão em subtipos 1a e 1b. O subtipo 1a é caracterizado pela presença de quatro resíduos de aminoácidos entre a segunda e a terceira Cisteína, sendo composto por nove toxinas isoladas de anêmonas do mar das famílias Actiniidae, Stichodactylidae e Thalassianthidae. O subtipo 1b é formado por três peptídeos que possuem oito aminoácidos entre a segunda e a terceira Cisteína, os quais foram isolados de anêmona do mar exclusivamente da família Actiniidae (Yamaguchi et al, 2010).

Dentre estas toxinas, somente a ShK e a BgK tiveram suas estruturas determinadas, através de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear. Em ambos os casos há uma predominância de uma estrutura secundária em α hélices. ShK possui um motivo estrutural denominado de '*helical capping motif*' (ou $3_{10}\alpha$), pois possui três α hélices, sendo que uma delas é formada por apenas três aminoácidos e as outras duas estão dispostas paralelamente (Lanigan et al, 2001; Tudor et al, 1996) . Por sua vez, a BgK é denominada de '*helical cross-like motif*', uma vez que possui três α hélices e uma delas encontra-se perpendicular às outras duas (Dauplais et al, 1997). Dessa forma, apesar da baixa similaridade entre as estruturas primárias das toxinas do tipo 1, estas são caracterizadas como tendo um motivo estrutural ' *α -type*'.

Estas toxinas atuam inibindo a corrente do K_v através da obstrução física do poro do canal, ou seja, através de um conjunto de aminoácidos que interagem com a região do poro do K_v , causando a obstrução da passagem dos íons K^+ . São por isso, denominadas de bloqueadoras do poro, pois não interferem diretamente na cinética de *ativação* do canal (Diochot & Lazdunski, 2009). Em geral, toxinas bloqueadoras do poro dos canais da subfamília *Shaker* (K_v1) possuem dois aminoácidos, distantes $6,6 \pm 1 \text{ \AA}$, que formam uma "*díade funcional*" (Dauplais et al, 1997). Esta díade é formada por um aminoácido polar (Lys ou Arg), cuja cadeia lateral interage com os aminoácidos do poro do canal (Asp ou Glu) e um aminoácido aromático/hidrofóbico (Tyr, Phe ou Leu), que interagirá através de forças hidrofóbicas com os aminoácidos Tyr e Trp do canal. Estes aminoácidos participam da interação com o canal, aumentando sua afinidade, porém não são responsáveis pela sua seletividade. No caso da ShK e da BgK, a "*díade funcional*" é formada pelos aminoácidos

Lys22 e Tyr 23 e, Lys25 e Tyr26, respectivamente (Baell et al, 2002; Dauplais et al, 1997; Sabatier et al, 2004a; Sabatier et al, 2008; Sabatier et al, 2005).

A toxina ShK foi primeiramente caracterizada como bloqueadora do K_V1.3 (Pennington et al, 1995a; Pennington et al, 1995b), porém também é capaz de bloquear a corrente dos subtipos de K_V1.1–4 e K_V1.6 (Castaneda & Harvey, 2009) e, mais recentemente, foi demonstrado o bloqueio da corrente do K_V3.2 (Yan et al, 2005). Devido à alta potência com que inibe a corrente do K_V1.3, diversos trabalhos focaram na caracterização de seu farmacofóro, uma vez que este subtipo de K_V está envolvido com diversas patologias humanas, como já detalhado anteriormente (Chandy et al, 2004; Monaghan et al, 2007). Experimentos de mutagênese sítio-dirigida, em que se substituíram os aminoácidos da ShK por uma alanina, provaram que os resíduos Ile7, Arg11, Hys19, Ser20, Lys22, Tyr23, Arg24 e Phe27 estão envolvidos na interação com os aminoácidos Asp376 e Ser379 da *região do Turret* do K_V1.3 e, Tyr400, Gly401, Asp402, Hys404 e Val406 do *Filtro de Seletividade* (Baell et al, 2002; Beeton et al, 2011; Harvey et al, 2005; Rashid & Kuyucak, 2012).

A BgK teve inicialmente sua atividade caracterizada em canais das subfamílias *Shaker* (K_V1) e *Shaw* (K_V3), sendo seletiva para os subtipos de K_V1.1–3 (Cotton et al, 1997). Posteriormente, também se comprovou sua seletividade para o subtipo de K_V1.6 (Racape et al, 2002) e para canais de potássio ativados por Ca²⁺ (Rauer et al, 1999). Estudos de mutagênese sítio-dirigida realizados com a BgK demonstraram que a substituição da Lys25 causou a maior perda de afinidade da toxina e, quando se substituíram os aminoácidos Phe6, His13, Ser23 e Tyr26, também se observou uma perda significativa da potência da toxina (ente 6 e 46 vezes) (Dauplais et al, 1997).

Através de ensaios eletrofisiológicos *in silico*, Guilquin e colaboradores propuseram uma superfície de interação entre a BgK e o K_V1.1: os três resíduos mais importantes são a Ser23, a Lys25 e a Tyr26 que interagiriam com a Tyr375, a Tyr379 e a Asp377 do K_V1.1, respectivamente. A Lys25 se liga através de interações eletrostáticas entre sua cadeia lateral e o grupo hidroxila da Tyr375. A Ser23 forma uma ligação de hidrogênio com a Tyr379 e a Tyr26 se liga através de interações hidrofóbicas com a Asp377. As interações entre a

Arg3 e a Lys7 com o Glu353 de uma das subunidades do canal e da His13 com o Glu353 de outra subunidade, formariam um segundo ponto de ancoramento ao canal (Gilquin et al, 2005; Gilquin et al, 2002).

As outras toxinas desse tipo tiveram sua atividade comprovada através de ensaios de inibição competitiva da ligação da ^{125}I - α -dendrotoxina ou ^{125}I -dendrotoxina-I, em membranas de sinaptossomas de rato e, portanto, sua seletividade não foi determinada. Porém, pode se afirmar que possivelmente atuem em $K_V1.1$, $K_V1.2$ e/ou $K_V1.6$, pois são os alvos biológicos descritos para estas dendrotoxinas (Gendeh et al, 1997; Hasegawa et al, 2006; Minagawa et al, 1998; Yamaguchi et al, 2010). Vale ressaltar que a toxina AsKs também teve sua atividade comprovada em $K_V1.2$, utilizando-se como sistema de expressão ovócitos de *Xenopus laevis* (Schweitz et al, 1995).

Toxinas do tipo 2

Os peptídeos geralmente conhecidos como Kaliclodinas ou AsKCs (AsKC1, AsKC2 e AsKC3) da anêmona *Anemonia sulcata* e o peptídeo APEKTx1, da anêmona *Anthopleura elegantissima*, representam este segundo grupo. Possuem entre 58 e 63 aminoácidos e atuam em canais da subfamília *Shaker*. A APEKTx1 teve sua seletividade caracterizada através da expressão de subtipos de canais voltagem dependentes das subfamílias *Shaker*, *Shaw*, *Shab*, *Shal* e *EAG* em ovócitos de *Xenopus laevis*, sendo uma bloqueadora específica de $K_V1.1$ (Peigneur et al, 2011; Schweitz et al, 1995). Por sua vez, as AsKCs tiveram sua atividade comprovada através de ensaios de inibição competitiva indireta da ligação da I-dendrotoxina marcada com ^{125}I em $K_V1.2$.

Estas toxinas também atuam como inibidores de protease, apresentando similaridade estrutural com inibidores da tripsina pancreática bovina (BPTI). Entretanto, comparando-se os resíduos da BPTI, que estão envolvidos na ligação com a tripsina (Lys15, Ala16, Arg17 e Iso19), com os das toxinas do tipo 2, observa-se que estas apresentam uma substituição Iso19Pro, responsável por uma significativa perda em sua atividade inibitória da tripsina (Peigneur et al, 2011; Schweitz et al, 1995).

Toxinas do tipo 3

Este terceiro tipo tem um motivo estrutural semelhante à família das β -defensinas, que inclui peptídeos de várias classes de organismos, envolvidos com atividades antimicrobianas, analgésicas, mionecrótica e neurotóxicas (Torres & Kuchel, 2004; Yount et al, 2009). As toxinas BDS-I e BDS-II, extraídas da anêmona do mar *A. sulcata* (Diochot et al, 1998) e a APETx1 da *A. elegantíssima* (Diochot et al, 2003) são as representantes deste tipo. A sigla BDS é uma abreviação de '*Blood Depressing Substances*', uma vez que a toxina BDS-I foi primeiramente caracterizada como tendo atividades anti-hipertensiva e antiviral (Beress et al, 1985). A estrutura da BDS-I foi determinada em 1989 e é formada por quatro fitas β , sendo que três fitas β se encontram dispostas antiparalelas e uma está localizada na região N-terminal (Driscoll et al, 1989; Formankay et al, 1989).

BDS-I e BDS-II possuem 43 aminoácidos com 95,3% de identidade, sendo que seis são resíduos de Cisteína que formam um padrão: C1–C5, C2–C4, C3–C6. Em concentrações nanomolares são capazes de bloquear a corrente dos íons K^+ dos subtipos de $K_V3.1$, $K_V3.2$ e $K_V3.4$ (Diochot et al, 1998; Yeung et al, 2005). No entanto, em altas concentrações também causam um bloqueio da corrente, em torno de 2 a 20%, dos subtipos de $K_V1.1-5$, $K_V2.1-2$ e $K_V4.1$ e $K_V4.3$ (Diochot & Lazdunzki, 2009). O bloqueio da corrente dos canais da subfamília *Shaw* (K_V3) ocorre através da modulação da cinética de *ativação*, ou seja, a toxina se liga ao sensor de voltagem do canal, mantendo-o no seu estado de repouso. Causando um deslocamento, para valores mais positivos, da voltagem necessária para a *ativação* do canal, o que conseqüentemente acarretaria um retardo em sua cinética de *ativação*. A mutagênese sítio dirigida dos resíduos do sensor de voltagem do $K_V3.2$ (Glu329, Val330, Gly331, Gly334 e Leu347) causaram perda significativa do bloqueio da corrente (Wang et al, 2007; Yeung et al, 2005). A toxina BDS-I também se mostrou capaz de modular a cinética de *inativação* de canais voltagem-dependentes de Na^+ (Na_V), assim como ocorre com as toxinas de anêmonas do mar: ATX-II, Anthopleurin B, AFT-II e Bc-III que atuam no sítio 3 do Na_V (Catterall et al, 2007). A BDS-I atua retardando a *inativação* dos subtipos de $Na_V1.3$ e $Na_V1.7$, quando em baixas

concentrações e, em altas concentrações, também é capaz de atuar em $Na_v1.1$ e $Na_v1.6$ (Liu et al, 2012).

APETx1 possui 43 aminoácidos e o mesmo padrão de Cisteínas das BDS-I e BDS-II, no entanto, sua identidade estrutural é de apenas 40 %. Esta toxina é capaz de bloquear a corrente de $K_v4.1$ somente quando em altas concentrações e, por isso, foi classificada como sendo seletiva para canais cardíacos e neuronais de humanos dos subtipos *hERG1* e *hERG3*. Assim como as BDS-I e II, a APETx1 modula a cinética *de ativação* e *inativação* destes canais através da ligação com aminoácidos do segmento S3 do canal. O aminoácido negativo Ácido Glutâmico, na posição 518 (Glu518) do canal é crucial para a interação com o aminoácido positivo Lys18 presente na toxina. Além disso, o aminoácido glicina (Gly514) é responsável por interações hidrofóbicas com os aminoácidos Leu34, Phe33 e Tyr32 da APETx1 (Diochot & Lazdunski, 2009; Diochot et al, 2003; Zhang et al, 2007). Sua estrutura tridimensional também é formada por quatro fitas β , sendo uma na região N-terminal e as outras três estão dispostas de maneira antiparalelas (Chagot et al, 2005a). Recentemente, demonstrou-se que a APETx1 (1 μ M) também é capaz de bloquear a corrente de canais voltagem – dependentes de Na^+ de mamíferos, sem alterar sua cinética de *inativação* (Peigneur et al, 2012).

Toxinas do tipo 4

A toxina SHTX-I, da anêmona *Stichodactyla haddoni*, foi caracterizada através de ensaios de inibição competitiva da ligação da ^{125}I - α -dendrotoxina, em membranas de sinaptossomas de rato. Apesar de não se ter informações a respeito da atividade da SHTX-II, sugere-se que este peptídeo também bloqueie a corrente de K_v , devido à sua alta identidade com a SHTX-I. Estas toxinas possuem quatro Cisteínas com um pareamento C1-C3 e C2-C4 (Honma et al, 2008).

2. Raciocínio lógico e Objetivos

2.1 Raciocínio lógico

Canais voltagem - dependentes de K^+ são responsáveis pela sinalização elétrica celular e muitas outras funções em células não excitáveis, podendo também estar envolvidos em diversas canalopatias. Devido à sua grande importância fisiológica, estes canais tornaram-se um dos principais alvos das toxinas presentes em animais peçonhentos. Ao longo da evolução, as anêmonas do mar desenvolveram uma quantidade notável de toxinas peptídicas que bloqueiam especificamente diferentes subtipos de K_v e, evidentemente, oferecem grandes oportunidades para o estudo da estrutura e função dos canais voltagem - dependentes de K^+ .

2.2 Objetivos

- i. Purificação e caracterização de neurotoxinas, presentes na peçonha das anêmonas do mar *Actinia bermudensis* e *Bunodosoma caissarum*, que sejam seletivas para canais voltagem - dependentes de K^+ .
- ii. Compreender os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre as neurotoxinas de anêmonas do mar e os diferentes subtipos de K_v .
- iii. Analisar a importância fisiológica que estas neurotoxinas têm para as anêmonas do mar, focando-se em pontos de vista ecológicos e evolutivos.

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de qualidade analítica, das marcas Merck, Sigma-Aldrich, BioRad e Vetec. As soluções utilizadas nas cromatografias foram preparadas em água purificada em sistema milli-Q (Millipore Inc.) e os reagentes utilizados foram de grau de pureza HPLC, procedentes das marcas JT Baker, Tedia e Fluka.

3.2. Captura e identificação das espécies de anêmonas do mar

Os espécimes da espécie *Actinia bermudensis* (McMurrich, 1889) (Monteiro et al, 1998) foram capturados com auxílio de espátula, em locais de águas rasas no litoral de São Sebastião – SP. Os exemplares da espécie *Bunodosoma caissarum* (Corrêa, 1964) foram capturados, durante uma expedição ao Arquipélago de São Pedro e São Paulo, pelo sargento Guilherme O. Rocha e pelo então aluno de iniciação científica Wilson A. Ferreira Júnior, sob a orientação do professor Dr. José Carlos de Freitas. Espécimes de *B. caissarum* também foram capturados no litoral de São Sebastião (São Paulo – SP). A identificação das espécies foi feita pela Dra. Erika Schlenz do Instituto de Biociências da USP, através da visualização de características externas das espécies.

3.3. Extração das Peçonhas

Os espécimes das anêmonas *A. bermudensis* e *B. caissarum* foram mantidos por pelo menos 24 horas em aquário (com água marinha e suprimento de oxigênio) para o completo esvaziamento da cavidade gastrovascular. A extração das peçonhas foi realizada por estimulação elétrica *in vivo*, de acordo com o método desenvolvido por Malpezzi e colaboradores (Malpezzi et al, 1993). Os animais foram colocados, um por vez, em uma cuba

contendo aproximadamente 20 mL de água do mar artificial (NaCl, 23,42 gramas; KCl, 0,73 gr.; MgCl₂.6H₂O, 22,85 gr.; Na₂SO₄, 4,00 gr.; NaBr, 0,05 gr.; CaCl₂.2H₂O, 1,48 gr.; NaHCO₃, 0,20 gr.; q.s.p. 1 litro) e, estimulados por meio de um estimulador elétrico (*Estimulador*, Terroni Equipamentos LTDA.). Dois eletrodos de carbono foram passados ao longo do corpo dos espécimes para a estimulação dos nematocistos. A intensidade do estímulo aplicada foi de 5 a 20 V, com duração de 10ms, por 60s (para cada espécime, o estímulo foi repetido aproximadamente cinco vezes). A água do mar artificial contendo a peçonha foi centrifugada (20x10³ RPM X 10 min.), liofilizada e mantida no congelador (- 20° C).

3.4. Determinação do conteúdo protéico

O conteúdo protéico da extração das peçonhas das anêmonas do mar e das frações obtidas durante o processo de fracionamento e purificação, foi determinado pelo método do ácido bicinconínico (BCA; 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina) (kit da BioAgency). Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão, seguindo as instruções do fabricante.

3.5. Fracionamento e Purificação das Peçonhas

As etapas de fracionamento e purificação das peçonhas das anêmonas do mar *A. bermudensis* e *B. caissarum* foram realizadas no Laboratório de Toxicologia e Produtos Naturais, em colaboração com o Mestre Bruno Madio e, sob a supervisão do professor Dr. José Carlos de Freitas. Purificações também foram feitas na Central Analítica, do Instituto de Química da USP e, no equipamento multiusuário do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (CAT-CEPID), do Instituto Butantan.

3.5.1. Etapa de fracionamento

As peçonhas das anêmonas *A. bermudensis* e *B. caissarum* foram submetidas à cromatografia de filtração molecular (Gel-filtração), conforme

descrito por Oliveira e colaboradores (Oliveira et al, 2004). Amostras de aproximadamente 10 mg de peçonha (conteúdo protéico) foram solubilizadas em 10 mL de tampão acetato de amônio (100 mM, pH 6,5) e, em seguida, aplicadas em uma coluna de Sephadex G-50 (1,9 X 131 cm, GE Healthcare) previamente equilibrada com o mesmo tampão. As cromatografias foram realizadas com fluxo de 2 mL/min. A eluição das peçonhas foi monitorada pela absorbância a 280nm (UV Monitor Controller, Spectrum). As frações foram coletadas manualmente e liofilizadas para utilização nas etapas de purificação.

3.5.2. Primeira etapa de purificação

O material de interesse obtido na etapa anterior foi dissolvido em 5 mL de solução A (0,1% de ácido trifluoracético (TFA) em água milliQ) e submetido à cromatografia de fase reversa em sistema “*High-performance liquid chromatography*” (HPLC, ÅKTA Explorer 100, GE Healthcare), utilizando-se uma coluna semi-preparativa de fase reversa CAPCELL PAK C-18 (1,0 X 25 cm, 5 µm, Shiseido™) previamente equilibrada com solução A. A eluição dos peptídeos foi obtida através de um gradiente linear de 10 a 50%, em 35 minutos, de solução B (0,1% de TFA em acetonitrila (ACN)), com fluxo de 2,5mL/min e monitorada pela absorbância à 214 e 280nm. As subfrações foram coletadas manualmente e liofilizadas.

3.5.3. Segunda etapa de purificação

As amostras de interesse provenientes da etapa anterior, que ainda apresentavam impurezas, foram dissolvidas em 1 mL de solução A e submetidas a uma repurificação por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (AKTA Explorer 100, GE Healthcare), utilizando-se uma coluna analítica CAPCELL PAK C-18 (0,46 X 25 cm, Sigma-Aldrich). A eluição dos peptídeos foi realizada através de um gradiente isocrático de solução B, específico para cada amostra. O fluxo foi de 1 mL/min e as corridas cromatográficas foram monitoradas pela absorbância à 214 e 280nm. Os peptídeos eluídos foram coletados manualmente e liofilizados.

3.6. Determinação da massa molecular

Algumas das análises de massas dos peptídeos purificados da anêmona *B. caissarum* foram realizadas no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em colaboração com a Dr^a. Juliana Silva Cassoli. Todas as análises de massas das amostras da anêmona *Actina bermudensis* e algumas da anêmona *B. caissarum* foram realizadas no “*Laboratoire de Spectrométrie de Masse*” da “*Université de Liège*”, Bélgica, sob a supervisão da Dr^a. Camila Takeno Cologna.

As massas moleculares foram determinadas por espectrometria de massas (MS) MALDI-TOF, utilizando-se um aparelho Ultraflex II TOF/TOF MALDI (Bruker Daltonics), equipado com Nd-YAG Smartbean laser (MLN 202, LTB) e controlado pelo programa FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics). Soluções de amostras foram misturadas com solução de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (20 mg/mL) em uma relação 1:1 e foram gotejadas (2 μ L) em uma placa de amostras de 384 posições (Bruker Daltonics). Os espectros de massa foram obtidos em modo positivo/refletido, com a frequência de laser ajustada em 50 Hertz. O aparelho foi calibrado com padrões externos: peptide calibration standard II (m/z entre 700-3200 Da, Bruker Daltonics). Os dados foram analisados através do programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

3.7. Determinação do padrão de pontes dissulfeto

As análises de massas foram realizadas no “*Laboratoire de Spectrométrie de Masse*” da “*Université de Liège*”, Bélgica, sob a supervisão da Dr^a. Camila Takeno Cologna.

Para a determinação do padrão de pareamento das Cisteínas das amostras, utilizou-se uma serino protease isolada da *Lysobacter enzymogenes* (“*Endoproteinase Lys-C*”, SIGMA-ALDRICH), que seletivamente cliva a porção Carboxi-terminal das Lisinas. A *Endoproteinase Lys-C* foi solubilizada em uma solução de Tricina (50 mM) e EDTA (10 mM), pH 8,0. As amostras

provenientes da segunda etapa de purificação foram solubilizadas em uma solução de 100 mM Tris HCl (pH 8,5). A digestão ocorreu utilizando-se uma proporção de enzima: amostras (1:20, peso/peso), durante 2 e 8 horas, a 37° C. A seguir, as amostras foram misturadas com solução de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (20 mg/mL) em uma relação 1:1 e foram gotejadas (2 μ L) em uma placa de amostras de 384 posições (Bruker Daltonics). As massas moleculares dos fragmentos digeridos foram determinadas por espectrometria de massas (MS) MALDI-TOF, utilizando-se um aparelho Ultraflex II TOF/TOF MALDI (Bruker Daltonics), equipado com Nd-YAG Smartbean laser (MLN 202, LTB) e controlado pelo programa FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics).

3.8. Síntese peptídica

Seis mutantes foram sintetizados pelo *Laboratório GenScript*, com grau de pureza $\geq 98\%$ e com o pareamento das Cisteínas de acordo com os resultados que haviam sido previamente obtidos. Optou-se por utilizar a técnica de 'Alanine scan', usualmente empregada em estudos de relação entre estrutura e função de toxinas (Gopalakrishnakone et al, 2002; Pennington et al, 1995b). Cada um dos seis aminoácidos básicos (Lisina ou Arginina) do peptídeo AbeTx1 foi substituído por um resíduo com carga neutra (Alanina) (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação dos mutantes da toxina AbeTx1

AMOSTRA	SUBSTITUIÇÃO	SEQUÊNCIA
AbeTx1	NATIVO	RCKTCSKGRCRCPKPNCG
AbeTx1 – R1A	R1A	A CKTCSKGRCRCPKPNCG
AbeTx1 – K3A	K3A	RC A TCSKGRCRCPKPNCG
AbeTx1 – K7A	K7A	RCKTCS A GRCRCPKPNCG
AbeTx1 – R9A	R9A	RCKTCSKG A CRPKPNCG
AbeTx1 – R11A	R11A	RCKTCSKGRC A PKPNCG
AbeTx1 – K13A	K13A	RCKTCSKGRCRCP A PNCG

3.9. Medidas eletrofisiológicas em ovócitos de *Xenopus laevis* – Técnica de “Voltage clamp” com dois microeletrodos.

Os ensaios eletrofisiológicos utilizando a técnica de “Voltage clamp” com dois microeletrodos foram realizados no “Laboratory of Toxicology” da “Katholieke Universiteit Leuven” (K.U.Leuven), Bélgica, sob a supervisão do professor Dr. Jan Tytgat.

3.9.1. Isolamento e preparação dos ovócitos.

Ovócitos de *Xenopus laevis* foram isolados através de ovariectomia parcial. Os animais foram anestesiados com triclaína (1 g/L) e mantidos no gelo durante todos os procedimentos pré- e pós-operatórios. Após a retirada dos ovócitos, os mesmos foram defoliculados por tratamento com solução de colagenase (2,5 mg/mL) em solução de ND96 (em mM: NaCl, 96; KCl, 2; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 2 e HEPES, 5 (pH 7.4) – livre de cálcio), por duas horas e meia à temperatura de 15 - 18°C. Após o período de tratamento, os ovócitos dos estágios V e VI de maturação foram selecionados para posterior injeção do RNA complementar (cRNA). Os cRNA transcritos foram sintetizados a partir dos plasmídeos linearizados, utilizando-se o kit de transcrição *Mmessage Mmachine* (Ambion) com os promotores T7 ou SP6. Os ovócitos traduziram o cRNA injetado nos seus respectivos canais voltagem-dependente de K⁺ e Na⁺, sendo, então, utilizados para ensaios eletrofisiológicos (Figura 8).

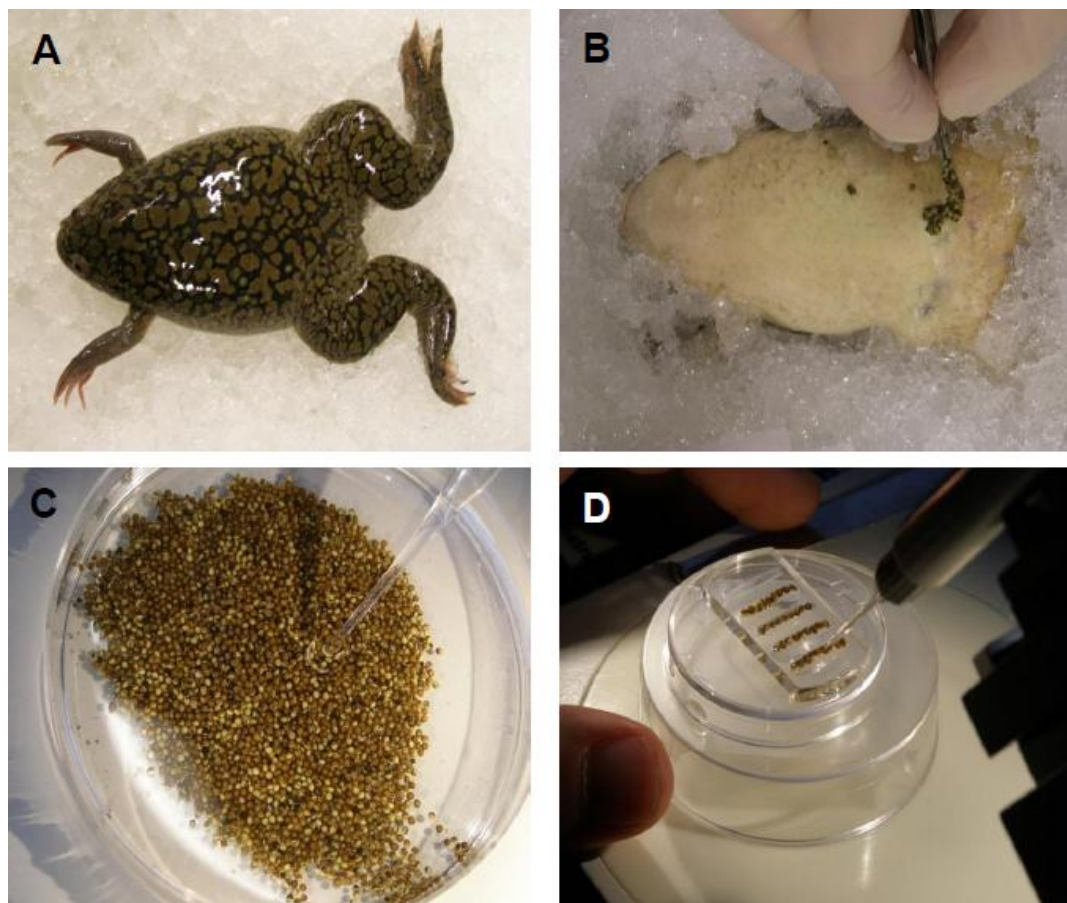


Figura 8 – Isolamento e preparação dos ovócitos de *Xenopus laevis*. **A** – Exemplar do *Xenopus laevis*. **B** – Ovariectomia parcial para a retirada dos ovócitos. **C** – Seleção dos ovócitos. **D** – Injeção do cRNA dos canais voltagem dependentes de K^+ e Na^+ nos ovócitos. Fotos cedidas por Eva Cuypers, do “Laboratory of Toxicology” da K.U.Leuven, Bélgica.

3.9.2. Medidas eletrofisiológicas

As medidas eletrofisiológicas foram realizadas utilizando-se a técnica “Voltage clamp” com dois microeletrodos. Os registros foram realizados à temperatura ambiente (18 - 22°C) utilizando-se um amplificador Gene Clamp 500 (Axon Instruments). As micropipetas foram confeccionadas a partir de capilares de vidro (borossilicato, WPI 1B120-6) estiradas com um estirador manual WPI. A resistência foi de 0,8 a 1,0 M Ω para os dois eletrodos. As micropipetas foram preenchidas com solução de cloreto de potássio (KCl - 3M).

Os ovócitos foram mantidos após a injeção de cRNA em solução ND-96 enriquecida com 50 mg/ml de sulfato de gentamicina. As correntes dos ovócitos foram registradas 1-3 dias após injeção do cRNA. Foram realizados ensaios com uma ampla variedade de subtipos de canais voltagem dependentes de K^+ das subfamílias: *Shaker* ($K_V1.1$, $K_V1.2$, $K_V1.3$, $K_V1.4$, $K_V1.5$, $K_V1.6$ e *Shaker IR* da mosca *Drosophila melanogaster*), subfamília *Shab* ($K_V2.1$), subfamília *Shaw* ($K_V3.1$), subfamília *Shal* ($K_V4.2$ e $K_V4.3$) e subfamília *EAG* (*hERG*). Também foram realizadas medidas eletrofisiológicas utilizando-se alguns subtipos de canais voltagem dependentes de Na^+ : $Na_V1.2$, $Na_V1.4$, e $BgNa_V1$ da barata *Blattella germanica*.

3.9.3. Protocolos

Os ovócitos que expressaram os subtipos de $K_V1.1$ a $K_V1.6$, $K_V2.1$ e *Shaker IR* foram mantidos em um potencial de -90 mV (“*holding potential*”) e rapidamente foram despolarizados para 0 mV, seguindo-se de uma repolarização para -50 mV e depois a -90 mV. O tempo total do protocolo foi de 1 segundo. Para o subtipo *hERG* foi utilizado um protocolo em que os ovócitos eram mantidos à -90 mV. Em seguida, estes eram despolarizados a +40 mV, por 2,5 segundos, seguindo-se de um potencial de -120 mV por mais 2,5 segundos. O tempo total do protocolo foi de 5 segundos. Para os subtipos $K_V3.1$, $K_V4.2$ e $K_V4.3$, os ovócitos foram mantidos à -90 mV e, então despolarizados à +30 mV, em um pulso de 500 milissegundos. No protocolo utilizado para os subtipos $Na_V1.2$, $Na_V1.4$ e $BgNa_V$, os ovócitos foram mantidos em um potencial de -90 mV (“*holding potential*”), em seguida foram despolarizados para 0 mV, seguindo-se de uma repolarização para -90 mV. O tempo total do protocolo foi de 100 milissegundos (Figura 9).

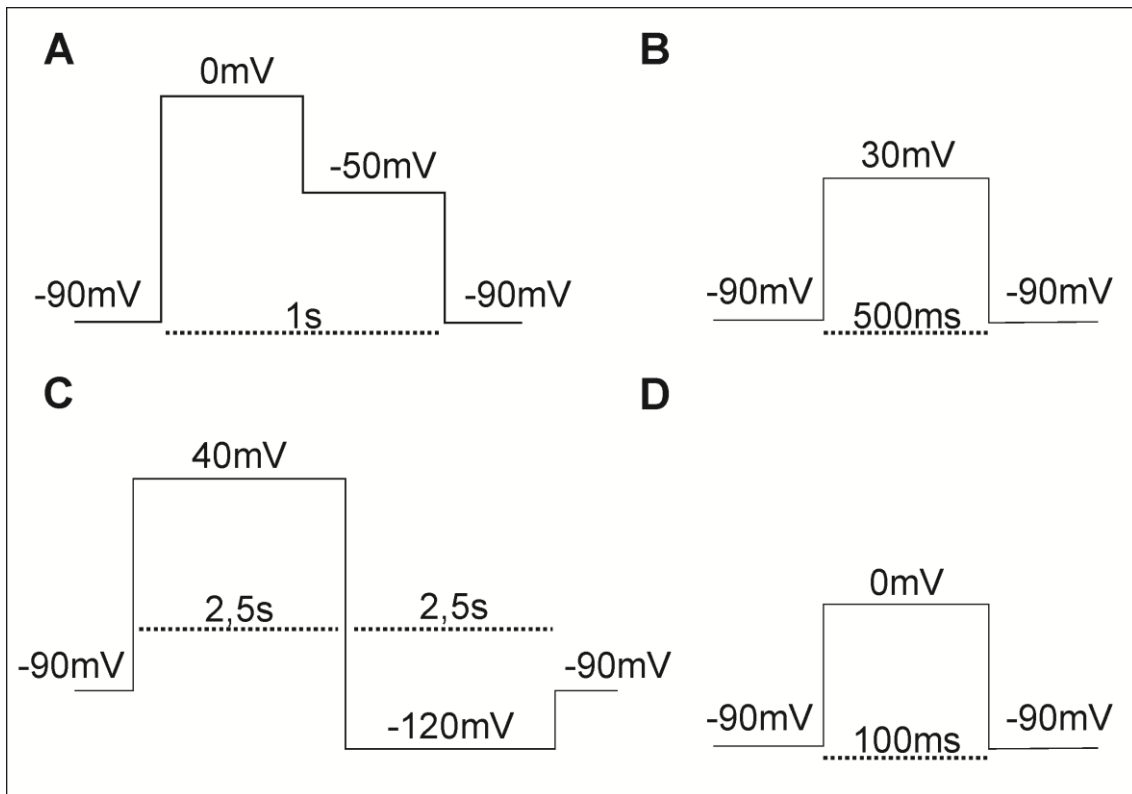


Figura 9 - Protocolos de pulsos de voltagem utilizados para os registros das correntes dos canais voltagem - dependentes de K^+ e Na^+ , expressos em ovócitos de *X. laevis*. **A** - Protocolo utilizado para as isoformas $K_V1.1-6$, $K_V 2.1$ e *Shaker IR*. **B** - Protocolo utilizado para isoforma $K_V 3.1$, $K_V4,2$ e $K_V4.3$. **C** - Protocolo utilizado para isoforma *hERG*. **D** - Protocolo utilizado para isoformas $Na_V1.2$, $Na_V1.4$ e $BgNa_V$.

3.9.4. Curvas de dose-resposta

As curvas de dose-resposta foram construídas com a apresentação da porcentagem de bloqueio da corrente dos subtipos dos canais em função do aumento da concentração dos peptídeos neurotóxicos que foram previamente purificados. Os dados foram ajustados com a equação de Hill:

$$[y = 100/[1 + (IC_{50}/[toxina])^h] \quad (1)$$

onde y é a amplitude do efeito induzido pela toxina, IC_{50} é a concentração da toxina na metade de sua máxima eficácia, $[toxina]$ é a concentração da toxina e h é o coeficiente de Hill.

3.9.5. Curvas de corrente em função da voltagem

Construíram-se curvas de corrente em função da voltagem, a qual variou entre -100 e +100 mV, em intervalos de 5 ou 10 mV, dependendo do subtipo de K_v . Este experimento foi realizado em duas condições fisiológicas: (1) em solução fisiológica ND96 e (2) em solução ND96 com alta concentração de íons K^+ (HK-ND96). Em ambas as condições também foram realizados experimentos na ausência e na presença dos peptídeos neurotóxicos em uma concentração próxima à sua IC_{50} . Os valores de I_K (corrente dos íons potássio) foram plotadas utilizando-se a equação de Boltzmann:

$$[1 / 1 + e^{-(V - V_{1/2})/S}] \quad (2)$$

onde V é a voltagem do pulso, $V_{1/2}$ é a voltagem capaz de ativar 50% dos canais, S é o fator de inclinação da curva. A cinética de ativação dos canais foi obtida construindo-se uma curva monoexponencial com os valores de corrente em função dos valores de voltagem.

3.9.6. Determinação da reversibilidade da ligação das neurotoxinas

Para determinar se a toxina se liga na região extracelular do canal e se o efeito inibidor da corrente dos íons K^+ ocorre através de uma ligação reversível ou irreversível, realizaram-se experimentos de lavagem ('washout') dos ovócitos durante as medidas eletrofisiológicas.

3.9.7. Ensaios de interação competitiva

Os ensaios de interação competitiva foram realizados entre as neurotoxinas e o cátion tetraetilamônio (TEA) que atua bloqueando a corrente dos íons K^+ através da obstrução física do poro de alguns subtipos de K_v da subfamília *Shaker*.

3.9.8. Dependência da conformação estrutural do canal para ligação das neurotoxinas

Em uma situação inicial (controle negativo), o subtipo de $K_v1.1$ foi submetido ao protocolo de ativação descrito anteriormente. Posteriormente, a membrana do ovócito foi mantida no '*holding potential*' (-90 mV) para que os canais permanecessem no estado de conformação estrutural fechado. Então as neurotoxinas foram aplicadas à solução ND96 contendo o ovócito e homogeneizada por 2 minutos. A seguir, o protocolo de ativação do canal foi reiniciado e a corrente foi mensurada.

3.10. Análise Estatística

Os resultados dos ensaios eletrofisiológicos foram analisados através do *Student's t-test* para verificação da significância. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos. Todos os dados representam pelo menos três experimentos independentes ($n \geq 3$) e são apresentados como a média \pm o erro padrão. O software utilizado, tanto para a análise estatística quanto para a construção dos gráficos, foi o Microcal Origin Lab., licenciado pela Universidade de São Paulo.

3.11. Determinação da sequência de aminoácidos das neurotoxinas

A determinação das sequências dos peptídeos da anêmona do mar *B. caissarum* foi realizada em colaboração com a Mestre Gabriela G. Montandon, do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais da UFMG e com Steve

Peigneur, do “*Laboratory of Toxicology*” da K.U.Leuven. A determinação da sequência da amostra da *A. bermudensis* foi também determinada no “*Laboratory of Toxicology*”, porém sob a supervisão do prof. Dr. Jan Tytgat.

A sequência de aminoácidos foi determinada pelo método automático do programa de sequenciamento por degradação de Edman (Edman, 1950), utilizando-se o sequenciador de proteínas e peptídeos (modelo PPSQ-21, Shimadzu). Cerca de 50 µg das amostras solubilizadas em 50 µL de solução TFA:H₂O:ACN (proporção 1:5:5) foram aplicadas sobre um disco de fibra de vidro previamente tratado com o polímero SEQUA-BRENE (Sigma), de acordo com os procedimentos padrões do equipamento. A derivatização foi seguida da etapa de conversão do intermediário tiazolina em PTH-aminoácido, por uma solução aquosa de TFA (25%). A separação dos PTH-aminoácidos ocorreu em uma coluna de fase reversa (WAKOSIL-PTH 25 x 0,46 cm, Wako) com a eluição conduzida em condição isocrática por uma solução de composição desconhecida, denominada “PTH-AA mobile phase” (Wako) fornecida pelo fabricante. Os PTH-aminoácidos foram identificados pelos tempos de retenção, por comparação com padrões também fornecidos pelo fabricante (Wako).

3.12. Busca por similaridades

As sequências de aminoácidos determinadas foram comparadas por similaridade com sequências de toxinas já conhecidas, utilizando-se as plataformas *on-line* BLAST-NCBI (Altschul & Lipman, 1990), BLITZ EMBL (Collins & Coulson, 1990), o banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot, a ferramenta Fasta 33 (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) e a plataforma para toxinas do molusco do gênero *Conus* (ConoServer) (Kaas et al, 2008). Os alinhamentos das sequências obtidas foram feitos através do programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) e formatados pela ferramenta BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

3.13. Dendograma Funcional

Os dendogramas funcionais foram construídos utilizando o método “*Neighbor-joining*” (Saitou & Nei, 1987), seguido pelo “*bootstrap*” teste (Felsenstein, 1985) do programa MEGA 4.0 (Tamura et al, 2007). Os dendogramas estão representados em escala, com o tamanho dos ramos proporcional ao número de substituições. Os respectivos códigos de acesso, os nomes das toxinas, alvos biológicos e as espécies de onde as peçonhas foram extraídas encontram-se na seção Resultados.

3. Resultados

Capítulo 1

A novel type of K⁺-channel toxin from the sea anemones *Actinia bermudensis* and *Bunodosoma caissarum*: AbeTx1 and BcsTx4 are the first members of a new subfamily of kappa-toxins.

Diego J. B. Orts, Bruno Madio, Camila T. Cologna, Steve Peigneur, Jan Tytgat, José Carlos de Freitas e José Eduardo Pereira Wilken Bicudo

Resumo: A peçonha das anêmonas do mar é uma fonte de compostos bioativos, incluindo toxinas peptídicas que são ferramentas para o estudo da estrutura e função dos canais voltagem dependentes de K⁺ (K_V). Os peptídeos neurotóxicos AbeTx1 e BcsTx4, respectivamente purificados da peçonha das anêmonas do mar *Actinia bermudensis* e *Bunodosoma caissarum* (do Arquipélago de São Pedro e São Paulo), foram caracterizados através de um 'screening' em 12 subtipos de K_V (K_V1.1-1.6, K_V2.1, K_V3.1, K_V4.2, K_V4.3, hERG e *Shaker* IR) e 3 subtipos de canais voltagem dependentes de Na⁺ (Na_V1.2, Na_V1.4 e BgNa_V). AbeTx1 (3 μM) apresentou uma seletividade de atividade para os subtipos de K_V1.1, K_V1.2, K_V1.3, K_V1.6 e *Shaker* IR. Por sua vez, BcsTx4 (3 μM) é capaz de bloquear somente a corrente dos subtipos de K_V1.1, K_V1.2 e K_V1.6. Ambas bloqueiam a corrente dos íons K⁺, através da obstrução física do poro dos subtipos de K_V1.2 e K_V1.6 e são capazes de modular a cinética de *ativação* do subtipo de K_V1.1. Ensaio de mutagênese sítio-dirigida da AbeTx1 indicaram que esta se liga aos K_Vs por meio de um conjunto de resíduos de aminoácidos básicos, os quais ao serem substituídos causam perdas de afinidade que variam entre três e aproximadamente 50 vezes. AbeTx1 e BcsTx4 são os primeiros membros de uma nova subfamília de *kappa-toxins* e também são as primeiras toxinas de anêmona do mar com este motivo estrutural.

Palavras-chave: anêmonas do mar, *A. bermudensis*, *B. caissarum*, peçonhas, neurotoxinas, canais voltagem - dependentes de K⁺, *kappa-toxins*.

1. Resultados

1.1. Purificação e caracterização bioquímica das neurotoxinas AbeTx1 e BcsTx4

O fracionamento da peçonha (10 mg de conteúdo protéico) da anêmona do mar *A. bermudensis* por meio de cromatografia de Gel-filtração em Sephadex G-50, resultou em cinco frações, denominadas de Abe I a V, de acordo com a ordem de eluição da peçonha (Figura 10A). A fração Abe III foi utilizada para dar continuidade ao processo de purificação das toxinas, devido à sua atividade neurotóxica, quando aplicada em siris *Callinectes danae*. A cromatografia de fase reversa em sistema HPLC resultou no desmembramento da fração Abe III em 18 subfrações (Figura 10B). A fração Abe III 1 (respectiva ao número 1) foi repurificada e, então obteve-se o peptídeo AbeTx1 (Figura 10C), com uma relação m/z (massa/carga) igual a 1889,8 (Figura 11A). O peptídeo neurotóxico BcsTx4 foi obtido a partir do fracionamento da peçonha (10 mg de conteúdo proteico) da anêmona do mar *B. caissarum* em uma cromatografia líquida de Gel-filtração (Figura 10D), seguida de duas etapas de purificação por cromatografia de fase reserva, em sistema HPLC. A primeira etapa de purificação foi realizada com a fração III, proveniente da cromatografia de Gel-filtração (Figura 10E). O segundo pico mais abundante (marcado com o número 1) foi submetido a uma segunda etapa cromatográfica (Figura 10F). Após esta segunda etapa, o peptídeo BcsTx4 teve seu grau de pureza determinado por espectrometria de massa, apresentando uma relação m/z de 1830,7 (Figura 11B). Os valores experimentais de massa obtidos são semelhantes aos valores teóricos da sequência (com as Cisteínas oxidadas) dos peptídeos AbeTx1 (1888,875 Da) e BcsTx4 (1829,827 Da).

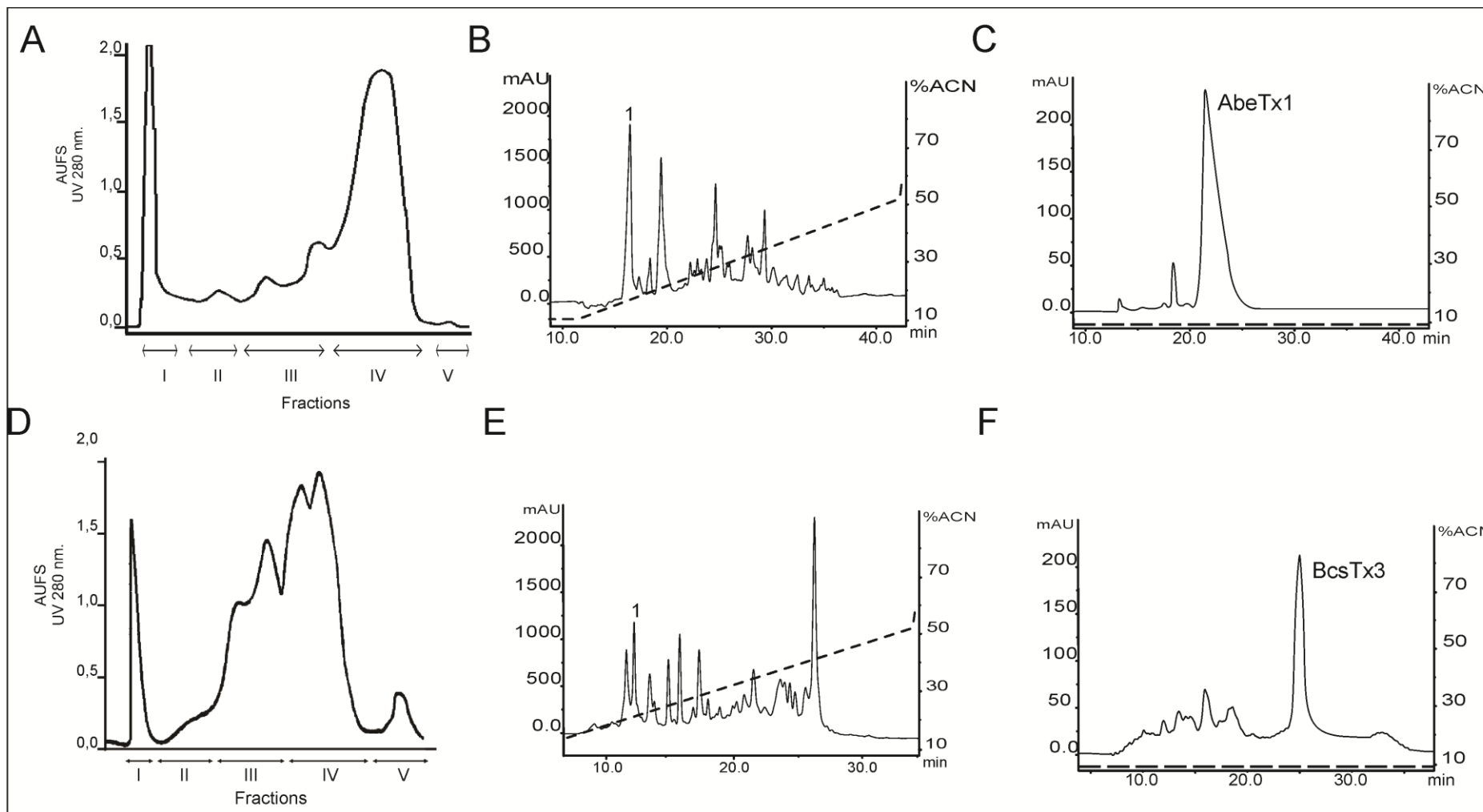


Figura 10 - Fracionamento e Purificação da peçonha das anêmonas *A. bermudensis* e *B. caissarum*. **A** - Perfil cromatográfico da filtração em gel da peçonha de *A. bermudensis*. Coluna: Sephadex G-50 (2,5 x 120cm), equilibrada e eluída com tampão acetato de amônio 100 mM pH 6,5. Fluxo de 2 mL/min. A eluição da peçonha foi monitorada pela absorbância a 280nm. As abreviações I a V correspondem às frações agrupadas, que posteriormente passarão a serem denominadas Abe I a V. **B** - Perfil da primeira etapa cromatográfica da fase reversa (RP-HPLC) da fração Abe III (2 mg) proveniente da Gel-filtração. O número 1 indica o pico que foi submetido à segunda etapa cromatográfica. Coluna: CAPCELL PAK C-18 (1,0 x 25 cm) equilibrada com solução A. Os peptídeos foram eluídos com gradiente linear da solução B (10 a 50 % em 35 minutos). Fluxo: 2,5 mL/min. A eluição dos peptídeos foi monitorada pela absorbância a 214nm. **C** - Perfil da segunda etapa cromatográfica da fase reversa (HPLC). Pico majoritário representa o peptídeo AbeTx1. Coluna: CAPCELL PAK C-18 (0,46 X 25 cm) equilibrada com solução A. Os peptídeos foram eluídos no modo isocrático da solução B (9%). Fluxo: 1,0mL/min. **D** - Perfil cromatográfico da filtração em gel da peçonha de *B. caissarum*. **E** - Perfil da primeira etapa cromatográfica da fase reversa (RP-HPLC) da fração III proveniente da Gel-filtração. **F** - Perfil da segunda etapa cromatográfica de fase reversa (HPLC). Os peptídeos foram eluídos no modo isocrático da solução B (9%). Fluxo: 1,0mL/min. Pico majoritário representa o peptídeo BcsTx4.

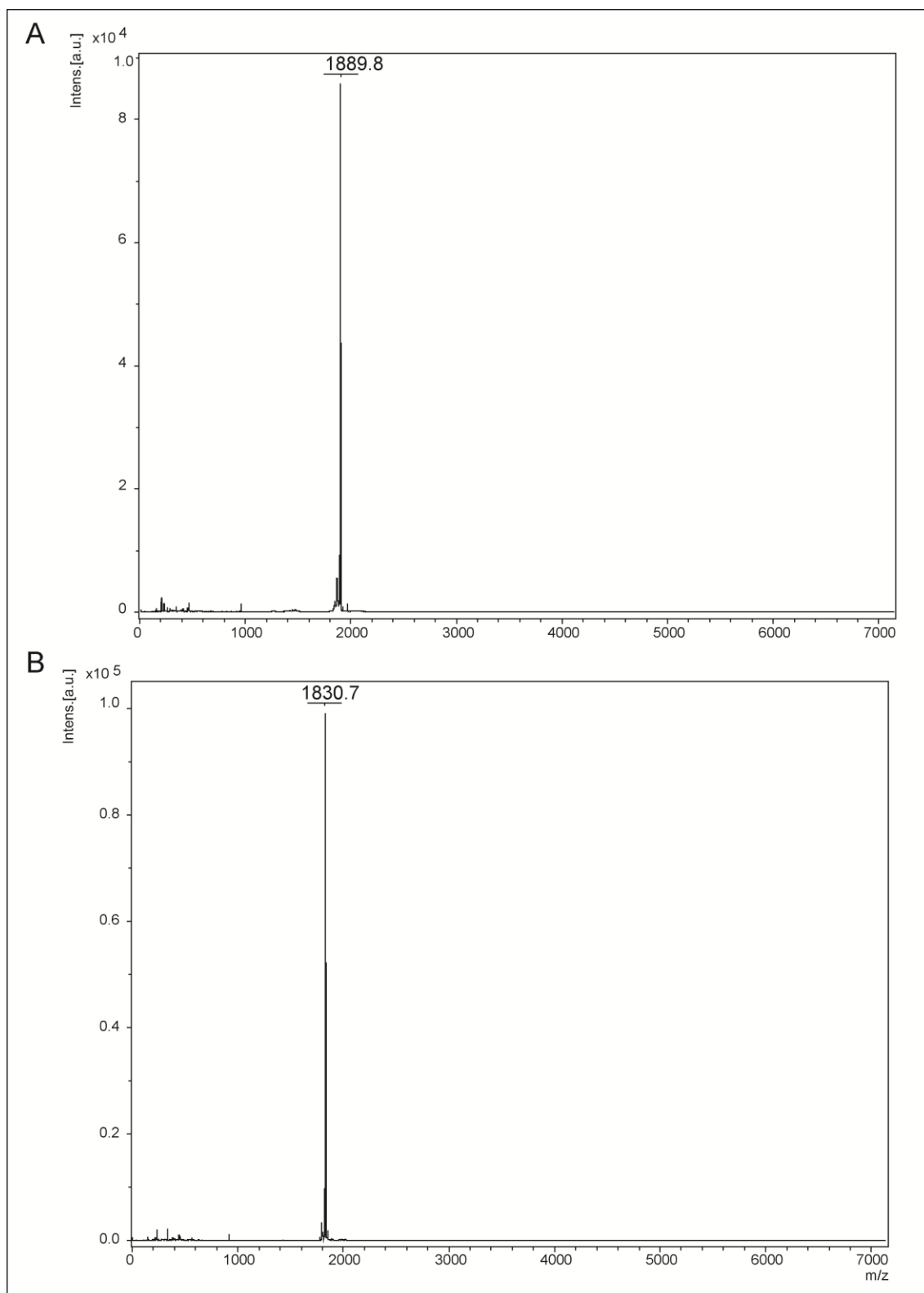


Figura 11 – Determinação da pureza dos peptídeos AbeTx1 e BcsTx4. **A** - Espectro de massa do peptídeo AbeTx1 (m/z 1889,8 Daltons). **B** - Espectro de massa do peptídeo BcsTx4 (m/z 1830,7 Da).

1.2. Determinação da sequência de aminoácidos e do padrão de pontes dissulfeto dos peptídeos AbeTx1 e BcsTx4

A sequência de aminoácidos dos peptídeos AbeTx1 e BcsTx4 foi determinada através da degradação automática de (Edman, 1950). A sequência completa do peptídeo AbeTx1 é formada por 17 aminoácidos, sendo que quatro são Cisteínas: **NH₂-RCKTCSKGRCRPKPNCG-CO₂H**. A sequência do peptídeo BcsTx4 também é formada por 17 aminoácidos e quatro Cisteínas: **NH₂-GCKECSVKGRCRPKPNCG-CO₂H** (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequência de aminoácidos dos peptídeos AbeTx1 e BcsTx4

Peptídeos	Sequências	Nº aminoácidos
AbeTx1	NH ₂ -RCKTCSKGRCRPKPNCG-CO ₂ H	17
BcsTx4	NH ₂ -GCKECSVKGRCRPKPNCG-CO ₂ H	17

Dada à presença de quatro Cisteínas oxidadas na sequência primária de ambos os peptídeos, decidiu-se determinar o padrão de pareamento utilizando-se a serino protease “*Endoproteinase Lys-C*”. Após a digestão do peptídeo AbeTx1, este foi submetido a uma análise de espectrometria de massas, resultando em fragmentos de massa com uma relação m/z de 171,7; 211,8; 378,9; 483,0; 568,0; 716,3; 871,4; 1084,5; 1151,6; 1216,6; 1429,8 e 1712,8 Da. O fragmento de 716,3 Da corresponde à sequência de aminoácidos digerida **RCKPNC**. Este fragmento contém a ponte dissulfeto entre a primeira e a quarta Cisteínas (Figura 12A). O fragmento de 1151,6 Da corresponde à sequência **TCSKGRCRPK**, comprovando que a segunda e terceira Cisteínas estão conectadas (Figura 12B). Dessa forma, pode-se concluir que o padrão de Cisteínas do peptídeo AbeTx1 é C1-C4 e C2-C3. O peptídeo BcsTx4 também teve seu padrão de pareamento de Cisteínas determinado. A análise dos fragmentos digeridos comprovou que este peptídeo também apresenta um padrão de Cisteínas C1-C4 e C2-C3. O fragmento de 1191,6 Da corresponde à sequência de aminoácidos **ECVKGRCRPK**, comprovando que a segunda e a terceira Cisteínas estão ligadas por uma ponte dissulfeto (Figura 13).

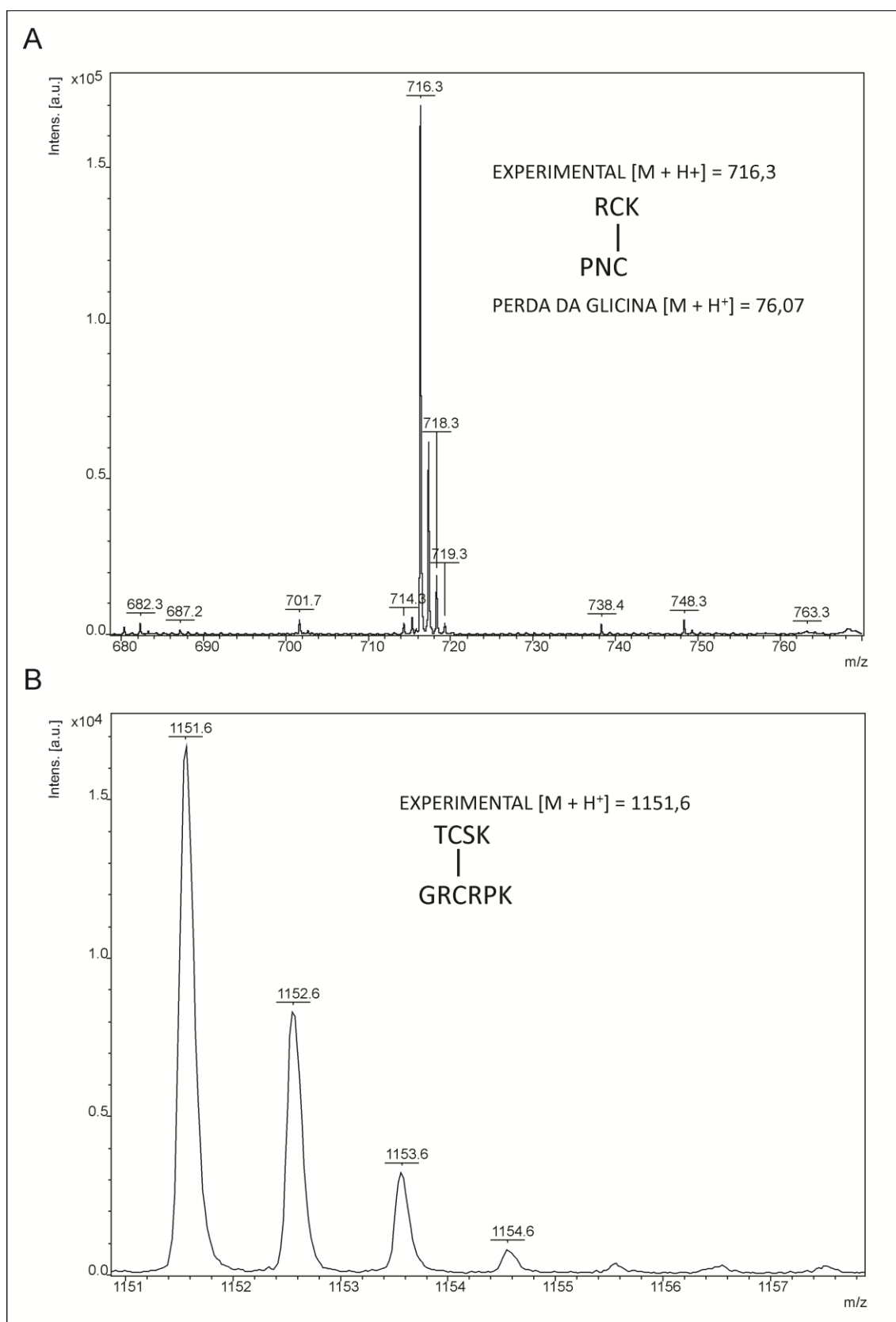


Figura 12 – Determinação do padrão de pontes dissulfeto do peptídeo AbeTx1.
A - Fragmento de m/z igual a 716,3 Da, correspondente à sequência **RCKPNC**.

B - Fragmento digerido com m/z de 1151,6 Da, referente à sequência **TCSKGRCRPK**.

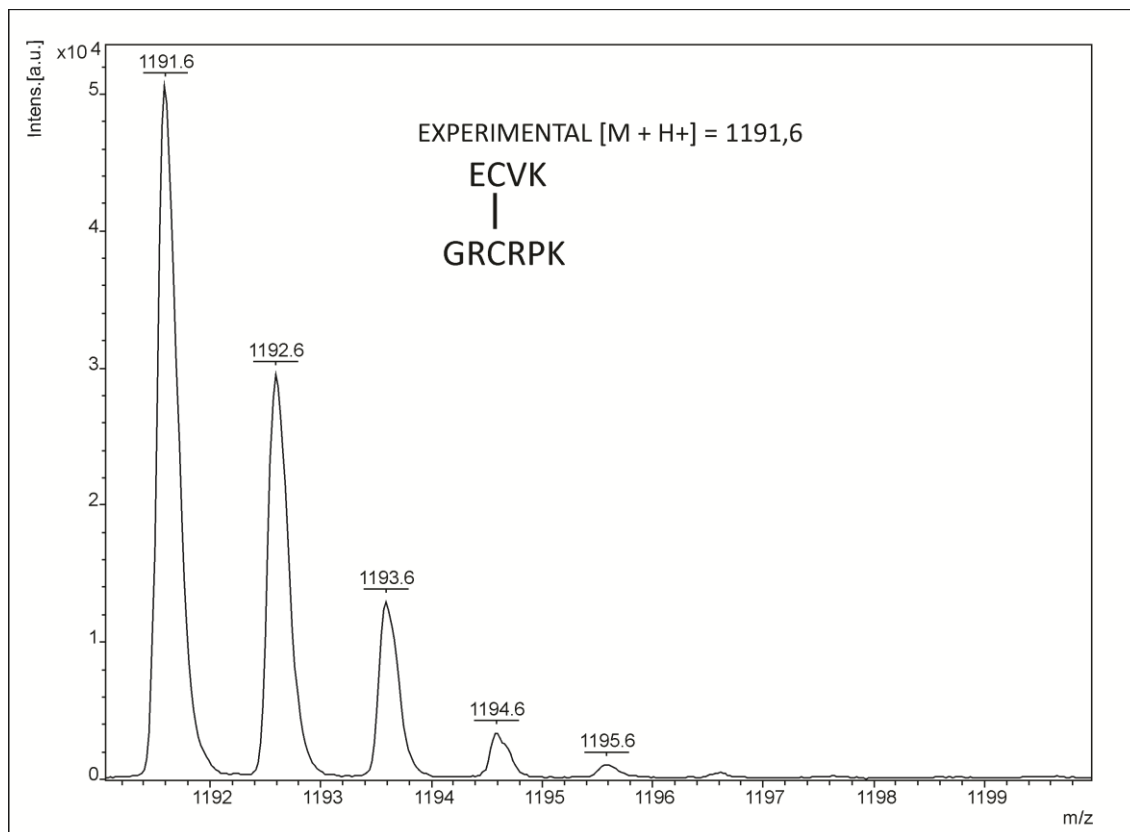


Figura 13 - Determinação do padrão de pontes dissulfeto do peptídeo BcsTx4. O valor de m/z igual a 1191,6 Da corresponde ao fragmento de aminoácidos **ECVKGRCRPK** da sequência do peptídeo BcsTx4. Comprovando que a segunda e terceira Cisteínas formam uma ponte dissulfeto.

1.3. Perfil farmacológico da neurotoxina AbeTx1

O "screening" da toxina AbeTx1 (3 μ M) nos subtipos de K_V das subfamílias *Shaker* (K_V 1.1, K_V 1.2, K_V 1.3, K_V 1.4, K_V 1.5, K_V 1.6 e *Shaker* IR (*Drosophila melanogaster*)); subfamília *Shab* (K_V 2.1); subfamília *Shaw* (K_V 3.1); subfamília *Shal* (K_V 4.2 e K_V 4.3) e subfamília EAG (*hERG*, "human ether-a-go-go-related gene") resultou no bloqueio da corrente dos subtipos K_V 1.1, K_V 1.2, K_V 1.3, K_V 1.6 e *Shaker* IR, da subfamília *Shaker*. A porcentagem de bloqueio da

corrente do subtipo de $K_V1.1$ foi igual a $83,67 \pm 1,45\%$; $K_V 1.2$, $85,33 \pm 1,45\%$; $K_V1.3$, $19,67 \pm 2,018\%$; $K_V1.6$, $95,00 \pm 2,44\%$ e *Shaker IR*, $15,50 \pm 1,80\%$. Os subtipos de $K_V1.4$, $K_V1.5$, $K_V2.1$, $K_V3.1$, $K_V4.2$, $K_V4.3$ e *hERG* não apresentaram bloqueio da corrente (Figura 14). A toxina AbeTx1 ($3 \mu\text{M}$) também teve sua atividade verificada em três subtipos de canais voltagem dependentes de Na^+ ($\text{Na}_V1.2$, $\text{Na}_V1.4$ e BgNa_V), mas não apresentou um bloqueio da corrente ou retardo na inativação do canal (Figura 15).