

**UnB – Universidade de Brasília  
Pós-graduação em Biologia Molecular  
Tese de Doutorado**

**Diogo Vieira Tibery**

**Canais iônicos como alvos moleculares para fármacos: Caracterização dos alvos moleculares de  $\kappa$ -KTxs do gênero *Opisthacanthus* e investigação do mecanismo de ação de anestésicos gerais.**



**Orientadora: Elisabeth Nogueira Ferroni  
Coorientador: Werner Treptow  
Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas,  
Laboratório de Neurofarmacologia**

## Resumo

Canais iônicos são os elementos essenciais da excitabilidade da membrana, responsáveis pela transmissão e transdução de sinais em neurônios, sendo esses canais passíveis de modulação via toxinas peptídicas e anestésicos gerais. No primeiro capítulo desse trabalho são estudadas as  $\kappa$ -KTx, que são toxinas peptídicas escorpiônicas com o motivo estrutural  $Cs\alpha/\alpha$  ativas em canais de potássio dependentes de voltagem. A  $\kappa$ -KTx 2.2 Omtx2 em um estudo prévio foi considerada um modulador da secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas e uma avaliação das toxinas das  $\kappa$ -KTx 2.6 Ocyc9 e  $\kappa$ -KTx 2.2 Omtx2 demonstrou potencial efeito nos canais  $Ca_v2.3$ . Neste presente trabalho, a atividade das toxinas Ocyc9 e Omtx2 foi avaliada nos canais  $Ca_v2.3$ ,  $K_v$ ,  $Na_v$ , TRP, nAChR, ENaC. Em concentrações entre 100 nM e 10  $\mu$ M, ambas as toxinas não apresentaram efeito nos canais testados. Esses resultados, junto com os descritos por Sarmiento (2019), indicam que a modulação da secreção de insulina dependente de glicose não pode ser justificada pela interação das  $\kappa$ -KTx 2.2 e 2.6 com canais iônicos descritos em células  $\beta$  pancreáticas. As  $\kappa$ -KTx são compreendidas como bloqueadores de poros de baixa afinidade e necessitam de altas concentrações para induzir bloqueio. As toxinas Ocyc9 e Omtx2, a 500  $\mu$ M, inibiram a amplitude de correntes nos canais  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$ ,  $K_v1.4$  e Shaker IR, com a indicação que a inibição ocorre associada ao deslocamento da probabilidade de abertura, caracterizando o funcionamento como uma toxina modificadora de *gating*. A caracterização de  $\kappa$ -Ktx como modificadoras de *gating* corrobora com dados previamente descritos na literatura com a modulação das cinéticas de ativação, entretanto, não era descrita a capacidade de modular a probabilidade de abertura com a possível estabilização do estado fechado.

O segundo capítulo estuda a interação de anestésicos gerais com canais iônicos dependentes de voltagem. O mecanismo de ação dos anestésicos gerais foi compreendido por décadas pela interação inespecífica com membranas celulares, sendo substituída com observação da interação com canais iônicos. O anestésico intravenoso propofol inibiu os canais  $Na_v$  com mecanismo associado ao acoplamento da ativação-inibição, todavia o canal  $Na_v1.4$  apresentou um mecanismo de inibição que não indica estar relacionado ao acoplamento. O sedativo TCE 5 mM inibiu os canais  $Na_v$  com hiperpolarização nas probabilidades do SSI, com efeito predominante em  $Na_v1.7$ , indicando possivelmente o mecanismo associado ao efeito analgésico. No canal  $K_v1.2$  TCE a 5mM promoveu inibição de

corrente, contudo esse efeito foi revertido em  $K_v1.2$ -FRAKT com potencialização das correntes, interagindo com a região do *Linker* S4-S5, assim como proposto previamente para propofol e sevoflurano. Foi desenvolvido um modelo celular com características neuronais e expressão dos canais  $K_v1.2$  ( $K_v1.2$ SH-SY5Y-RA- $K_v1.2$ ) funcional para investigação do efeito isolado de  $K_v1.2$  na presença de Sevoflurano sobre a excitabilidade de membrana. Esse modelo foi capaz de demonstrar a hiperpolarização na repolarização após potencial de ação, efeito consistente com a potencialização da condutância de  $K_v1.2$  por sevoflurano.

### **Abstract**

Ion channels are essential elements of membrane excitability, responsible for signal transmission and transduction in neurons, and can be modulated by peptide toxins and general anesthetics. In the first chapter of this work,  $\kappa$ -KTx, which are scorpion peptide toxins with the  $Cs\alpha/\alpha$  structural motif active on voltage-dependent potassium channels, are studied. In a previous study,  $\kappa$ -KTx 2.2 Omtx2 was considered a modulator of insulin secretion in isolated pancreatic islets, and an evaluation of the toxins  $\kappa$ -KTx 2.6 Ocyc9 and  $\kappa$ -KTx 2.2 Omtx2 demonstrated potential effects on  $Ca_v2.3$  channels. In the present work, the activity of Ocyc9 and Omtx2 toxins was evaluated on  $Ca_v2.3$ ,  $K_v$ ,  $Na_v$ , TRP, nAchr, and ENaC channels. At concentrations between 100 nM and 10  $\mu$ M, both toxins showed no effect on the tested channels. These results, along with those described by Sarmiento (2019), indicate that the modulation of glucose-dependent insulin secretion cannot be justified by the interaction of  $\kappa$ -KTx 2.2 and 2.6 with ion channels described in pancreatic  $\beta$ -cells.  $\kappa$ -KTx are understood as low-affinity pore blockers requiring high concentrations to induce inhibition. At 500  $\mu$ M, Ocyc9 and Omtx2 toxins inhibited the amplitude of currents in  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$ ,  $K_v1.4$ , and Shaker IR channels, indicating that the inhibition is associated with a shift in the opening probability, characterizing their function as gating modifier toxins. The characterization of  $\kappa$ -KTx as gating modifiers supports previously described data in the literature on the modulation of activation kinetics; however, their ability to modulate the opening probability with possible stabilization of the closed state was not described.

The second chapter studies the interaction of general anesthetics with voltage-dependent ion channels. For decades, the mechanism of action of general anesthetics was understood as nonspecific interaction with cell membranes, later replaced by the

observation of interaction with ion channels. The intravenous anesthetic propofol inhibited  $\text{Na}_v$  channels with a mechanism associated with activation-inhibition coupling; however, the  $\text{Na}_v1.4$  channel showed an inhibition mechanism not related to coupling. The sedative TCE 5 mM inhibited  $\text{Na}_v$  channels with hyperpolarization in SSI probabilities, predominantly affecting  $\text{Na}_v1.7$ , possibly indicating a mechanism associated with analgesic effect. In  $\text{K}_v1.2$  channels, TCE at 5 mM promoted current inhibition; however, this effect was reversed in  $\text{K}_v1.2$ -FRAKT with current potentiation, interacting with the S4-S5 linker, as previously proposed for propofol and sevoflurane. A neuronal characteristic cell model with  $\text{K}_v1.2$  channel expression ( $\text{K}_v1.2\text{SH-SY5Y-RA-K}_v1.2$ ) was developed to investigate the isolated effect of  $\text{K}_v1.2$  in the presence of sevoflurane on membrane excitability. This model demonstrated hyperpolarization during repolarization after action potential, consistent with potentiation of  $\text{K}_v1.2$  conductance by sevoflurane.

## **Agradecimentos**

Inicialmente, gostaria de agradecer aos meus pais e minha família que sempre me forneceram todo suporte necessário para que eu pudesse me dedicar aos meus estudos e realização dos meus sonhos.

Agradecer à minha companheira Júlia, pode ter me apoiado em todos os momentos, compreensão, incentivo e carinho durante essa jornada.

Agradecer à minha orientadora Elisabeth Ferroni, que desde 2013 me orienta nessa carreira científica, sendo uma pessoa paciente, carinhosa, dedicada ao ensino e me ofereceu todos o suporte para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Serei eternamente grato por todo o período que fui seu aluno.

Agradecer ao meu co-orientador Werner Treptow por todas as discussões e ideias trocadas durante esses anos de doutorado, fundamental para o desenvolvimento dessa tese.

Agradecer ao meu orientador no exterior durante doutorado sanduiche Jan Tytgat, que abriu as portas do seu laboratório na KU Leuven-Bélgica, me ofereceu todas as condições necessárias para desempenhar meu trabalho, acompanhou de perto todo o desenvolvimento e propiciou discussões engrandecedoras.

Agradecer aos meus colegas de laboratório que fizeram parte dessa jornada Jonathan Martins, Israel Araújo, Daniel da Mata, Gabriel Ahovay e Danilo Gustavo. Um agradecimento especial ao grande amigo que fiz dentro do laboratório Adolfo Carlos, que fez os dias de trabalho ficarem mais animados, com conversas sobre assuntos cotidianos e científicos.

Agradecer a doutoranda Heloísa Antoniella e sua orientadora Kelly Grace pela parceria durante o projeto, realizando o cultivo e desenvolvimento da metodologia utilizada para diferenciação celular SH-SY5Y-RA.

Agradecimento a CAPES pelo apoio financeiro pela bolsa de doutorado (88887.495599/2020-00) e a bolsa de doutorado sanduíche (88887.836738/2023-00), permitindo minha dedicação exclusiva para o desenvolvimento dessa tese.

Agradecimentos ao CNPQ e FAPDF pelo apoio financeiro com seus projetos para a realização desse projeto.

# Sumário

<b>Introdução.....</b>	<b>15</b>
Eletrofisiologia.....	15
Técnica de <i>Two Electrode Voltage Clamp</i> – TEVC.....	17
Técnica de <i>Patch Clamp</i> .....	19
Transmissão de sinais nos organismos.....	20
Canais iônicos.....	21
Canais dependentes de ligantes – Receptores ionotrópicos de acetilcolina - nAChRs.....	22
Canais dependentes de voltagem.....	23
Canalopatias.....	27
Moduladores e bloqueadores de canais iônicos dependentes de voltagem.....	28
<b>Capítulo 1 – <math>\kappa</math>-KTx Ocyc9 e Omtx2, fracas bloqueadoras ou moduladoras de gating?</b>	<b>30</b>
<b>1.1 - Introdução.....</b>	<b>30</b>
Escorpiões: Generalidades.....	30
Gênero <i>Opisthacanthus</i> .....	31
Componentes da peçonha de escorpião.....	31
Os peptídeos da peçonha de escorpiões.....	32
Toxinas ativas em canais de potássio dependente de voltagem.....	33
A família das toxinas $\kappa$ -KTx.....	34
<i>Opisthacanthus cayaporum</i> .....	37
<i>Opisthacanthus madagascariensis</i> .....	38
Estudos prévios com Ocyc9 e Omtx2.....	39
Mecanismo de secreção de insulina por células beta pancreáticas - dependência do metabolismo oxidativo e do potencial de membrana.....	39
<b>1.2 - Justificativa.....</b>	<b>42</b>
<b>1.3 – Objetivos do capítulo 1.....</b>	<b>42</b>
<b>1.4 - Metodologia capítulo 1.....</b>	<b>43</b>
1.4.1 - Origem das toxinas Ocyc9 e Omtx2.....	43
1.4.2 - Cromatografia dos peptídeos sintéticos Ocyc9 e Omtx2.....	43
1.4.3 - Cromatografia da fração de peçonha bruta contendo o peptídeo Ocyc9.....	43
1.4.4 - Espectrometria de massas - MALDI TOF.....	44
1.4.5 - Quantificação de proteína – Método colorimétrico do Ácido Bicinconínico (BCA).....	44
1.4.6 - Cultura de células de mamífero.....	44
1.4.7 - Transfecção transiente das células com DNAs plasmideais.....	45

1.4.8 - <i>Patch Clamp</i> em configuração <i>Whole Cell</i> .....	45
1.4.9 Análise do registro eletrofisiológico – Correntes dos Canais $Ca_v$ .....	46
1.4.10 – Isolamento de ovócitos de <i>Xenopus laevis</i> .....	47
1.4.11 – Preparação de RNA mensageiro e purificação.....	48
1.4.12 – Injeção de RNA mensageiro.....	48
1.4.13 – <i>Two Electrode Voltage Clamp</i> .....	48
1.4.14 – Protocolo de registros – <i>Two Electrode Voltage Clamp</i> .....	49
1.4.15 – Análises de dados eletrofisiológicos.....	51
<b>1.5 – Resultados.....</b>	<b>53</b>
1.5.1 Cromatografia dos peptídeos sintéticos Ocyc9 e Omtx2.....	53
1.5.2 - Cromatografia do peptídeo natural Ocyc9.....	54
1.5.3 - Espectrometria de massa dos peptídeos sintéticos Ocyc9 e Omtx2.....	55
1.5.4 - Espectrometria de Massa do peptídeo natural Ocyc9.....	56
1.5.5 - Quantificação dos peptídeos.....	57
1.5.6 - Busca de sequências homólogas em bancos de dados e alinhamento múltiplo.....	58
1.5.7 - Eletrofisiologia em canal de cálcio dependente de voltagem $Ca_v2.3e$ .....	58
2.5.8 - Eletrofisiologia em canais $K_v$ <i>screening</i> a 10 $\mu M$ .....	61
1.5.9 – Eletrofisiologia em canais dependentes de ligantes.....	66
1.5.10 – Eletrofisiologia $K_v1.x$ e Shaker IR a 500 $\mu M$ .....	70
1.5.11 - Eletrofisiologia em canais $Na_v$ .....	76
<b>1.6 – Discussão.....</b>	<b>81</b>
<b>1.7 - Conclusão.....</b>	<b>87</b>
<b>1.8 – Perspectivas futuras Capítulo 1.....</b>	<b>88</b>
<b>Capítulo 2 – Anestésicos e canais iônicos, seletividade dentro da inespecificidade. 89</b>	
<b>2.1 - Introdução capítulo 2.....</b>	<b>89</b>
Anestesia geral.....	89
Mecanismo moleculares propostos para a interação de anestésicos gerais.....	90
Receptores de membrana envolvidos com anestesia geral.....	92
Os agentes anestésicos utilizados neste estudo.....	96
Anestésicos Injetáveis.....	97
<b>2.2 - Justificativa.....</b>	<b>100</b>
<b>2.3 - Objetivos.....</b>	<b>101</b>
<b>2.4 - Metodologia.....</b>	<b>102</b>
2.4.1 - Cultivo celular e diferenciação células SH-SY5Y.....	102

2.4.2 – Genes transfectados.....	102
2.4.3 – Patch Clamp Whole Cell.....	103
2.4.4 – Análises estatísticas.....	105
2.4.5 - Metodologia para perfusão de anestésico volátil Sevoflurano.....	105
2.4.6 - Quantificação de anestésicos voláteis – CG/MS Headspace.....	105
<b>2.5 - Resultados.....</b>	<b>107</b>
2.5.1 – Modulação do funcionamento de isoformas de canais de sódio dependentes de voltagem por propofol.....	107
2.5.2 – Caracterização da atividade de tricloroetanol nas isoformas de canais $Na_v$ .....	112
2.5.3 – Avaliação da modulação de isoformas de canais de potássio dependentes de voltagem por Tricloroetanol.....	116
2.5.4 Resultados modelo celular SH-SY5Y-RA.....	118
2.6 Discussão.....	121
2.7 Conclusão.....	127
2.8 Perspectivas Futuras.....	128
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>129</b>

### Lista de ilustrações

<i>Figura 1 - Sistema elétrico do Two Electrode Voltage Clamp em um ovócito. Adaptado de Guan et al 2013.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 2 – Fotografias do sistema de eletrofisiologia Two Electrode Voltage Clamp. (A) Fotografia do sistema no laboratório do Professor Jan Tytgat – KU Leuven Bélgica. (B) Fotografia via lupa da câmara de registro. (C) Ovócitos isolados de Xenopus laevis.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 3 - Representação esquemática Patch Clamp. Figura adaptada de Sigworth &amp; Neher, 1980.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 4 - Fotografias do sistema de eletrofisiologia patch clamp. (A) Fotografia do sistema no laboratório da Professora Elisabeth Ferroni – Universidade de Brasília, Brasil. (B) Fotografia através da objetiva de microscópio mostrando um cultivo de células SH-SY5Y e o clameamento de uma célula com uma micropipeta durante registro.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 5 - Estrutura tridimensional do canal de Potássio dependente de voltagem <math>K_v1.3</math>. (A) Representação tipo ribbon do monômero do domínio 1 do canal <math>K_v1.3</math> com representação das alfas hélices. (B) Representação ribbon da visão lateral do Canal <math>K_v1.3</math> com os 4 domínios formados. (C) Representação ribbon Visão superior do canal <math>K_v1.3</math> com íon potássio no centro. (D) Representação surface da visão superior do canal de <math>K_v1.3</math>. Pdb: 7ssx. Modelos visualizados com software ChimeraX.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 6 – Alinhamento das sequências do filtro de seletividade de eucariotos e procariotos. Os quatro domínios do <math>Nav1.2</math> de Homo sapiens, <math>NaChBac</math> de Bacillus halodurans e <math>Na_vab</math> de Aliarcobacter butzleri.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 7 - Estruturas de toxinas peptídicas de escorpião. (A) Toxina NDBP IsCT de Opisthacanthus madagascariensis. (B) <math>\alpha</math>-KTx Vm24 de Vaejovis mexicanus. (C) Ts3 <math>\alpha</math>-NaScTx de Tityus serrulatus. (D) <math>\kappa</math>-KTx Omtx2 de Opisthacanthus madagascariensis. Figuras geradas com software ChimeraX – Universidade da Califórnia. Resíduo cisteína e pontes dissulfeto coloridos em amarelo.....</i>	<i>33</i>

<i>Figura 8 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das toxinas das famílias de <math>\kappa</math>-KTxs. Alinhamento das 5 famílias de <math>\kappa</math>-KTxs e assinatura padrão em vermelho para as famílias com esta classificação.</i>	36
<i>Figura 9 - Estrutura do cristal do hexâmero de insulina aprisionando o íon <math>Zn^{2+}</math> estabilizando a estrutura. PDB ID: 1MSO.</i>	40
<i>Figura 10 - Protocolos de voltagem Two-Electrode Voltage Clamp. (A) Protocolo de pulso com estímulos a 0 mV e -50 mV em sequência para <math>K_v1.1</math>, <math>K_v1.3</math>, <math>K_v1.4</math>, <math>K_v1.5</math>, <math>K_v1.6</math>, Shaker IR, <math>K_v4.2</math> e <math>K_v4.3</math>. (B) Estímulo e 20 mV durante 700ms para os canais <math>K_v7.1</math>, <math>K_v7.2/K_v7.3</math>, <math>K_v7.4</math>, <math>K_v7.5</math>, KQT1 e <math>K_v10.1</math>. (C) Protocolo para indução de correntes de cauda em <math>K_v11.1</math> (hErg1). (D) Protocolo de leitura das correntes ativadas por ligante utilizando uma voltagem de repouso para nAChRs, ENAC, LmGluCl. (E) rampa de voltagem de -120mV até 80 mV para os canais TRPV1 e TRPA1. (F) protocolo de voltagem double-step utilizando em <math>Na_v1.8</math> para ativação de correntes na ativação e correntes disponíveis na inativação.</i>	51
<i>Figura 11 - Cromatografia líquida de alta eficiência RP-HPLC Ocyc9 sintético. 27 <math>\mu</math>g do peptídeo foram utilizados nessa cromatografia. O peptídeo elui aos 25,45 % de ACN.</i>	53
<i>Figura 12 - Cromatografia líquida de alta eficiência RP-HPLC Omtx2 sintético. 55 <math>\mu</math>g do peptídeo foram utilizados nessa cromatografia. O peptídeo Omtx2 elui aos 23,10% de ACN.</i>	54
<i>Figura 13 - Cromatografia líquida de alta eficiência RP-HPLC em coluna C18. O peptídeo elui aos 23,53% de ACN.</i>	54
<i>Figura 14 - Espectrometria de massa MALDI TOF, peptídeo sintético Ocyc9. Foi detectada a massa monoisotópica <math>[M+H]^+</math> = 2545.13 Da. Foram detectados os adutos de sódio <math>[M+Na]^+</math> de 2567.13 e de potássio <math>[M+K]^+</math> de 2583.09.</i>	55
<i>Figura 15 - Espectrometria de massa MALDI TOF, peptídeo sintético Omtx2. Foi detectada a Massa monoisotópica <math>[M+H]^+</math> = 3146.40 Da e os adutos de sódio <math>[M+Na]^+</math> = 3168.33 e de potássio <math>[M+K]^+</math> = 3184,31.</i>	56
<i>Figura 16 - Espectrometria de massa MALDI ToF do peptídeo Nativo Ocyc9. Foi detectada a massa monoisotópica <math>[M+H]^+</math> de 2545.52 e os adutos de sódio <math>[M+Na]^+</math> de 2567.51 e de potássio <math>[M+K]^+</math> de 2583.51.</i>	57
<i>Figura 17 - Alinhamentos múltiplo das sequências com identidade com Ocyc9 e Omtx2. As sequências com homologia identificadas nos bancos de dados UniProt KB e Swiss-Prot. Representação do padrão das pontes dissulfeto Cys1-Cys4 e Cys2-Cys3.</i>	58
<i>Figura 18 - Caracterização da atividade das toxinas Ocyc9 e Omtx2 no canal <math>Ca_v2.3e</math>. Correntes foram registradas considerando o decaimento da amplitude natural rundown. (A) Ocyc9 300 nM. (B) Ocyc9 3 <math>\mu</math>M. (C) Omtx2 300 nM. (D) Omtx2 3 <math>\mu</math>M. (E) Ocyc9 nativa 300 nM. (F) Traço de corrente representativa de <math>Ca_v2.3e</math>. Registros com a técnica patch clamp whole cell em células HEK293T com expressão transiente de canais <math>Ca_v2.3e</math>.</i>	60
<i>Figura 19 - Screening canais <math>K_v</math> Ocyc9 10 <math>\mu</math>M Bloco 1. (A) <math>K_v1.1</math>. (B) <math>K_v1.2</math>. (C) <math>K_v1.3</math>. (D) <math>K_v1.4</math>. (E) <math>K_v1.5</math>. (F) <math>K_v1.6</math>. (G) Shaker IR. (H) <math>K_v4.2</math>. (I) <math>K_v4.3</math>. Traços em preto representa correntes registradas na condição controle e traços azuis representam correntes registradas na condição de 10 <math>\mu</math>M de Ocyc9. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.</i>	62

Figura 20 - Screening canais $K_v$ Ocyc9 10 $\mu$ M Bloco 2. (A) $K_v7.1$ . (B) $K_v7.2/3$ . (C) $K_v7.4$ . (D) $K_v7.5$ . (E) KQT1. (F) $K_v10.1$ . (G) $K_v11.1$ . Traços em preto representa correntes registradas na condição controle e traços azuis representam correntes registradas na condição de 10 $\mu$ M de Ocyc9. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....	63
Figura 21 - Screening canais $K_v$ Omtx2 10 $\mu$ M Bloco 1. (A) $K_v1.1$ . (B) $K_v1.2$ . (C) $K_v1.3$ . (D) $K_v1.4$ . (E) $K_v1.5$ . (F) $K_v1.6$ . (G) Shaker IR. (H) $K_v4.2$ . (I) $K_v4.3$ . Traços em preto representa correntes registradas na condição controle e traços azuis representam correntes registradas na condição de 10 $\mu$ M de Omtx2. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....	64
Figura 22 - Screening canais $K_v$ Omtx2 10 $\mu$ M Bloco 2. (A) $K_v7.1$ . (B) $K_v7.2/3$ . (C) $K_v7.4$ . (D) $K_v7.5$ . (E) KQT1. (F) $K_v10.1$ . (G) $K_v11.1$ . Traços em preto representa correntes registradas na condição controle e traços azuis representam correntes registradas na condição de 10 $\mu$ M de Omtx2. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....	65
Figura 23 - Gráficos comparativos da porcentagem de inibição das toxinas Ocyc9 e Omtx2 em canais $K_v$ a 10 $\mu$ M.....	66
Figura 24 - Receptores nicotínicos de acetilcolina, avaliação do efeito antagonista da Ocyc9 10 $\mu$ M. (A) Receptor de acetilcolina $\alpha 7$ . (B) Receptor de acetilcolina $\alpha 3\beta 4$ . Correntes foram ativadas com a perfusão em pulsos de cloreto de acetilcolina a 10 $\mu$ M. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....	67
Figura 25 - Receptores nicotínicos de acetilcolina, avaliação do efeito antagonista da Omtx2 a 10 $\mu$ M. (A) Receptor de acetilcolina $\alpha 7$ . (B) Receptor de acetilcolina $\alpha 3\beta 4$ . Correntes foram ativadas com a perfusão em pulsos de cloreto de acetilcolina a 10 $\mu$ M. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos...	67
Figura 26 - Avaliação da atividade da toxina Ocyc9 a 10 $\mu$ M no canal de cloreto dependente de Glutamato de <i>Locusta migratória</i> ( <i>LmGluCl</i> ). Barra na parte superior da figura representa a solução perfundida momentaneamente, cor cinza para solução ND96, Azul para solução ND96 com adição de 100 $\mu$ M de Glutamato e vermelho para ND96 com a toxina. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....	68
Figura 27 - Avaliação da atividade da toxina Omtx2 a 10 $\mu$ M no canal de cloreto dependente de Glutamato de <i>Locusta migratoria</i> ( <i>LmGluCl</i> ). Barra na parte superior da figura representa a solução perfundida momentaneamente, cor cinza para solução ND96, Azul para solução ND96 com adição de 100 $\mu$ M de Glutamato e vermelho para ND96 com a toxina. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....	68
Figura 28 - Avaliação no bloqueio de correntes $Na^+$ em canais ENaC $\alpha\beta\gamma$ – Ocyc9 10 $\mu$ M. Barra na parte superior da figura representa a solução perfundida momentaneamente, cor cinza para solução ND96, Azul para solução HK (High $K^+$ ) e vermelho para ND96 com a toxina. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....	69
Figura 29 - Avaliação no bloqueio de correntes $Na^+$ em canais ENaC $\alpha\beta\gamma$ – Omtx2 10 $\mu$ M. Barra na parte superior da figura representa a solução perfundida momentaneamente, cor cinza para solução ND96, Azul para solução HK (High $K^+$ ) e vermelho para ND96 com a toxina. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....	69

<i>Figura 30 - Avaliação da atividade da toxina Ocyc9 em canais TRP. (A) Canal TRPV1 estimulado com rampa de voltagem e capsaicina a 10 <math>\mu</math>M. (B) Canal TRPA1 estimulado com rampa de voltagem e AITC a 20 <math>\mu</math>M. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 31 - Avaliação da atividade da toxina Omtx2 em canais TRP. (A) Canal TRPV1 estimulado com rampa de voltagem e capsaicina a 10 <math>\mu</math>M. (B) Canal TRPA1 estimulado com rampa de voltagem e AITC a 20 <math>\mu</math>M. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 32 - Modulação de correntes de canais da família <math>K_v1.x</math> de mamíferos e Shaker IR de insetos por Ocyc9 a 500 <math>\mu</math>M. (A, B) Traços do registro <math>K_v1.1</math> e relação I/V. (C, D) Traços do registro <math>K_v1.3</math> e relação I/V. (E, F) Traços do registro <math>K_v1.4</math> e relação I/V. (G, H) Traços do registro Shaker IR e relação I/V. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 33 - Modulação de correntes de canais da família <math>K_v1.x</math> de mamíferos e Shaker IR de insetos por Omtx2 500 <math>\mu</math>M. (A, B) Traços do registro <math>K_v1.1</math> e relação I/V. (C, D) Traços do registro <math>K_v1.3</math> e relação I/V. (E, F, G) Traços do registro <math>K_v1.4</math> e relação I/V. (H, I) Traços do registro Shaker IR e relação I/V. Registros com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 34 - Avaliação da atividade da Ocyc9 1 <math>\mu</math>M em isoformas de <math>Na_v</math>. (A, B) Traços do registro <math>Na_v1.3</math> e probabilidades de aberturas Po e SSI. (C, D) Traços do registro <math>Na_v1.5</math> e probabilidades de aberturas Po e SSI. (E, F) Traços do registro <math>Na_v1.7</math> e probabilidades de aberturas Po e SSI. (G, H) Traços do registro <math>Na_v1.8</math> e probabilidades de aberturas Po e SSI. Traços na cor preta representam a condição controle. Traço na cor azul condição na presença da toxina a 1 <math>\mu</math>M (10 <math>\mu</math>M para <math>Na_v1.8</math>). Círculos abertos representam a probabilidade de abertura na inativação e quadrados abertos representam a probabilidade de abertura na inativação. <math>Nav1.3</math>, <math>Nav1.5</math> e <math>Nav1.6</math> registrado com a técnica de patch clamp Whole cell em células HEK e CHO. <math>Nav1.8</math> registrado com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 35 - Avaliação da atividade da Omtx2 1 <math>\mu</math>M em isoformas de <math>Na_v</math>. (A, B) Traços do registro <math>Na_v1.3</math> e probabilidades de aberturas Po e SSI. (C, D) Traços do registro <math>Na_v1.5</math> e probabilidades de aberturas Po e SSI. (E, F) Traços do registro <math>Na_v1.7</math> e probabilidades de aberturas Po e SSI. (G, H) Traços do registro <math>Na_v1.8</math> e probabilidades de aberturas Po e SSI a 10 <math>\mu</math>M. Traços do registro <math>Na_v1.8</math> e probabilidades de aberturas Po e SSI. Traços na cor preta representam a condição controle. Traço na cor azul condição na presença da toxina a 1 <math>\mu</math>M (10 <math>\mu</math>M para <math>Na_v1.8</math>). Círculos abertos representam a probabilidade de abertura na inativação e quadrados abertos representam a probabilidade de abertura na inativação. <math>Nav1.3</math>, <math>Nav1.5</math> e <math>Nav1.6</math> registrado com a técnica de patch clamp Whole cell em células HEK e CHO. <math>Nav1.8</math> registrado com a técnica Two electrode voltage clamp em ovócitos.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 36 - Correlação de Meyer-Overton para anestésicos inaláveis. Figura adaptada (Campagna and Forman, 2003).....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 37 – Representação da estrutura molecular Sevoflurano.....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 38 - Conversão metabólica do hidrato de cloral em Tricloroetanol. Reação metabolizada in vivo pelo conjunto das enzimas álcool desidrogenases.....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 39 – Representação da estrutura molecular do Propofol; 2,6 diisopropilfenol.....</i>	<i>98</i>

Figura 40 - Quantificação de Sevoflurano por CG/MS com injeção Headspace. (A) Cromatografia em fase gasosa dos padrões para curva de calibração. (B) Ion detectados na fração cromatográfica. (C) Curva de quantificação com os padrões.....	106
Figura 41 – Inibição do pico de corrente em canais de sódio dependentes de voltagem por Propofol em três concentrações. Dados apresentados como valores médios e barras de erro padrão. $n \geq 3$ para todas as análises. ....	107
Figura 42 - Probabilidade de abertura durante ativação (pO) em subtipos de $Na_v$ modulada por Propofol a 10 $\mu$ M. (A) $Na_v1.1$ . (B) $Na_v1.2$ . (C) $Na_v1.3$ . (D) $Na_v1.4$ . (E) $Na_v1.5$ . (F) $Na_v1.6$ . (G) $Na_v1.7$ . Registros realizado com a técnica patch clamp Whole cell em células HEK e CHO.....	109
Figura 43 - Avaliação da variação do $V_{1/2}$ nos canais de sódio dependentes de voltagem após aplicação de três concentrações de Propofol (10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M e 100 $\mu$ M). Valores em média e barras de erros representam o erro padrão. Valores negativos representam o deslocamento do $V_{1/2}$ para potenciais polarizantes, valores positivos representam o deslocamento para potenciais mais despolarizantes. (*) Representa diferença estatística significativa em Anova com pós teste de Tukey 's em comparação a todas as médias.....	109
Figura 44 - Steady-State Inactivation (SSI) dos Canais $Na_v$ modulados por Propofol. (A) $Na_v1.1$ . (B) $Na_v1.2$ . (C) $Na_v1.3$ . (D) $Na_v1.4$ . (E) $Na_v1.5$ . (F) $Na_v1.6$ . (G) $Na_v1.7$ . Registros realizado com a técnica patch clamp Whole cell em células HEK e CHO.....	110
Figura 45 - Avaliação da variação do $V_{1/2h}$ em canais de sódio dependentes de voltagem após aplicação de três concentrações de Propofol (10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M e 100 $\mu$ M). Valores em média e barras de erros representam o erro padrão. Valores negativos representam o deslocamento do $V_{1/2h}$ para potenciais polarizantes, valores positivos representam o deslocamento para potenciais mais despolarizantes. (*) Representa diferença estatística significativa em Anova com pós teste de Tukey's em comparação a todas as médias.....	111
Figura 46 - Inibição do pico de corrente das isoformas de $Na_v$ com 5 mM de TCE. Valores de média e erro padrão.....	112
Figura 47 - Probabilidades de abertura ativação e disponibilidade de canais inativados das isoformas $Na_v$ na presença de TCE a 5 mM. (A) $Na_v1.1$ . (B) $Na_v1.2$ . (C) $Na_v1.3$ . (D) $Na_v1.4$ . (E) $Na_v1.5$ . (F) $Na_v1.6$ . (G) $Na_v1.7$ . Círculos representam a curva de disponibilidade de canais durante inativação na condição controle (preto) e na condição TCE (azul). Quadrados representam a curva da probabilidade de abertura na ativação controle (preto) e na presença de TCE (Vermelho). Curvas foram ajustadas em função de Boltzmann. Valores demonstrados em média e erro padrão.....	113
Figura 48 - Gráficos comparativos da variação no valor de $V_{1/2h}$ do TCE em canais $Na_v$ . Valores de média e erro padrão. (*) representa diferença estatística em teste ANOVA one-way com pós teste de Tukey.....	114
Figura 49 – Avaliação da recuperação da inativação das isoformas na presença de 5 mM de TCE. (A) $Na_v1.1$ . (B) $Na_v1.2$ . (C) $Na_v1.3$ . (D) $Na_v1.4$ . (E) $Na_v1.5$ . (F) $Na_v1.6$ . (G) $Na_v1.7$ . Registros realizado com a técnica patch clamp Whole cell em células HEK e CHO.....	115
Figura 50 – Caracterização da modulação de TCE em $K_v1.3$ . (A) Curva EC50 da inibição de amplitude de corrente. (B) Traços brutos de corrente em $K_v1.3$ ativados a 40 mV na presença de TCE a 25 mM, traços pretos representam a condição controle e azuis na presença de TCE. (C) Curva da probabilidade de abertura da	

ativação, círculos pretos representam a condição controle e azuis na condição com 25 mM de TCE. Registros realizado com a técnica patch clamp Whole cell em células HEK293T.....	117
Figura 51 - Caracterização da modulação de TCE em $K_v1.2$ . (A) Traços brutos de corrente em $K_v1.2$ ativados a 40 mV na presença de TCE a 5 mM. (B) Curva da probabilidade de abertura da ativação. Círculos pretos representam a condição controle e azuis na condição com 25 mM de TCE. Registros realizado com a técnica patch clamp Whole cell em células HEK293T.....	117
Figura 52 - Caracterização da atividade do Tricloroetanol a 5 mM em $K_v1.2$ -FRAKT. (A) Tricloroetanol a 5 mM potencializa a amplitude de corrente de $K_v1.2$ -FRAKT. (B) Curva condutância por voltagem de $K_v1.2$ FRAKT e TCE 5 mM. (C) Probabilidade de abertura $K_v1.2$ FRAKT na presença de TCE 5 mM. Traços e símbolos em preto representa a condição controle e em Azul represente a condição com TCE 5 mM. Registros realizado com a técnica Patch clamp Whole Cell em células HEK293T.....	118
Figura 53 – Caracterização das correntes endógenas e probabilidades de aberturas do modelo SH-SY5Y diferenciada com ácidos retinóico. (A) Corrente endógenas de SH-SY5Y. (B) Curvas corrente por voltagem das densidades de corrente das células SH-SY5Y e SH-SY5Y-RA. (C) Demonstração de potenciais de ação induzidos em células SH-SY5Y-RA. Probabilidade de abertura durante ativação das correntes de entrada (D) e das correntes de saída (E). (F) Análise estatística dos valores de $V_{1/2}$ nas correntes de entrada e saída, realizada com teste t não pareado. Registros realizado com a técnica Patch clamp Whole Cell em células SH-SY5Y.....	119
Figura 54 - Registro de potenciais de ação induzidos. (A) Traços do potencial de ação das células SH-SY5Y-RA com sevoflurano a 0,3 mM. (B) parâmetros calculados do potencial de ação das células SH-SY5Y-RA e análise estatística test T pareado. (C) Traços do potencial de ação das células SH-SY5Y-RA- $K_v1.2$ com sevoflurano a 0,3 mM. (D) parâmetros calculados do potencial de ação das células SH-SY5Y-RA- $K_v1.2$ e análise estatística test T pareado. Registros realizado com a técnica Patch clamp Whole Cell em células SH-SY5Y.....	120
Figura 55 – Probabilidades de abertura ativação e disponibilidade de canais inativados do canal Nav1.4 na presença de Propofol. (A) 10 $\mu$ M. (B) 30 $\mu$ M. (C) 100 $\mu$ M. Círculos representam a curva de disponibilidade de canais durante inativação na condição controle (preto) e na condição Propofol (azul). Quadrados representam a curva da probabilidade de abertura na ativação controle (preto) e na presença de Propofol (Vermelho). Curvas foram ajustadas em função sigmoideal de Boltzmann. Valores demonstrados em média e erro padrão. Patch clamp Whole Cell.....	122

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Sequência e massas moleculares monoisotópicas dos peptídeos. Massa teórica monoisotópica calculada via software Isotope Pattern (Bruker Daltonics).....	56
Tabela 2 - Dados preliminares Ocyc9 em Cav2.3e. Porcentagem de bloqueios das correntes. Retirado da tese de doutorado de Beatriz Sarmiento (Sarmiento, 2019). C1-3 representam observações individuais.....	58
Tabela 3 - Dados preliminares Omtx2 em Cav2.3e. Porcentagem de bloqueios das correntes. Retirado da tese de doutorado de Beatriz Sarmiento (Sarmiento, 2019) C1-3 representam observações individuais.....	59

<i>Tabela 4 - Resumo da atividade nos canais Cav2.3e obtidos neste trabalho. Valores médios de porcentagem de inibição e erro padrão.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 5 - Porcentagem de inibição dos canais K<sub>v</sub> - Oyc9 10 μM. Valores médios de porcentagem de inibição e erro padrão.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 6 - Porcentagem de inibição dos canais K<sub>v</sub> – Omtx2 10 μM. Valores médios de porcentagem de inibição e erro padrão.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 7 - Parâmetros de inibição Oyc9 500 μM em canais K<sub>v</sub>. Valores médios de porcentagem de inibição e erro padrão. (*) representa diferença estatística em Teste T pareado (P&lt;0.05).....</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 8 – Parâmetros da probabilidade de abertura ativação dos canais K<sub>v</sub> Oyc9 500 μM. Valores médios e erro padrão. (*) representa diferença estatística em teste T pareado (P&lt;0.05).....</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 9 - Parâmetros de inibição Omtx2 500 μM em canais K<sub>v</sub>. Valores médios de porcentagem de inibição e erro padrão. (*) representa diferença estatística em teste T pareado (P&lt;0.05).....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 10 – Parâmetros da probabilidade de abertura ativação dos canais K<sub>v</sub> Omtx2 500 μM. Valores médios e erro padrão. (*) representa diferença estatística em teste T pareado (P&lt;0.05).....</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 11 - Parâmetros das probabilidades de abertura e inibição dos canais Na<sub>v</sub>– Oyc9 1 μM. Valores médios e erro padrão. (*) representa diferença estatística em teste T pareado (p&lt;0.05).....</i>	<i>78</i>
<i>Tabela 12 - Parâmetros das probabilidades de abertura e inibição dos canais Na<sub>v</sub>– Omtx2 1 μM. Valores médios e erro padrão. (*) representa diferença estatística em teste T pareado (P&lt;0.05).....</i>	<i>80</i>
<i>Tabela 13 - Alvos moleculares dos anestésicos. LGIC – sigla em inglês para canais iônicos dependentes de ligantes; VGIC - sigla em inglês para canais iônicos dependentes de voltagem. I – Inibidor, A – Ativador.....</i>	<i>98</i>
<i>Tabela 14 – Parâmetros da modulação das isoformas de Na<sub>v</sub> por Propofol. % Inibição representa a taxa de inibição da amplitude no pico da corrente. V<sub>1/2</sub> representa a voltagem em que metade dos canais estão ativados. V<sub>1/2h</sub> representa a voltagem em que metade dos canais estão inativados. Valores apresentados em média e erro padrão. * indica valores que apresentaram diferença estatística em teste t pareado.....</i>	<i>111</i>
<i>Tabela 15 – Parâmetros da modulação das isoformas de Na<sub>v</sub> por TCE. % Inibição representa a taxa de inibição da amplitude no pico da corrente. V<sub>1/2</sub> representa a voltagem em que metade dos canais estão ativados. V<sub>1/2h</sub> representa a voltagem em que metade dos canais estão inativados. T (Tau) representa a constante de tempo do ajuste na função exponencial da recuperação da inativação. Valores apresentados em média e erro padrão. * indica valores que apresentaram diferença estatística em teste t pareado.....</i>	<i>116</i>

# Introdução

## Eletrofisiologia

A eletrofisiologia, por definição, é o estudo dos fenômenos elétricos em organismos que teve como primeiro explorador Luigi Galvani na Itália, aproximadamente em 1780. No entanto, a primeira descrição de atividade elétrica em um organismo ocorreu 10 anos antes por John Walsh ao relatar a capacidade de enguias e arraias elétricas de gerarem choques elétricos (Piccolino and Bresadola, 2002). Os primeiros estudos de Galvani utilizando uma preparação de junção neuromuscular de pernas de sapos demonstraram que o estímulo com a descarga da *Leyden Jar* – um sistema capaz de armazenar eletricidade estática e liberar ao contato, um tipo de capacitor atualmente – induzia contração muscular (Piccolino, 1998; Parent, 2004).

O primeiro instrumento de eletrofisiologia criado foi um galvanômetro eletromagnético por Leopoldo Nobili em 1825, capaz de registrar pela primeira vez o sinal elétrico proveniente de uma preparação neuromuscular. Entretanto, o pesquisador explicou o processo como uma atividade termoelétrica proveniente da diferença de temperatura entre os extremos da preparação (Nobili, 1828).

Emil du Bois-Reymond, em 1848, registrou a variação em um potencial de membrana após uma despolarização, ou seja, observou o fenômeno elétrico relacionado a um potencial de ação o que chamou de *negative Schwankung* - Flutuação negativa (Du Bois-Reymond, 1848).

Julius Bernstein, em 1868, aprimorou o registro das flutuações negativas com a criação de um equipamento para registro em alta frequência, o *Differenttial Rheotome*, e foi responsável pela formulação da hipótese da membrana (Carmeliet, 2019). Sua hipótese de membrana celular assumia que a célula é cercada por uma membrana seletivamente permeável aos íons  $K^+$  e, devido à diferença de concentração de íons  $K^+$  entre os compartimentos celulares, um potencial intracelular negativo era gerado (Nilius, 2003; Carmeliet, 2019).

No final do mesmo século, Meyer e Overton estudando a relação entre o coeficiente de partição óleo/água de um anestésico e a permeabilidade a membrana celular, observaram que quanto maior o coeficiente, maior seu potencial narcótico (Meyer, 1899; Missner and Pohl, 2009). Com essas observações, propuseram que a membrana celular possui uma alta densidade de componentes lipossolúveis (Overton, 1902; Missner and Pohl, 2009).

Os trabalhos com axônio gigante de lula começaram em 1936 por John Z. Young, com a descrição de uma estrutura similar a tubos transparentes com 0,5 - 1mm de diâmetro que se prolongava pelo corpo (Carmeliet, 2019). Em 1939, em uma carta à revista Nature, foram publicados os primeiros registros de potencial de ação por Hodgkin e Huxley em axônio gigante de lula com a técnica de *current clamp*. Posteriormente, os dados foram discutidos em um artigo em 1945 (Hodgkin and Huxley, 1939, 1945).

Kenneth S. Cole e George Marmont em 1947 criaram a técnica de *voltage clamp* que foi aprimorada por Hodgkin e Huxley, com auxílio de Bernard Katz, resultando na publicação de cinco artigos em sequência na mesma revista em 1952 que revolucionaram a eletrofisiologia e foram agraciados com a premiação do Nobel em 1963 (Huxley, 2002; Carmeliet, 2019). Nos cinco artigos, foram descritas as relações corrente voltagem dos axônios gigantes (Hodgkin et al., 1952), as alterações nas correntes iônicas frente a diferentes concentrações iônicas (Hodgkin and Huxley, 1952b) e as condutâncias no axônio (Hodgkin and Huxley, 1952c, 1952d), levando ao modelo conhecido como Modelo Hodgkin-Huxley para correntes totais em uma membrana (Hodgkin and Huxley, 1952a).

$$I = Cm \frac{dV}{dt} + g_{Leak}(V - E_{Leak}) + g_K n^4 (V - E_K) + g_{Na} m^3 h (V - E_{Na})$$

Compreendendo a corrente total como igual à somatória da corrente capacitiva de membrana (Cm), a condutância de vazamento ( $g_{Leak}$ ), a condutância dos canais de potássio ( $g_K$ ) e a condutância dos canais de sódio ( $g_{Na}$ ) (Hodgkin and Huxley, 1952a).

Ao observarem as correntes isoladas de potássio, perceberam que se ajustariam em uma função exponencial de  $(V - E_K)^n$  com  $n = 4$ , referente a 4 partículas de *gating* para abertura do canal de potássio – algo que décadas após foi compreendido como os sensores de voltagem (Hille, 2001; Bezanilla, 2002; Hopper et al., 2022). A corrente de sódio foi definida

com duas fases, a fase de ativação e a fase de inativação rápida do canal, e se ajustaria na função exponencial  $(\tau)^m$  com  $m=3$  para ativação e a fase de inativação com uma exponencial  $(\tau)^h$  com  $h=1$ . Assumir a presença de partículas de *gating* iguais a quatro para os canais de sódio e potássio, sendo que o canal de sódio possui 3 para ativação e uma para inativação, foi revolucionário na época, ainda mais por não terem conhecimento da estrutura das proteínas naquela época (Hopper et al., 2022).

### Técnica de *Two Electrode Voltage Clamp* – TEVC

A técnica *Two Electrode Voltage Clamp* assim como o nome a descreve utiliza dois eletrodos para perfurar uma célula e controlar a voltagem de membrana. Para esse tipo de técnica são utilizados ovócitos da rã africana *Xenopus laevis*, devido à alta capacidade de síntese proteica que esta célula possui e facilidade de injetar o RNA mensageiro para a expressão da proteína de interesse (Guan et al., 2013).

Utilizando a figura para exemplificar o funcionamento de um circuito elétrico de um *Two-Eletrode Voltage Clamp*: o eletrodo 1 é responsável por registrar a voltagem de membrana  $V_m$  e o eletrodo 2 é responsável por controlar e medir a corrente que flui através da célula (Guan et al., 2013).

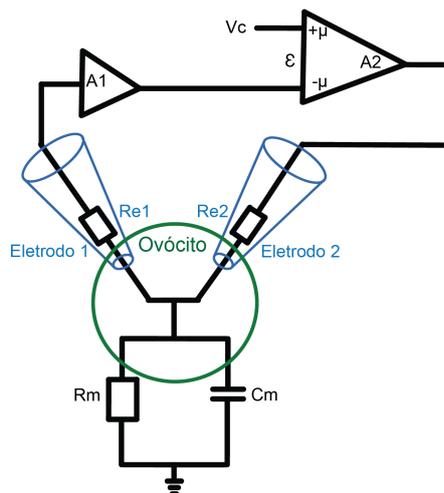


Figura 1 - Sistema elétrico do *Two Electrode Voltage Clamp* em um ovócito. Adaptado de Guan et al 2013.

O eletrodo 1 está ligado diretamente a um *Voltage Follower* (A1), que emite uma voltagem de saída aproximadamente igual à voltagem de membrana ( $V_m$ ) para o

amplificador de “clampeamento” (A2). Esse amplificador A2 é um amplificador diferencial de alto ganho que compara  $V_m$  com o sinal de comando de voltagem ( $V_c$ ). O amplificador A2 gera uma voltagem de saída que produz uma corrente proporcional à diferença ( $\epsilon$ ) entre  $V_m$  e  $V_c$  para ser injetada através do eletrodo 2 na célula e, assim, controla a voltagem na membrana, ou seja, o *voltage clamp*. Simultaneamente ao controle da voltagem de membrana pelo eletrodo 2, ocorre o registro da corrente que está sendo conduzida, sendo essa a corrente da membrana relativa a variações de voltagem imposta pelo amplificador, que pode representar a atividade de canais iônicos (Guan et al., 2013).

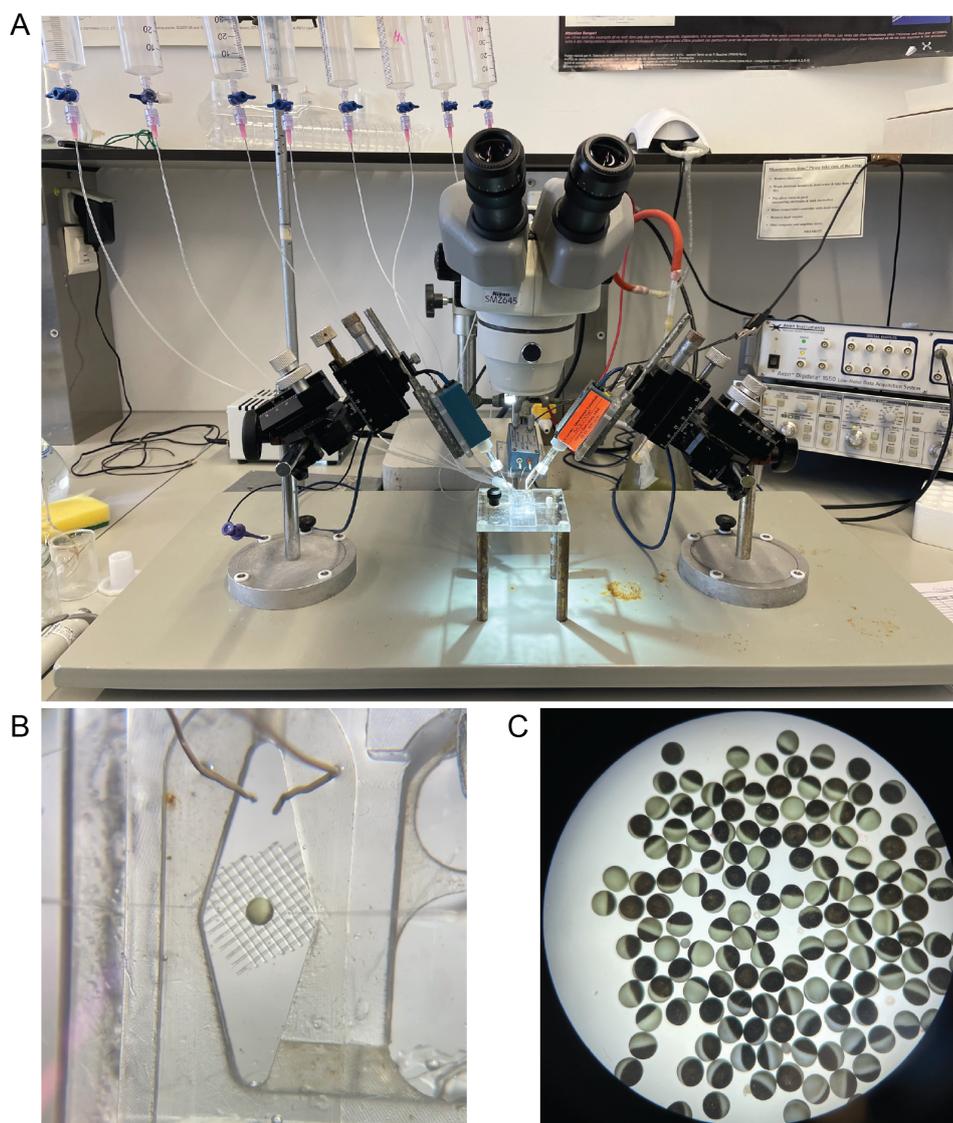


Figura 2 – Fotografias do sistema de eletrofisiologia *Two Electrode Voltage Clamp*. (A) Fotografia do sistema no laboratório do Professor Jan Tytgat – KU Leuven Bélgica. (B) Fotografia via lupa da câmara de registro. (C) Ovócitos isolados de *Xenopus laevis*.

## **Técnica de *Patch Clamp***

Em 1976, os pesquisadores Erwin Neher e Bert Sakmann publicaram o primeiro artigo com a técnica de *patch clamp* com a descrição das condutâncias flutuantes nas fibras musculares de sapos na presença de acetilcolina (Neher and Sakmann, 1976).

Neste trabalho, foi descrita a necessidade da utilização de uma micropipeta para isolar um pequeno pedaço (*patch*) da membrana e reduzir os ruídos da preparação. Dentro da micropipeta existe um eletrodo conectado diretamente a um circuito de aterramento virtual, do inglês *virtual-ground*, que permite a manutenção do clampeamento da voltagem na região do *patch*, além da capacidade de registrar as correntes (Neher and Sakmann, 1976). A parte intracelular do tecido está clampeada com uma preparação de *Two-Electrode Voltage Clamp* (Neher and Sakmann, 1976).

Posteriormente, em 1980, o mesmo grupo de pesquisadores aprimoraram a técnica com melhores micropipetas devido ao melhor polimento (Sigworth and Neher, 1980) e ao diâmetro de acesso aprimorado, obtendo selos, ou seja, interação da pipeta com a membrana celular de alta resistência, algo que ficou conhecido como giga selo devido à magnitude da resistência em  $G\Omega$ , permitindo registros com menores ruídos de fundo e capacidade de “clampear” a voltagem na membrana sem a necessidade de um sistema *Two-Electrode Voltage Clamp* (Sigworth and Neher, 1980; Verkhratsky and Parpura, 2014).

Diversas configurações de *patch clamp* para a exposição da membrana foram desenvolvidas após o giga selo, cada uma permitindo realização de estudos com a célula inteira (*whole cell*), apenas uma porção da membrana (*outside-out*), porção da membrana com a face intracelular exposta (*inside-out*), além do melhoramento da configuração inicial conhecida como *cell-attached* ou *on-cell* (Hamill et al., 1981; Sakmann and Neher, 1984).

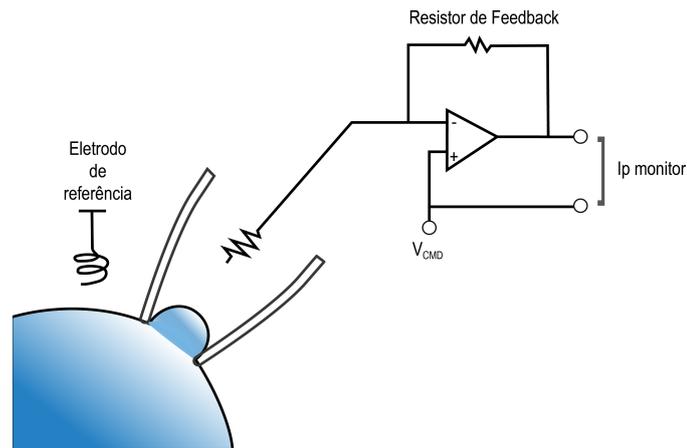


Figura 3 - Representação esquemática *Patch Clamp*. Figura adaptada de Sigworth & Neher, 1980.

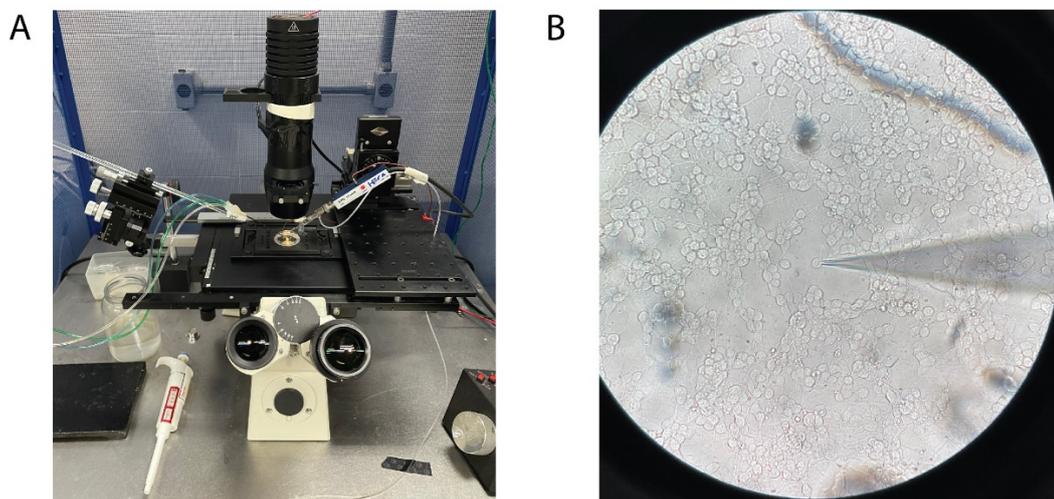


Figura 4 - Fotografias do sistema de eletrofisiologia *patch clamp*. (A) Fotografia do sistema no laboratório da Professora Elisabeth Ferroni – Universidade de Brasília, Brasil. (B) Fotografia através da objetiva de microscópio mostrando um cultivo de células SH-SY5Y e o clameamento de uma célula com uma micropipeta durante registro.

### Transmissão de sinais nos organismos

O mecanismo para transmissão rápida de sinais no mesmo organismo ou entre organismos que foi selecionado ao longo da evolução foi a sinalização elétrica, como é observado entre comunidades de bactérias em biofilme (Prindle et al., 2015) e na resposta rápida de captura de insetos por plantas carnívoras (Hedrich and Kreuzer, 2023).

A transmissão de um sinal ao longo de um axônio neuronal ocorre com a geração de potenciais de ação, devido à ativação sequencial de canais iônicos que permitem a despolarização e a repolarizações rápidas da membrana celular, propagando esse sinal

despolarizante como pulso elétrico de uma extremidade à outra de um neurônio e que pode levar à liberação de neurotransmissores nas fendas sinápticas entre neurônios (Hille, 2001; Raghavan et al., 2019).

O potencial de ação ocorre quando a voltagem de membrana atinge o limiar de disparo devido a um estímulo excitatório. Após atingir o limiar de disparo, um canal associado a influxo de cátion (normalmente  $\text{Na}^+$ , mas em alguns sistemas pode ser guiado exclusivamente por  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Catterall et al., 2017), que amplifica o sinal excitatório, promove a rápida despolarização da membrana e atinge o limiar de ativação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ , sendo o efluxo deste último íon responsável pela repolarização da membrana (Raghavan et al., 2019).

O íon  $\text{Ca}^{2+}$ , diferente dos outros íons envolvidos no potencial de ação, não apenas carrega um sinal elétrico, como também é responsável pela transdução do sinal elétrico, uma vez que o  $\text{Ca}^{2+}$  é um segundo mensageiro intracelular para contração muscular, liberação de vesículas sinápticas, apoptose e regulação gênica (Dolphin, 2020; Catterall, 2023).

### **Canais iônicos**

Os canais iônicos são poros macromoleculares compostos de diversas subunidades, estruturado como proteínas transmembrânicas que permitem a passagem de um íon específico ou um conjunto de cátions/ânions pela região conhecida como poro, sendo que o fluxo iônico ocorre de forma passiva impulsionado pelo potencial eletroquímico (Hille, 2001).

Os canais iônicos diferenciam-se de simples poros celulares por possuírem seletividade ao íon transportado e mecanismo de resposta a estímulo para abrir/fechar o poro, chamado de *gating* (Goldschen-Ohm and Chanda, 2017), podendo ser de diferentes naturezas, como, por exemplo, elétrico, químico ou mecânico (Pak et al., 2015). O estímulo ao qual o canal iônico é sensível determina seu tipo, como os canais iônicos dependentes de voltagem - VGIC ( $\text{K}_v$ ,  $\text{Na}_v$ ,  $\text{Ca}_v$ ), os canais iônicos dependentes de ligante - LGIC (receptores de neurotransmissores, sensores químicos, cGMP, ativados por outro íon) e os sensíveis a estímulos mecânicos (Canais Piezzo) (Alexander et al., 2023).

## Canais dependentes de ligantes – Receptores ionotrópicos de acetilcolina - nAChRs

Os receptores de acetilcolina ionotrópicos são proteínas transmembrâncias que associam um sinal agonista da acetilcolina, nicotina ou outro agonista colinérgico com a abertura do poro seletivo para os cátions  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , associados diretamente a respostas excitatórios nos organismos (Alkondon et al., 1998; Zoli et al., 2018). Nos tecidos não nervosos, estes receptores estão associados com o processo de inflamação celular e a respostas imunes (Wessler and Kirkpatrick, 2008; Grando et al., 2012).

Cada subunidade possui um domínio N-terminal extracelular de aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos bem conservados, quatro domínios transmembrânicos (TM), um grande *loop* citoplasmático entre os domínios TM3-TM4 e uma região C-terminal (Albuquerque et al., 2009). No domínio extracelular, no N-terminal está presente o *Cys-Loop* espaçado por 13 resíduos de aminoácidos em mamíferos e pode existir a presença de um par de cisteínas (Cys-Cys) em sequência que é essencial para ligação do agonista, apresenta apenas nas subunidades alfa (Albuquerque et al., 2009). O segmento M2 em cada subunidade é responsável por delimitar o poro iônico, enquanto os segmentos M1 e M3 isolam estes da membrana lipídica (Zoli et al., 2015).

São descritas 16 isoformas desses canais em mamíferos, sendo 9 tipos de subunidades alfas ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ) e 7 não alfas ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ , e  $\epsilon$ ) definidas pela presença do par Cys-Cys próximo ao TM1 (Albuquerque et al., 2009). Os receptores de acetilcolina são estruturados em homo pentâmeros de subunidades alfas idênticas ou hetero pentâmeros com a combinação de subunidades alfas e betas. As combinações de subunidades propiciam diferentes características cinéticas e funções aos receptores e as diferenciam entre neuronais e musculares (Albuquerque et al., 2009).

Os homo pentâmeros  $\alpha 7$  possuem uma cinética rápida de ativação e estão presentes em sinapses rápidas (Borroni and Barrantes, 2021), enquanto que a subunidade  $\alpha 7$  associada à subunidade  $\beta 2$  apresenta funções metabotrópicas devido ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e a ativação de segundo mensageiros (Dajas-Bailador and Wonnacott, 2004).

## Canais dependentes de voltagem

### Canais de potássio dependentes de voltagem - $K_v$

Os canais de potássio dependentes de voltagem ( $K_v$ ) são a maior família de canais descritos atualmente, contando com 78 genes para expressão da subunidade alfa formadora de poro (Huang and Jan, 2014) e 13 genes para a subunidade beta auxiliar (Abbott, 2022). Inicialmente as famílias dos canais de potássio de mamíferos foram divididas em 4 ( $K_v1-4$ ), devido à similaridade com os genes descritos para *Drosophila*, Shaker, Shab, Shaw e Shal, sendo então nomeado  $K_v1$ ,  $K_v2$ ,  $K_v3$  e  $K_v4$ , respectivamente (Vacher et al., 2008). Posteriormente foram descritas outras subunidades e a família, sendo atualmente contabilizadas 12 famílias.

Os canais  $K_v$  são homo tetrâmeros ou hetero tetrâmeros, com quatro domínios principais (MacKinnon, 1991) referentes a cada domínio (D1-D4) e os monômeros são estruturados em 6 alfas hélices transmembrâncias, conhecidas como S1-S6 (Figura 5A) (Selvakumar et al., 2022).

As alfa hélices S1-S4 de cada domínio estão posicionadas na região periférica do canal e são responsáveis pela detecção na variação de voltagem e, por esta razão, são conhecidas como região sensível à voltagem e possuindo como fator essencial as alfa hélices S4 (Kuang et al., 2015; Selvakumar et al., 2022).

As alfa hélices S4, as hélices sensoras de voltagem, possuem uma alta densidade de resíduos de aminoácidos carregados positivamente (lisinas e argininas) que, frente a variações do campo elétrico, se deslocam e promovem o processo de *gating* (Bezanilla, 2002) com mudança conformacional em todo o canal e abertura do poro iônico, mecanismo também presente nos canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem (Bezanilla, 2018; Mandala and MacKinnon, 2022). O deslocamento da alfa hélice S4 devido à variação na voltagem de membrana promove a movimentação conjunta do *linker* intracelular S4-S5 e das alfa hélices S5 e S6 (Kalstrup and Blunck, 2018), finalizando com a abertura do poro iônico, sendo tal processo caracterizado como o *Coupling* eletromecânico (Long et al., 2005) para iniciar a condutância.

As alfas hélices S5-S6 dos quatro domínios ficam posicionadas na região central do canal iônico quando estruturado na membrana e são responsáveis pela formação da cavidade hidratada do poro iônico e o filtro de seletividade (Figura 5C, D) (Kuang et al., 2015). A seletividade ao íon  $K^+$  se dá pela presença de 5 resíduos de aminoácidos (TVGYD) na região *p-loop* (Doyle et al., 1998), que apresenta nas cadeias laterais oxigênios de agrupamentos carbonil que interagem exclusivamente com o íon  $K^+$  para remover e simultaneamente mimetizar a camada de solvatação, deixando este momentaneamente menor que o íon  $Na^+$  e permitindo assim apenas a condução deste íon seguido de re-hidratação (Kuang et al., 2015).

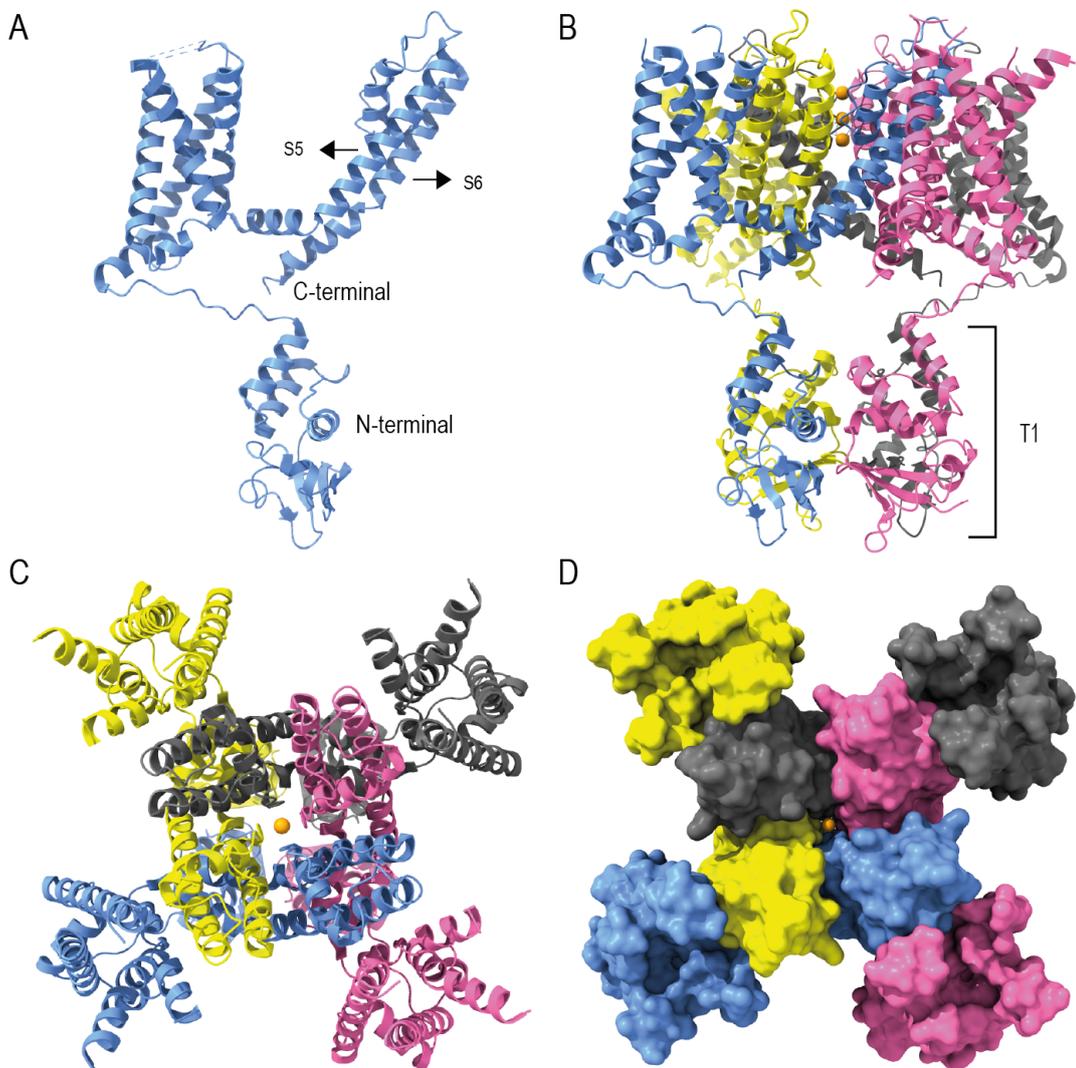


Figura 5 - Estrutura tridimensional do canal de Potássio dependente de voltagem  $K_v1.3$ . (A) Representação tipo *ribbon* do monômero do domínio 1 do canal  $K_v1.3$  com representação das alfas hélices. (B) Representação *ribbon* da visão lateral do Canal  $K_v1.3$  com os 4 domínios formados. (C) Representação *ribbon* Visão superior do canal  $K_v1.3$  com íon potássio no centro. (D) Representação *surface* da visão superior do canal de  $K_v1.3$ . Pdb: 7ssx. Modelos visualizados com *software* ChimeraX.

O Domínio T1, ou domínio de tetramerização, se encontra na porção N-terminal, possuindo a função de regular a interação com outras subunidades, tanto alfas quanto auxiliares, e a estabilidade do canal iônico (Figura 5B) (Strang et al., 2001). As subunidades auxiliares ou não formadoras de poro são classificadas em transmembrâncias ou citosólicas, com participação nos processos de expressão, modificações pós-traducionais e regulação da atividade do canal (Abbott, 2022).

### **Canais de sódio dependentes de voltagem - Na<sub>v</sub>**

A subunidade alfa formadora de poro iônico dos canais de sódio dependentes de voltagem eucarióticos (Na<sub>v</sub>) se assemelham estruturalmente com os canais K<sub>v</sub> por serem constituídos de quatro domínios (D1-D4) e cada um dos domínios serem formados por seis alfa hélices (S1-S6). Entretanto, diferem inicialmente dos canais K<sub>v</sub> por serem constituídos por domínios contínuos em uma única longa cadeia proteica que apresenta 24 segmentos transmembrânicos (4 domínios x 6 segmentos por domínio)(Catterall et al., 2017). Todavia, canais de sódio dependentes de voltagem de procariotos (Na<sub>v</sub>Ab, NaChBac, Na<sub>v</sub>Rh, Na<sub>v</sub>Ms Na<sub>v</sub>Aep1, entre outros) são estruturados em 4 proteínas e estão associados em um homotetrâmero assim como os canais K<sub>v</sub> (Payandeh and Minor, 2015).

No modelo Hodgkin e Huxley de 1952, foi definido que o funcionamento do canal seria governado por um processo com partículas de *gating*  $m^3h^1$ , sendo o *gating* m relacionado à ativação do canal e o *gating* h com o cessamento da condutância com a inativação rápida do canal, que, atualmente, após diversos estudos estruturais, são entendidos como os sensores de voltagem (Catterall et al., 2012). Os quatro sensores de voltagem dos canais Na<sub>v</sub> possuem sensibilidades diferentes à voltagem e frente à despolarização da membrana e se movem em velocidades diferentes. Esse padrão é definido com modelo de movimento assíncrono dos sensores de voltagem (Goldschen-Ohm et al., 2013).

Os sensores dos domínios D1, D2 e D3 são os mais rápidos e suficientes para o processo de ativação do canal com abertura do poro iônico (Goldschen-Ohm et al., 2013), enquanto que o sensor do domínio 4 é o mais lento de todos e está, com a sua movimentação, associado ao deslocamento da alça intracelular D3-D4 que possui o motivo

IFM que, por sua vez, bloqueia o poro iônico do lado intracelular ao fim da movimentação do sensor D4, caracterizando o processo de inativação rápida (Capes et al., 2013), um mecanismo que é único destes canais (Clairfeuille et al., 2019).

O filtro de seletividade se encontra na região central do poro iônico, no P<sub>Loop</sub> entre as alfa hélices S5-S6 e os quatro resíduos são responsáveis por conferir a seletividade ao íon Na<sup>+</sup> em preferência ao íon K<sup>+</sup> (Ahern et al., 2016). Em procariotos, um campo de força conhecido como S<sub>HFS</sub>, do inglês *high field strength binding site*, formado pelas cargas negativas dos resíduos de ácido glutâmico (EEEE) são responsáveis pelo filtro de seletividade (Chakrabarti et al., 2013). Já nos canais de eucariotos, o filtro de seletividade ocorre devido à presença de quatro resíduos diferentes em cada domínio, conhecido como DEKA *locus*, ácido aspártico (D) do domínio um, ácido glutâmico (E) do domínio dois, lisina (K) do domínio três e alanina (A) no domínio quatro (Figura 7) (Ahern et al., 2016; Flood et al., 2018).

Na <sub>v</sub> 1.2 DI	FRLMTQDFWENLYQL-
Na <sub>v</sub> 1.2 DII	FRVLCGE-WIETMWD-
Na <sub>v</sub> 1.2 DIII	LQVATFKGWMDIMYA-
Na <sub>v</sub> 1.2 DIV	FQITTSAGWDGLLAP-
NaChBac	FQVVTLESWASGVMRP
NaVAb	FQVVTLESWASGIMRP

Figura 6 – Alinhamento das sequências do filtro de seletividade de eucariotos e procariotos. Os quatro domínios do Nav1.2 de *Homo sapiens*, NaChBac de *Bacillus halodurans* e Navab de *Aliarcobacter butzleri*.

### Canais de cálcio dependentes de voltagem - Ca<sub>v</sub>

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca<sub>v</sub>), assim como o nome já indica, possuem seletividade ao íon Ca<sup>2+</sup> em comparação aos outros íons presentes em mamíferos (Catterall, 2023). Os canais Ca<sub>v</sub> possuem uma maior identidade com os canais Na<sub>v</sub> em comparação com os K<sub>v</sub>, uma vez que os quatro domínios da subunidade alfa são expressos em apenas uma proteína contínua, assim como ocorre nos canais Na<sub>v</sub>, estruturado em 24 segmentos transmembrânicos, dividido em quatro domínios (Catterall, 2023).

A seletividade ao íon Ca<sup>2+</sup> é devida aos resíduos de ácido glutâmico (EEEE) e/ou de ácido glutâmico e ácido aspártico (EEDD)(Ellinor et al., 1995), conhecidos como posição 0, e que formam um anel de cargas no centro que coordenam a passagem do íon Ca<sup>2+</sup> (Yao et al., 2024).

São contabilizados 10 genes relativos à expressão da subunidade alfa (CACNA1-) e os canais expressos podem ser classificados tanto pelo tipo de corrente, probabilidade de abertura ou farmacologia (Ertel et al., 2000; Hille, 2001; Dolphin, 2006). Os canais da família  $Ca_v1$  possuem correntes do tipo L, tal classificação vem da condição possuírem correntes *Long Lasting*, ou duradouras, em comparação com as outras famílias, sendo os canais  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  e  $Ca_v1.4$  os integrantes desta família e sensíveis às dihidropirimidinas (Lipscombe et al., 2004).

Cada integrante da família dos  $Ca_v2$  possui diferentes tipos de correntes,  $Ca_v2.1$  possuem correntes classificadas como P/Q dependendo do *splicing* alternativo e tecido de expressão (Richards et al., 2007). O canal  $Ca_v2.2$  apresenta corrente do tipo N, associado com sua expressão em neurônios do sistema nervoso central e terminais pré-sinápticos (Jurkovicova-Tarabova and Lacinova, 2019). O canal  $Ca_v2.3$ , por sua vez, ganha a classificação como tipo R devido à sua resistência a inibidores comuns (Catterall, 2023), sendo que atualmente não existe composto totalmente seletivo, sendo o com maior seletividade a toxina de aranha SNX-482 (Newcomb et al., 1998).

Os canais da família 3 possuem correntes descritas como pequenas “*tiny*” ou transientes, por isso são classificadas como do tipo T, além de serem as únicas caracterizadas com a probabilidade de abertura *Low Voltage Activated* (LVA), ou seja, necessitam de uma pequena variação da voltagem de membrana para ativarem, sendo os demais canais *High Voltage Activated* (HVA)(Rossier, 2016; Weiss and Zamponi, 2024).

### **Canalopatias**

Canalopatias são doenças genéticas ou de fatores adquiridos provocadas pelo funcionamento incorreto de um canal iônico, causada por mutação em seus respectivos genes levando a mudança na sequência de aminoácidos da cadeia principal ou subunidades acessórias (Kim, 2014). Os canais iônicos estão presentes em quase todos os tecidos humanos, desde o tecido epitelial, até os tecidos de órgãos internos (Staruschenko et al., 2023) e o mal funcionamento destes pode provocar uma doença, um conjunto de desordens, ou até mesmo o mal desenvolvimento fetal (Kim, 2014).

Canais iônicos presentes em neurônios nociceptores, como os canais  $Na_v1.7$ ,  $Na_v1.8$  e  $Na_v1.9$  (McDougall and O'Brien, 2024), quando apresentam mutações que provocam ganho de função estão relacionados com patologias de dores crônicas e hipersensibilidade (Cregg et al., 2010), já mutações que provocam perda de função se relacionam com insensibilidade a estímulos e percepção de dor (Marchi et al., 2022).

A Epilepsia é uma doença caracterizada pela atividade anormal do cérebro, podendo ser focal ou generalizada, com excesso de impulsos nervosos excitatórios ou ausência de inibitórios que podem provocar o *status* epiléptico (Menezes et al., 2020). Diversos genes já foram relacionados com os diferentes espectros de epilepsia existentes. Dentre 70 genes relacionados em 8565 pacientes foram encontrados 14 genes para canais iônicos ou receptores (Lindy et al., 2018). Os canais  $Na_v$  são um alvo de mutações observadas na epilepsia, por estarem relacionados com principal íon iniciador de potenciais de ação, com 1528 mutações descritas para gene  $SCN1A$  ( $Na_v1.1$ ) e nos outros genes  $SCN2A$  ( $Na_v1.2$ ),  $SCN3A$  ( $Na_v1.3$ ),  $SCN8A$  ( $Na_v1.6$ ) e  $SCN9A$  ( $Na_v1.7$ ) contabilizando mais mutações (Menezes et al., 2020).

Além de doenças que envolvem diretamente o sistema nervoso central, outras canalopatias podem ser citadas. As que envolvem o sistema cardiovascular, como a síndrome de brugada e do QT-longo está relacionada aos genes  $SCN5A$  ( $Na_v1.5$ ),  $KCNQ1$  ( $K_v7.1$ ),  $hErg1$  (Frosio et al., 2023). No músculo esquelético, mutações nos genes  $SCN4A$  ( $Na_v1.4$ ),  $CACN1A$  ( $Ca_v1.1$ ),  $CLCN1$  (Canal de cloreto) e  $KCNJ2$  ( $Kir2.1$ ) podem causar miotonias não distróficas e paralisias periódicas (Vivekanandam et al., 2020).

Mutações nos genes  $KCNJ11$  ( $Kir6.2$ ) e  $ABCC8$  ( $SUR1$ ), responsáveis pela formação do canal  $K_{ATP}$  (Ashcroft, 2005), são fatores genéticos para doenças envolvendo o metabolismo pancreático como, por exemplo, hiperinsulinismo congênito da infância, diabetes neonatal e desenvolvimento de diabetes do tipo 2 (Remedi and Koster, 2010).

### **Moduladores e bloqueadores de canais iônicos dependentes de voltagem**

Compostos que interagem com canais iônicos possuem potencial farmacológico (Camerino et al., 2007) como analgésicos, anestésicos locais, anestésicos gerais, além de funcionarem como ótimas ferramentas moleculares para a investigação da função de canais

iônicos (Wisedchaisri and Gamal El-Din, 2022), como, por exemplo, a identificação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  dos canais  $\text{Na}_v$  realizada com auxílio de uma  $\alpha$ -NaTx do escorpião *Leiurus quinquestriatus* (Beneski and Catterall, 1980).

Existem dois mecanismos clássicos de interação com o canal iônico, sendo o primeiro caracterizado como bloqueio do poro iônico, ou seja, o composto interage diretamente com a região responsável pelo fluxo iônico e provoca a oclusão, cessando a condutância, como ocorre para Tetrodotoxin (Lipkind and Fozzard, 1994) e Lidocaína (Hille, 1977) nos canais  $\text{Na}_v$ , Tetraetilamônio (Lenaeus et al., 2005), 4-aminopiridina (Choquet and Korn, 1992) e  $\alpha$ -Ktx de escorpiões (Banerjee et al., 2013) em canais  $\text{K}_v$  e as Fenilalquilaminas e  $\omega$ -conotoxinas (Bourinet and Zamponi, 2017) em canais  $\text{Ca}_v$  (Tang et al., 2016).

O segundo mecanismo de interação é conhecido como modulação de *gating*, que se trata da interação com regiões próximas aos sensores de voltagem ou diretamente com a alfa hélice S4, alterando cinéticas de ativação, inativação e disponibilidade dos canais, como é descrito para  $\alpha$ -NaTx e  $\beta$ -NaTx de escorpião para os canais  $\text{Na}_v$  (Catterall et al., 2007),  $\omega$ -Agatoxins (McDonough, 2007) e Di-hidropiridinas (Tang et al., 2016) para os canais  $\text{Ca}_v$ .

# Capítulo 1 – $\kappa$ -KTx Ocy9 e Omtx2, fracas bloqueadoras ou moduladoras de *gating*?

## 1.1 - Introdução

### Escorpiões: Generalidades

Os escorpiões são artrópodes quelicerados integrantes da classe Aracnidea, subdivididos em 22 famílias e 2822 espécies catalogadas em 2024 (Rein, 2024b) considerados entre os animais mais antigos ainda existentes, cujo ancestral está datado em, aproximadamente, 450 milhões de anos atrás como um organismo aquático do período Siluriano (Jeyaprakash and Hoy, 2009; Gopalakrishnakone et al., 2015). O corpo é caracterizado pela presença de oito patas, segmentado em prossoma, com cefalotórax, e opistosoma, com mesossoma e metassoma. No prossoma, estão localizados os seguintes apêndices: quelíceras, pedipalpos e quatro pares de pernas. O opistosoma é dividido em mais duas partes, o mesossoma, referente ao tronco e o metassoma, que é conhecido como a cauda e possui ao seu final a presença de um télson, responsável pela inoculação da peçonha (Brazil and Porto, 2011).

Os diferentes gêneros de escorpiões apresentam diferenças morfológicas quanto ao tamanho do télson e das pinças, sendo essas diferenças relacionadas com a estratégia para captura de presas (Simone and van der Meijden, 2021; García et al., 2022); a injeção de peçonha com agulhão bem desenvolvido para perfurar tecidos e injetar toxinas especializadas (Zhu et al., 2020) ou o aprisionamento e esmagamento com grandes pinças (Van Der Meijden et al., 2010).

Em 2022, foram registrados no Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) 292.440 casos envolvendo acidentes com animais peçonhentos do Brasil, destes acidentes 62% dos casos, 183.738 registros foram com escorpiões, causando 92 óbitos (Ministério da Saúde, 2024). Em 10 anos de registros, foi observado um aumento de 149,3% nas notificações de acidentes envolvendo picadas de escorpião (Ministério da Saúde, 2022).

No Brasil, as principais espécies envolvidas em acidentes com importância médica estão na família *Buthidae*, com *Tityus serrulatus*, *Tityus stigmurus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus*

*obscurus* (Guerra-Duarte et al., 2023). Os principais alvos moleculares envolvidos com o processo de envenenamento com a peçonha desses escorpiões são os canais iônicos, principalmente os canais de sódio dependentes de voltagem (Wisedchaisri and Gamal El-Din, 2022; Mendes et al., 2023).

### **Gênero *Opisthacanthus***

A família Hormuridae (Monod and Prendini, 2015) possui representantes distribuídos em 11 gêneros, sendo que o gênero *Opisthacanthus* pode ser subdivido em 9 subgêneros: *cayaporum*, *lepturus*, *lecomtei*, *africanus*, *asper*, *laevipes*, *rugulosus*, *validus* e *madagascariensis* (Lourenço et al., 2018; Rein, 2024a). Entre as 34 espécies conhecidas atualmente, a primeira espécie descrita foi o *Opisthacanthus elatus*, encontrado nos territórios entre Colômbia e Panamá, e, posteriormente foram encontradas espécies com características morfológicas similares no continente africano (Lourenço et al., 2018).

Popock em 1893 propôs um novo gênero para os escorpiões com características de *Opisthacanthus* encontrados no continente africano, chamando-os de *Opisthocentrus* e manteria no gênero *Opisthacanthus* apenas as espécies encontradas nos continentes americanos (Pocock, 1893). Tal proposta foi recusada na época e foi aceito que o gênero *Opisthacanthus* teria sofrido um processo de segregação durante a movimentação das placas tectônicas que formavam o supercontinente *Gondwana* e, por este motivo, podem ser encontrados na África, Madagascar, América do Sul, América Central e Caribe (Pocock, 1893; Lourenço et al., 2018).

### **Componentes da peçonha de escorpião**

Na peçonha de escorpiões podem ser encontrados componentes moleculares como peptídeos, proteínas, amins biogênicas, lipídios e sais. Entre esses componentes, os peptídeos são os grandes responsáveis pelos efeitos de intoxicação após uma picada (Ortiz et al., 2015).

## Os peptídeos da peçonha de escorpiões

Os peptídeos da peçonha de escorpiões podem ser classificados em duas principais categorias: aqueles sem a presença de pontes dissulfetos (NDBPs) e peptídeos com pontes dissulfeto (DBP)(Ortiz et al., 2015; Xia et al., 2023).

Os NDBPs representam, aproximadamente, um terço dos peptídeos totais existentes na peçonha, possuem entre 13 e 56 resíduos de aminoácidos e a maioria deles é catiônica (Ortiz et al., 2015). Os NDBPs possuem a estrutura em *random coil* em meio aquoso, mas se reestruturam rapidamente em alfa hélices anfipáticas ao entrarem em contato com membranas celulares e ao interagir com estas podem promover a formação de poros, propiciando atividade citolítica (Figura 7A) (Zeng et al., 2005; Almaaytah and Albalas, 2014). A presença de peptídeos antimicrobianos na peçonha de escorpiões é compreendida como uma forma de resposta imune inata dos escorpiões contra possíveis patógenos, uma vez que o orifício do télson está constantemente exposta ao ambiente e vulnerável às infecções por microrganismos (Baltutis et al., 2022).

Os DBPs são compostos de 13 a 70 resíduos de aminoácidos, com a formação de duas a quatro pontes dissulfeto, que conferem aos peptídeos a capacidade de serem altamente compactados e com resistência à temperatura e pH (Ortiz et al., 2015; Xia et al., 2023). A presença das pontes dissulfeto é essencial para a existência das estruturas compactadas, como as alfa hélices e folha beta estabilizadas por cistina (CS $\alpha\beta$ ) que é encontrado em toxinas ativas em canais de sódio e de potássio (Figura 7B, C) (Xia et al., 2023).

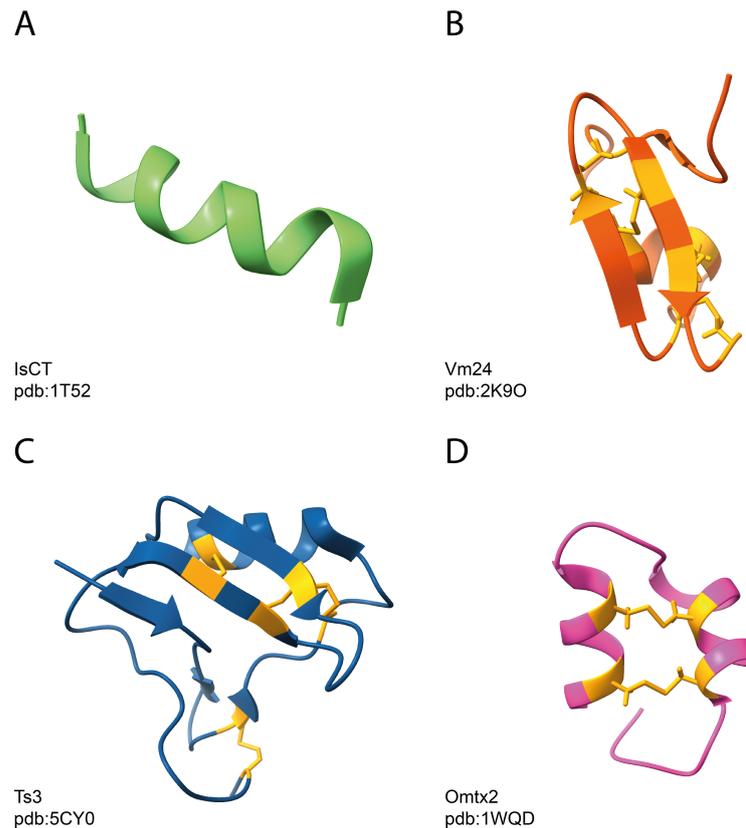


Figura 7 - Estruturas de toxinas peptídicas de escorpião. (A) Toxina NDBP IsCT de *Opisthacanthus madagascariensis*. (B)  $\alpha$ -KTx Vm24 de *Vaejovis mexicanus*. (C) Ts3  $\alpha$ -NaScTx de *Tityus serrulatus*. (D)  $\kappa$ -KTx Omtx2 de *Opisthacanthus madagascariensis*. Figuras geradas com *software* ChimeraX – Universidade da Califórnia. Resíduo cisteína e pontes dissulfeto coloridos em amarelo.

### Toxinas ativas em canais de potássio dependente de voltagem

O banco de dados público Kalium, especializado em ligantes para os canais de potássio, apresenta 1599 agonistas descritos, desses 212 são toxinas de escorpião com atividade eletrofisiológica descrita ou alta identidade com toxinas identificadas (Krylov et al., 2023).

As toxinas de escorpião ativas em canais de potássio são denominadas KTxs, apresentam entre 23-64 resíduos de aminoácidos e suas estruturas são estabilizadas por 2-4 cistinas (Rodríguez De La Vega et al., 2003; Quintero-Hernández et al., 2013; Xia et al., 2023). São descritos 4 motivos estruturais para as KTxs com os padrões de cistinas bem definidos, sendo CS $\alpha$ / $\beta$ , CS $\alpha$ / $\alpha$ , Kunitz e ICK (Kuzmenkov et al., 2015).

O motivo estrutural alfa hélices e folha beta estabilizado por cistina ( $CS\alpha\beta$ ) é o predominante entre as toxinas (Figura 7B, C), sendo presente nas famílias:  $\alpha$ -KTx,  $\beta$ -KTx e  $\gamma$ -KTx, com um padrão de cistinas [C1-C5, C2-C4, C3-C6] (Tytgat et al., 1999).

O motivo estrutural duas alfas hélices paralelas estabilizado por duas cistina  $CS\alpha/\alpha$  apresenta a distribuição de cistinas C1-C4 e C2-C3, sendo que, na sequência primária, o espaçamento entre a cisteína C1 e C2 é de 4 aminoácidos e o espaçamento entre a C3 e C4 também é de quatro aminoácidos, sendo as  $\kappa$ -KTx a única família com esse padrão (Figura 7D) (Quintero-Hernández et al., 2013; Kuzmenkov et al., 2015).

O motivo Kunitz é conservado em toxinas com atividade de inibidores enzimáticos, sendo uma atividade comum nas toxinas  $\delta$ -KTx que apresentam esse motivo. A estrutura dessas toxinas apresenta duas folhas betas antiparalelas e uma ou mais regiões de alfa hélices, com a presença de seis ou oito cisteínas que se ligam em padrões [C1-C5, C2-C3, C4-C6] ou [C1-C7, C2-C4, C3-C5, C6-C8] (Kuzmenkov et al., 2015).

As toxinas  $\lambda$ -KTxs apresentam o motivo estrutural ICK *inhibitor cistine knot* (Gao et al., 2013), normalmente encontrado em toxinas de aranhas (Cardoso and Lewis, 2019), possuindo uma folha beta estabilizada por três cistinas, que também é encontrado em KTx, com a formação de um anel de cistinas com as [C1-C4 e C2-C5] com a terceira cistina [C3-C6] sendo formada entre esse anel (Kuzmenkov et al., 2015).

A família  $\epsilon$ -KTx foi a última a ser descrita, com apenas duas toxinas participantes desta família (Ts11 e Ts12) e apresentam o padrão de cistina ICK, entretanto são encontradas 4 cistinas diferentes das  $\lambda$ -KTxs e os elementos estruturais secundários não são bem definidos (Cremonez et al., 2016).

### **A família das toxinas $\kappa$ -KTx**

Existem 5 subfamílias de  $\kappa$ -KTxs que foram definidas pela análise de suas sequências de aminoácidos, cujo alinhamento múltiplo gera consensos de sequência primária, devido ao padrão de alinhamento conservado das cisteínas e resíduos considerados chaves (Figura 8) (Vandendriessche et al., 2012). A subfamília 1, representada pelas toxinas hefutoxins 1, hefutoxins 2 e hefutoxins 3 (Srinivasan et al., 2002), foi definida pelo padrão de assinatura

dos resíduos GXN<sub>p</sub>CA<sub>r</sub>RP<sub>o</sub>CWB<sub>a</sub>XGXDA<sub>c</sub>XTCKXXC, sendo que N<sub>p</sub> corresponde a Não polar, A<sub>r</sub> a aromático, P<sub>o</sub> a Polar, B<sub>a</sub> a Básico e A<sub>c</sub> a ácido (Figura 8) (Vandendriessche et al., 2012).

A subfamília 2, com as toxinas de *Opisthacanthus madagascariensis* Omtx1, Omtx2, Omtx3, Omtx4 (Chagot et al., 2005), as toxinas de *Opisthacanthus cayaporum* Ocyc8 e Ocyc9 (Silva et al., 2009), a toxina de *Pandinus imperator* Pi6 (Olamendi-Portugal et al., 2017) e as toxinas de *Heterometrus petersii* HSP053.1, HSP053.2 apresentam o padrão de assinatura XXN<sub>p</sub>CXXN<sub>p</sub>CN<sub>p</sub>XXXN<sub>p</sub>NN<sub>p</sub>XXCA<sub>c</sub>XN<sub>p</sub>CX (Figura 8) (Vandendriessche et al., 2012).

A subfamília 3, com as toxinas de *Heterometrus petersii* HSP040C.1, HSP040C.3, HSP040C.4 e HSP040C.5, tem como assinatura proposta XWINA<sub>c</sub>FNN<sub>p</sub>CMKISSDXKYCKXXCG (Figura 9) (Vandendriessche et al., 2012).

Na peçonha dos escorpiões *Heterometrus petersii* e *Heterometrus laoticus* foram caracterizadas duas toxinas com sequências de baixa identidade com as demais κ-KTx, devido a isso foram propostas duas novas famílias, sendo cada uma delas a representante única desta família. A família κ-KTx 4 com a toxina HSP040C.2 de *Heterometrus petersii* e a família κ-KTx 5 com a toxina de *Heterometrus laoticus* HelaTx1 (Figura 8) (Vandendriessche et al., 2012).

<b>Família κ-KTx 1</b>		
Hefu3(1.3)	GFGCYRSCWKAGHDEETCKKECS	23
Hefu1(1.1)	GHACYRNCWREGNDEETCKERC-	22
Hefu2(1.2)	GHACYRNCWREGNDEETCKERCG	23
Padrão	<b>GX<sub>N<sub>p</sub></sub>CA<sub>r</sub>RP<sub>o</sub>CW<sub>B<sub>a</sub></sub>XGXD<sub>A<sub>c</sub></sub>XTCKXXC</b> * . . *** . ** : * :***** : . *	
<b>Família κ-KTx 2</b>		
Ocyc8(2.5)	YDACVNACLEHHPNVRECEEACKNPVPP	28
Pi6(2.9)	VDACYEACMHHHMNSDDCIEACKNPVPP	28
HeTx203(2.7)	GNACIEVCLQHTGNPAECDKACD-----	23
HeTx204(2.8)	GNACIEVCLQHTGNPAECDKPCDK----	24
Ocyc9(2.6)	FPPCVEVCVQHTGNVKECEAACG-----	23
Omtx1(2.1)	-DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHPVE-	26
Omtx2(2.2)	-DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHPVEY	27
Omtx4(2.4)	-DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHP---	24
Omtx3(2.3)	NDPCEEVCLQHTGNVKACEEACQ-----	23
Padrão	<b>XX<sub>N<sub>p</sub></sub>CXX<sub>N<sub>p</sub></sub>C<sub>N<sub>p</sub></sub>XXX<sub>N<sub>p</sub></sub>N<sub>N<sub>p</sub></sub>XXC<sub>A<sub>c</sub></sub>X<sub>N<sub>p</sub></sub>CX</b> * : . * : . : * * * * *	
<b>Família κ-KTx 3</b>		
HSP040C.1(3.1)	QWINACFNVCMKISSDKKYCKYLCGKN	27
HSP040C.5(3.4)	QWINACFNVCMKISSDKKYCKYLCGKS	27
HSP040C.3(3.2)	HWINACFNICMKISSDQKYCKSFSG--	25
HSP040C.4(3.3)	HWINACFNICMKISSDQKYCKSFSG--	25
Padrão	<b>XWINACFN<sub>N<sub>p</sub></sub>CMKISSDXKYCKXXCG</b> :*****:*****:*****:***	
<b>Família κ-KTx 4</b>		
HSP040C.2(4.1)	DIPCFETCMKLYHIPKLCYIKCRKH	25
<b>Família κ-KTx 5</b>		
He1aTx1	SCKKECSGSRRTKKCMQKCNREHGH	25
<u>N<sub>p</sub></u> : Não polar	<u>B<sub>a</sub></u> : Básico	
<u>A<sub>c</sub></u> : Ácido	<u>A<sub>r</sub></u> : Aromático	
<u>P<sub>o</sub></u> : Polar	X: Qualquer resíduo	

Figura 8 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das toxinas das famílias de κ- KTx. Alinhamento das 5 famílias de κ-KTx e assinatura padrão em vermelho para as famílias com esta classificação.

Importante mencionar as toxinas Tt28 e Ts16 que, segundo suas sequências primárias, são descritas como α-KTx da família 20. Entretanto, os membros da família α-KTx apresentam o enovelamento Csaβ e foi demonstrado que a toxina Tt28 apresenta o enovelamento Csa/α característico de κ-KTx, contudo apresenta três cistinas (Saucedo et al.,

2012). Atualmente, não existe uma classificação exata para essas duas toxinas e, provavelmente, uma nova família será descrita com o surgimento de novos integrantes. Com intuito de evitar confusões, é importante notar que a toxina Tt28 foi classificada como  $\kappa$ -BUTX-Tt2b, seguindo outro padrão de nomenclatura que utiliza o alvo molecular como método de classificação (King et al., 2008), aonde  $\kappa$  se refere às toxinas que inibem canais  $K_v$ , sem correlação com a estrutura ou a sequência (Saucedo et al., 2012).

### ***Opisthacanthus cayaporum***

No Brasil, são encontradas apenas duas espécies de *Opisthacanthus*, dentre essas o *Opisthacanthus cayaporum* é encontrado na região de Tocantins, Amazonas e Pará (Brazil and Porto, 2011). O primeiro trabalho com a peçonha foi realizado em 2008, com o fracionamento da peçonha por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) resultando em 80 frações, nas quais foram identificados 221 componentes com massas moleculares entre 229.2 e 61.144,0 Da e 17 peptídeos foram sequenciados (Schwartz et al., 2008). Ensaio de *sucrose gap* utilizando cordão nervoso ventral de barata e nervo ciático de rato demonstraram que 3,54 mg/mL de peçonha bruta reduziram a amplitude do potencial de ação de maneira dose dependente nos nervos de barata, mas foram sem efeito sobre o potencial de ação registrado no nervo ciático de ratos (Schwartz et al., 2008).

Em 2009, foi construída uma biblioteca de cDNA a partir da glândula de peçonha de *Opisthacanthus cayaporum*, tendo sido obtidas sequências precursoras para 61 diferentes produtos celulares, com características de toxinas peptídicas e proteínas celulares (Silva et al., 2009). Entre as sequências encontradas, foram descritos dois peptídeos da classe NDBPs, OcyC1 e OcyC2, toxinas peptídicas que possuem similaridade com toxinas  $\kappa$ -KTx, sendo estas intituladas OcyC8 e OcyC9 e uma toxina com identidade com  $\alpha$ -KTx da família 6, intitulada OcyC12 ( $\alpha$ -KTx 6.16).

A toxina OcyC8 ( $\kappa$ -KTx 2.5) a 16  $\mu$ M foi capaz de reduzir a amplitude dos canais  $hK_v1.1$  e  $hK_v1.4$  com  $IC_{50}$  de  $217 \pm 46$   $\mu$ M e  $71 \pm 8,9$   $\mu$ M, respectivamente, além da capacidade de atrasar a cinética de ativação dos canais  $hK_v1.1$  (Camargos et al., 2011).

A toxina OcyKTx2 ( $\alpha$ -KTx 6.17) foi capaz de inibir de forma reversível a corrente do canal de potássio Shaker-B de *Drosophila melanogaster* e hK<sub>v</sub>1.3 com K<sub>d</sub> de 93,5 nM para Shaker B e K<sub>d</sub> de 18,0 nM para hK<sub>v</sub>1.3 (Schwartz et al., 2013).

### ***Opisthacanthus madagascariensis***

O escorpião *Opisthacanthus madagascariensis* é encontrado na ilha de Madagascar, em regiões semiáridas e secas (Lourenço et al., 2018). O primeiro trabalho com a peçonha do escorpião foi realizada em 2001, com a caracterização de uma peptídeo antimicrobiano (AMP), de cadeia linear, denominado IsCT, capaz de atuar contra bactéria Gram positivas e Gram negativas, além de apresentar atividade hemolítica (Dai et al., 2001). O mesmo grupo caracterizou outros três peptídeos lineares e os denominaram de IsCT2, IsCTf e IsCT2f, peptídeos que apresentaram atividade antimicrobiana. Foi proposto que os peptídeos IsCTf e IsCT2f são fragmentos de digestão enzimática dos peptídeos IsCT e IsCT2 que pode ocorrer naturalmente dentro da peçonha (Dai et al., 2002). Posteriormente, foram realizados diversos trabalhos com análogos de IsCT para compreensão dos resíduos essenciais para o efeito citolítico (Lee et al., 2004; Lim et al., 2005, 2006; Acevedo et al., 2019).

IsTx é uma toxina que foi isolada apenas da peçonha de indivíduos machos, com 41 resíduos de amino ácidos e que foi classificada com uma  $\alpha$ -KTx6 devido à sua estrutura de C $\alpha$ / $\beta$  descrita por ressonância nuclear magnética (Yamaji et al., 2004).

Utilizando a técnica de NMR, outros quatro peptídeos foram identificados na peçonha de *Opisthacanthus madagascariensis*, sendo esses os peptídeos Omtx1, Omtx2, Omtx3 e Omtx4, todos esses peptídeos contendo 2 pontes dissulfeto e estrutura de C $\alpha$ / $\alpha$  (Chagot et al., 2005). Foi observado com as toxinas Omtx1, Omtx2 e Omtx3, na concentração de 500  $\mu$ M, promoveram inibição parcial dos canais K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.2 e K<sub>v</sub>1.3, efeito esperado em altas concentrações para  $\kappa$ -KTxs (Chagot et al., 2005). Nesse mesmo trabalho, foi mencionado pelos autores que a toxina Omtx2 foi capaz de alterar a liberação de insulina dependente de glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos, embora esse resultado não tenha sido mostrado (Chagot et al., 2005).

A toxina Omtx3 foi avaliada quanto à atividade anticoagulante, não tendo apresentado efeito (Ding et al., 2018).

### **Estudos prévios com Ocyc9 e Omtx2.**

A observação de Chagot et al., 2005, sobre a capacidade de alterar a liberação de insulina, inspirou o trabalho de doutorado da pesquisadora Beatriz Sarmiento, com o estudo das toxinas Omtx2, Ocyc9 e o análogo Ocyc9Mod, que apresenta as substituições Val5Tyr e Gly23Lys para a formação da díade funcional (Sarmiento, 2019). Tais toxinas foram avaliadas sobre a atividade dos canais iônicos envolvidos no processo de liberação de insulina de células beta pancreáticas ( $K_v2.1$ , BK (KCa1.1), KATP (KIR6.2 / SUR 1),  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3s$  e  $Ca_v2.3$ ). Foi observado um potencial efeito das toxinas Omtx2 e Ocyc9 no canal  $Ca_v2.3$  na concentração de 300 nM (Sarmiento, 2019).

### **Mecanismo de secreção de insulina por células beta pancreáticas - dependência do metabolismo oxidativo e do potencial de membrana**

As ilhotas de Langherans são compostas por cinco tipos celulares, as células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e PP, cada uma responsável pela secreção de um hormônio diferente, sendo que as células  $\alpha$  e  $\beta$  são as majoritárias (60-90%) nas ilhotas (Da Silva Xavier, 2018; Gil-Rivera et al., 2021).

A insulina é um hormônio peptídico de 51 resíduos de aminoácidos, expresso como preproinsulina e, após modificações pós-traducionais no lúmen do retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (Vakilian et al., 2019), é armazenada em vesículas secretoras com alta concentração do íon  $Zn^{2+}$ , que é essencial para a biossíntese de insulina (Bosco et al., 2014). Como mostrado na Figura 9, seis cadeias de insulina e dois íons zínco se associam para a formação de um cristal (Poudel et al., 2017).

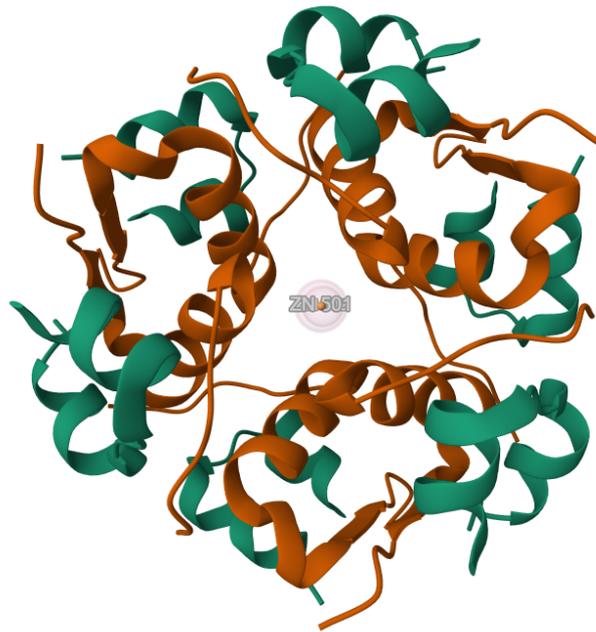


Figura 9 - Estrutura do cristal do hexâmero de insulina aprisionando o íon  $Zn^{2+}$  estabilizando a estrutura. PDB ID: 1MSO.

A secreção de insulina frente ao aumento dos níveis de glicose no sangue é um processo que associa metabolismo oxidativo da glicose com variação no potencial de membrana (Henquin and Meissner, 1984). As células  $\beta$ -pancreáticas são responsáveis por detectar o nível de glicose no sangue, associar o metabolismo rápido da glicose e sinalizar, via secreção do hormônio insulina, para que os outros tecidos do corpo captem glicose (Vakilian et al., 2019).

Em baixas concentrações de glicose no sangue, a produção de ATP pelas mitocôndrias é mínima, conseqüentemente a concentração intracelular de ATP é baixa, sendo insuficiente para induzir o bloqueio do fluxo de potássio sensível a ATP pelos canais  $K_{ATP}$  (Kir6.2 Sur1) (Ashcroft, 2005). A ausência de bloqueio por ATP mantém o poro iônico aberto, que permite o efluxo contínuo de  $K^+$  e propicia o estabelecimento do potencial de repouso, próximo ao potencial de reversão do íon  $K^+$  (Ashcroft et al., 1984).

O aumento da glicemia plasmática inicia o processo da glicólise, seguido do aumento de ATP intracelular, que, por sua vez, induz o fechamento dos canais  $K_{ATP}$  (Ashcroft et al., 1984), aumentando a resistência de membrana, promovendo/facilitando a despolarização da membrana com ativação de diferentes canais iônicos, até a final ativação de canais de

cálcio dependentes de voltagem que permite o aumento de cálcio intracelular e a liberação dos grânulos de insulina (Rorsman and Ashcroft, 2018).

Durante a secreção de insulina, as células  $\beta$  apresentam dois padrões elétricos associados aos eventos intracelulares (Rorsman and Ashcroft, 2018). No primeiro padrão, são detectados conjuntos de disparos de potencial de ação com duração de 20-60 segundos, que são guiados predominantemente pelos canais de  $Ca_v$  e, conseqüentemente, ocorre o aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular (Rorsman and Ashcroft, 2018; Gil-Rivera et al., 2021).

Devido ao aumento de cálcio intracelular, os canais  $Ca_v$  são inibidos pelos mecanismos de inibição dependente de cálcio (CDI)(Lee et al., 2000; Sang et al., 2021), o que provoca a redução temporária da atividade e cessamento do padrão de disparos, seguido da repolarização da membrana celular (Santos et al., 1991). Após a repolarização, inicia-se o segundo padrão elétrico, com variação de voltagem entre estados de repouso e o platô do limiar de disparos antes de retornar ao primeiro padrão (Rorsman and Ashcroft, 2018). Esse segundo padrão é essencial para a redução de cálcio intracelular e a recuperação CDI dos canais  $Ca_v$ , possibilitando subseqüentes despolarizações (Gil-Rivera et al., 2021).

Humanos e camundongos apresentam diferentes conjuntos de canais iônicos que associam o início da despolarização da membrana até o influxo de  $Ca^{2+}$  para ativar a maquinaria de liberação da secreção (Braun et al., 2008). Em humanos, o início da despolarização e a fase ascendente do potencial de ação ocorrem com a colaboração adicional do canal  $Ca_v3.2$ , que possui um limiar de ativação mais negativo que os demais canais presentes incluindo os canais de sódio dependentes de voltagem  $Na_v1.6$  e  $Na_v1.7$ , além da participação dos canais  $Ca_v2.1$  (Braun et al., 2008).

## 1.2 - Justificativa

As  $\kappa$ -KTx, definidas pelo padrão estrutural  $CS\alpha/\alpha$ , são pertencentes a uma das famílias de toxinas com um dos menores número de representantes descobertos. Descritas como toxinas de baixa potência comparando às demais toxinas que tem atividade na escala de nanomolar, necessitando de concentrações acima de 10  $\mu$ M para desempenhar atividades em canais de potássio dependentes de voltagem. A necessidade de altas concentrações para apresentar atividade pode ser um indício que os canais de potássio dependentes de voltagem não são os alvos moleculares principais das toxinas com motivo estrutural  $CS\alpha/\alpha$ .

A toxina de motivo estrutural  $CS\alpha/\alpha$ , OmTx2, foi indicada como capaz de alterar a secreção de insulina em ilhotas isoladas (Chagot et al., 2005), posteriormente outro trabalho descreveu que as toxinas Ocyc9 e Omtx2 inibem os canais  $Ca_v2.3e$  (Sarmiento, 2019), um canal conhecido como resistente a diversos inibidores clássicos.

A descrição da atividade de toxinas  $CS\alpha/\alpha$  no canal  $Ca_v2.3e$  e associação com o mecanismo de secreção de insulina em células beta pancreáticas influencia em diversos aspectos: trata-se da descrição da atividade no canal  $Ca_v2.3e$ , que não possui um bloqueador específico; Aplicação farmacológica para tratamento de doenças neurológicas (Benkert et al., 2019) e metabólicas associadas a excesso de secreção de insulina (Marini et al., 2024); Caracterização de diferentes alvos moleculares associados com toxinas que apresentam o motivo estrutural  $CS\alpha/\alpha$ .

## 1.3 – Objetivos do capítulo 1

- Avaliação da atividade das toxinas Ocyc9 e Omtx2 no canal  $Ca_v2.3$ .
- Busca dos canais iônicos envolvidos na modulação da secreção de insulina dependente de glicose por  $\kappa$ -KTx.
- Investigação da interação das  $\kappa$ -KTx em alta concentração em canais de potássio dependentes de voltagem.

## **1.4 - Metodologia capítulo 1**

### **1.4.1 - Origem das toxinas Ocyc9 e Omtx2**

As toxinas Ocyc9 e Omtx2 foram sintetizadas comercialmente, solicitados 10 mg do peptídeo Ocyc9 e 10,5 mg do peptídeo Omtx2, ambos com grau de pureza 95% garantido por cromatografia líquida de alta eficiência e conferido posteriormente com análises na Universidade de Brasília, por meio de técnicas de cromatografia e espectrometria de massas.

A Toxina Ocyc9-Nativa foi obtida por meio da purificação da peçonha bruta extraída de espécimes de *Opisthacanthus cayaporum* coletados em Tocantins e mantidos em cativeiro no biotério da Universidade de Brasília sob licença do IBAMA nº 048/2007-CGFAU. Foram obtidos 48,49 µg de Ocyc9-Nativa.

### **1.4.2 - Cromatografia dos peptídeos sintéticos Ocyc9 e Omtx2**

As amostras obtidas comercialmente foram analisadas no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência LC10A Shimadzu (Kyoto, Japão) para conferência do grau de pureza. A fase estacionária escolhida foi a coluna analítica C18 Core-Shell Phenomenex (Califórnia, EUA) com as especificações 250 x 4,60 mm, 4 microns. Para eluição, utilizou-se gradiente binário de solução aquosa de TFA 0,12% (A) e de solução de acetonitrila de TFA 0,1 % (B), com fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 216 nm de absorbância. O gradiente iniciou-se com 0% de b seguido do gradiente de 0 a 60 % de B em 60 minutos. As frações foram coletadas manualmente, secas a vácuo e armazenadas a -20°C até posterior análise.

### **1.4.3 - Cromatografia da fração de peçonha bruta contendo o peptídeo Ocyc9**

A fração cromatográfica da peçonha bruta contendo o peptídeo Ocyc9 foi obtida de trabalhos prévios (Sarmiento, 2019), seca a vácuo e armazenada a -20°C. A fração foi submetida a etapas adicionais de cromatografia, sendo o gradiente de 0-10% de solução B até 10 minutos, seguido de um gradiente de 10-30% de solução B entre 15 e 50 minutos da cromatografia (Figura 13).

#### **1.4.4 - Espectrometria de massas - MALDI TOF**

Os peptídeos foram submetidos à técnica de espectrometria de massas MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*), com um detector do tipo TOF (*Time of flight*), no equipamento MALDI TOF/TOF Ultraflex III (Bruker Daltonic, Alemanha). Os peptídeos foram solubilizados em água ultrapura e dissolvidos em matriz saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (acetonitrila/água/3% TFA; 5:4:1) na proporção de 2  $\mu$ L de amostra para 2  $\mu$ L de matriz. Análises foram realizadas no modo linear a fim de analisar a pureza dos compostos observando as massas médias detectadas entre 1-20 kDa refletido para avaliar as massas mono isotópicas usando o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). A massa teórica foi calculada usando o *software* Compass Isotope Pattern (Bruker Daltonics, Alemanha).

#### **1.4.5 - Quantificação de proteína – Método colorimétrico do Ácido Bicinonínico (BCA)**

O kit comercial BCA Protein Assay Kit<sup>®</sup> (ThermoFisher, EUA) foi utilizado para a quantificação dos peptídeos purificados com o método “Enhanced” descrito pelo fabricante, para a detecção de concentrações entre 5 e 250  $\mu$ g/mL. A absorbância foi analisada a 562 nm em um leitor de placa FlexStation 3 (Molecular Devices, EUA) e comparada com a curva-padrão obtida simultaneamente com os padrões de calibração fornecidos pelo fabricante contendo albumina bovina.

#### **1.4.6 - Cultura de células de mamífero**

Células HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293 cells transfected with SV40 origin of replication*) foram cultivadas em meio DMEM *High Glucose* (Sigma-Aldrich; D7777), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e com adição de 1% da solução de antibióticos Penicillin-Streptomycin 10,000 U/mL (Gibco) e pH de 7.4.

Células HEK (Human Embryonic Kidney 293 cells) com expressão estável dos canais  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.4$ ,  $Na_v1.5$  e  $Na_v1.6$  foram cultivadas em meio DMEM *High Glucose* (Sigma-Aldrich; D7777), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de solução MEM (*Non Essential Aminoacids*) e antibiótico de seleção G418 na concentração de 0.4 mg/mL.

Células CHO (*Chinese hamster ovary cells*) com expressão estável do canal Na<sub>v</sub>1.7 foi cultivada em meio DMEM *High Glucose* (Sigma-Aldrich; D7777), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e antibiótico de seleção G418 na concentração de 0.5 mg/mL.

Todas as células foram cultivadas em placas de petri de 6 cm de diâmetro, a 37<sup>o</sup> C, em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O processo de manutenção das células, repicagem, foi realizado em intervalos de 2 a 3 dias, utilizando tripsina como agente desagregador.

#### **1.4.7 - Transfecção transiente das células com DNAs plasmídeos.**

Células HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) foram transfectadas com os plasmídeos para a montagem do canal de cálcio dependente de voltagem (~1 µg de DNA por subunidade) junto com plasmídeo para proteína verde fluorescente (GFP) (~0,1 µg de DNA). Para a transfecção foi utilizado o reagente Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), em meio Opti-MEM<sup>®</sup> (Gibco).

Em um tubo de 1.5mL foram adicionados 30 µL de Opti-MEM, os plasmídeos de interesse e 2 µL do reagente p3000 pertencente ao *kit* e em um segundo tubo de 1,5mL contendo 30 µL de Opti-MEM foram adicionados 1 µL de Lipofectamina 3000. O material do primeiro tubo de 1,5mL contendo o reagente p3000 foi adicionado por gotejamento ao tubo de 1,5 mL que possui Opti-MEM e Lipofectamina. O material foi incubado por 15 minutos em temperatura ambiente e posteriormente foi adicionado ao cultivo celular em placa de petri ∅ 3 cm de HEK293T em meio Opti-MEM. As correntes foram medidas 1 a 2 dias após a transfecção.

Foram utilizados os seguintes pares de insertos e plasmídeos: plasmídeos Cav2.3<sub>e</sub> em no vetor pcDNA3, Cacnb2a no vetor pMT2, Cacna2d1 no vetor pcDNA3.1/Hygro e pECFP-C1 (Clontech).

#### **1.4.8 - Patch Clamp em configuração Whole Cell**

As correntes de cálcio (I<sub>Ca</sub>) foram registradas com a técnica de *Patch Clamp* na configuração *Whole Cell* com um amplificador HEKA EPC 10 e controlado via *software* PatchMaster (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Alemanha).

Experimentos foram realizados a temperatura ambiente (21 a 25° C). Pipetas de vidro borossilicato foram fabricadas imediatamente antes do uso com um *Puller* horizontal (Sutter Instruments, USA) e após o preenchimento com a solução interna foram detectadas resistências de pipeta entre 1,5 e 2,5 MΩ.

Para o registro das correntes do canal Ca<sub>v</sub>2.3e, as micropipetas foram preenchidas com solução interna contendo (mM): 135 CsCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 4 Na<sub>2</sub>-ATP, 10 HEPES, 10 EGTA, pH 7,4 corrigido com CsOH. As células foram banhadas em uma solução externa contendo (mM) 170 Colina-Cl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES (pH 7,4 CsOH). As correntes foram ativadas com um protocolo I/V de -50 mV até 30 mV com duração de 200 ms e, após ativação, o canal foi estimulado com a voltagem que promoveu correntes com maiores amplitudes (V<sub>Max</sub>) durante 200 ms e com repetições a cada cinco segundos.

Para o registro das correntes dos canais Na<sub>v</sub>, as micropipetas foram preenchidas com solução interna contendo (mM) 105 CsF, 27 CsCl, 5 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES (pH ajustado para 7,3 com CsOH). As células foram banhadas em uma solução externa contendo (mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Glicose (pH 7,4). As correntes foram ativadas com um protocolo *double-step* com a primeira parte do protocolo contendo um pulso de voltagem de duração de 30 ms com variação de voltagem em turnos de -100 até 30 mV, com acréscimo de 5 mV por *sweep* (Turnos), seguido imediatamente de uma segunda parte do protocolo com estímulo único de -10 mV por 10 ms.

#### **1.4.9 Análise do registro eletrofisiológico – Correntes dos Canais Ca<sub>v</sub>**

Devido à condição imposta durante a técnica *Patch Clamp Whole Cell* de dissolução do citosol com a solução de pipeta, ocorre a redução na disponibilidade de fatores intracelulares que modulam os canais de cálcio dependentes de voltagem promovendo uma redução na amplitude de corrente. Para contornar essa condição, são acrescentados componentes na solução de pipeta como EGTA e ATP dissódico, além de realizar uma análise da tendência linear na redução de correntes, o *Rundown*.

É necessário calcular o valor previsto da corrente de controle (I<sub>Pred</sub>) correspondente ao valor atual na presença da toxina, assumindo a tendência linear na ausência da toxina. Para esse cálculo se leva em consideração o número de *sweeps* decorridos desde a aplicação

do a toxina, calculada pela equação:  $I_{Pred} = (I_{Lavagem} - I_{Controle}) / [(\#SW_{Lavagem} - \#SW_{Control}) (\#SW_{Toxina} - \#SW_{Control}) + I_{Controle}]$ , onde  $I_{Controle}$  é a amplitude atual da última varredura antes da aplicação de toxina,  $I_{Toxina}$  é a amplitude da corrente avaliada na presença da toxina,  $I_{Washout}$  é a amplitude da corrente da última varredura da eliminação da toxina,  $I_{Pred}$  é a amplitude da corrente de controle assumindo comportamento linear *Rundown*,  $\#SW_{Control}$  é o número da varredura em que o  $I_{Control}$  foi medido,  $\#SW_{Toxina}$  é o número da varredura em que a  $I_{Toxin}$  foi medida e  $\#SW_{Washout}$  é o número da varredura em que o  $I_{washout}$  foi medido. A porcentagem de inibição foi calculada da seguinte forma:  $Inibição = (I_{Toxina} \times 100) / I_{Pred} - 100$ . Todos os dados foram analisados utilizando os *softwares* Fitmaster 2x90.5 (HEKA Eletronik) e Origin 8 (OriginLab).

#### 1.4.10 – Isolamento de ovócitos de *Xenopus laevis*

A cirurgia de ovariectomia parcial foi realizado em espécimes fêmeas de *Xenopus laevis* com intuito de isolar ovócitos em estágios 4 e 5. Os espécimes foram anestesiados por imersão por 15 minutos em água do aquário de manutenção contendo triclaína metanosulfonato na concentração de 1g/L e bicarbonato de sódio (pH 7,5), em metodologia previamente estabelecida (Liman et al., 1992; Peigneur et al., 2021). Os animais são monitorados diariamente no processo pós-operatório no Complexo Aquático da KU Leuven.

Os lóbulos ovarianos removidos foram submetidos ao processo para digestão enzimática da camada de células foliculares que envolve os ovócitos com colagenase tipo 1A de *Clostridium histolyticum* na concentração de 1,5 mg/mL em solução MBS (*Modified Barths Solution*) sem cálcio (5 mM HEPES, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2,5 mM NaHCO<sub>3</sub> e 1 mM MgSO<sub>4</sub> e pH 7,8), em rotação constante, 16°C por 2 horas e 30 minutos em um tubo de 15 mL. Posteriormente os ovócitos foram lavados cinco vezes seguidas com a total troca de 15 mL de MBS sem cálcio para total remoção da enzima. Ovócitos foram armazenados em solução MBS contendo geomicina (100 mg/L) e teofilina (90 mg/L) a 16°C.

Os experimentos realizados com animais neste trabalho foram aprovados pelo comitê de ética para Pesquisa Animal da KU Leuven (Projeto nº P186/2019). Todas as instalações e procedimentos adotados estão de acordo com as diretrizes da União Europeia sobre o bem-estar dos animais de laboratório declaradas na *Directive 2010/63/EU*.

#### **1.4.11 – Preparação de RNA mensageiro e purificação**

Plasmídeos contendo os genes para os canais rK<sub>v</sub>1.1, hK<sub>v</sub>1.3, rK<sub>v</sub>1.4, rK<sub>v</sub>1.5, rK<sub>v</sub>1.6, rK<sub>v</sub>4.2, rK<sub>v</sub>4.3, hK<sub>v</sub>7.1, hK<sub>v</sub>7.2, hK<sub>v</sub>7.3, hK<sub>v</sub>7.4, hK<sub>v</sub>7.5, KQT1 (*Caenorhabditis elegans*) hK<sub>v</sub>10.1, hK<sub>v</sub>11.1, Shaker-IR (*Drosophila melanogaster*), rNa<sub>v</sub>1.8, rβ1 (Subunidade Beta Na<sub>v</sub>), ENaC αβγ, LmGluCl (*Locusta migratoria*), hTRPA1 e hTRPV1 foram linearizados com enzima de restrição a 3' do gene de interesse, purificados com o *kit* comercial DNA Cleanup (Invisorb) e quantificado por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000 UV/Vis).

O DNA linear foi utilizado para a transcrição de mRNA com o *kit* comercial T7, T3 mMessage mMACHINE ou Sp6 (Ambion). Posteriormente o mRNA foi purificado com o *kit* Rneasy MinElute Cleanup (Qiagen) e quantificado por espectrofotometria (Nanodrop, Thermofischer) e armazenado a -80°C.

#### **1.4.12 – Injeção de RNA mensageiro**

Alíquotas de 10-50 uL de mRNA na concentração de 1ng/nL foram injetados nos ovócitos com auxílio do micro injetor (Nanoliter Injector A203XVZ, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Foram utilizadas pipetas de vidro produzidas a partir de capilares de vidro com ID = 0,530 mm ± 25 µm, OD 1,20 mm (World Precision Instruments, USA) e após rompimento da ponta é obtido um diâmetro interno de 10 – 20 µm. As pipetas foram preenchidas com óleo de parafina e o mRNA foi sugado por pressão negativa aplicado pelo micro injetor. Após injeção os ovócitos foram incubados a 16°C por 1-5 dias para expressão do canal de interesse, sendo conferida diariamente com a técnica de *Two Electrode Voltage Clamp*.

#### **1.4.13 – Two Electrode Voltage Clamp.**

Os registros foram realizados com um amplificador GeneClamp 500, digitalizadora digitada 1440A (Axon Instruments) controlado via *software* pClamp Clampex 10.4 (Axon Instruments) conectado a um computador com sistema operacional Windows XP. Todos os registros foram realizados em temperatura ambiente (18-22°C). Os dados experimentais foram exportados com o *software* pClamp Clampfit 10.4 (Axon Instruments) e analisados com OriginPro8 (OriginLab). Os microeletrodos foram fabricados com capilares de

borossilicato estirado com um sistema *puller* PUL-1000 (World Precision Instruments) e após preenchimento com solução interna composta de KCl 3 M apresentam resistência de pipeta entre 0,5 e 2,5 MΩ.

Os registros foram realizados com solução ND96 composta de 96 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM KCl, 5 mM HEPES, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub> e pH 7,5. Para registro de condições com ausência/redução da concentração do íon Na<sup>+</sup> foi utilizada uma solução de ND96 modificada com substituição da concentração de Na<sup>+</sup> por K<sup>+</sup> intitulada Solução HK *High K<sup>+</sup>* composta de 96 mM KCl, 2 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES e pH 7,5.

Para os canais dependentes de ligante LmGluCl, nAChR, TRPV1 e TRPA1, os agonistas foram dissolvidos diretamente na solução ND96 na concentração de 100μM de ácido L-glutâmico (LmGluCl), 100μM de cloreto de acetilcolina (nAChR), 10 μM de capsaicina ou 20 μM de AITC (Óleo de mostarda, Isotiocianato de Alila). Os canais dependentes de ligante nAChR e LmGluCl foram ativados com pulsos de solução contendo agonista diretamente na câmara de registros com um sistema de perfusão controlado manualmente com fluxo de 2mL/min.

#### **1.4.14 – Protocolo de registros – *Two Electrode Voltage Clamp***

Os canais K<sub>v</sub> foram registrados com aquisição de 1000 Hz e os dados filtrados com filtro do tipo Bessel a 500 Hz. Os canais K<sub>v</sub>1.x, Shaker IR e K<sub>v</sub>4.x foram registrados a partir de -90 mV com despolarizações de 0 mV por 500 ms, seguido de um pulso a -50 mV por mais 500 ms (Figura 10 A). Os canais K<sub>v</sub>7.x e K<sub>v</sub>10.1 foram registrados com despolarizações a 20 mV por 700 ms a partir de uma voltagem de repouso de -90 mV (Figura 10 B), correntes capacitivas e de vazamentos foram canceladas com um protocolo -p/4 com *holding* de -90 mV e intervalos de 5 s. O canal hERG1 (K<sub>v</sub>11.1) foi estimulado a partir do repouso de -90 mV a 0 mV por dois segundos, seguido de um pulso único de -120 mV por dois segundos para o registro da corrente de cauda (Figura 10 C).

Os canais ENaC, nAChR e LmGluCl foram registrados com uma voltagem de repouso de -70 mV durante 200 segundos, com aquisição a 1000 Hz e filtrados com filtro tipo Bessel a 500 Hz. O canal ENaC foi inicialmente estabilizado com a solução HK com a substituição momentânea da solução por ND96, que possui o íon Na<sup>+</sup> e permite a ativação do canal, o

ovócito foi *clampeado* com voltagem de membrana de -70mV. As toxinas foram aplicadas durante o registro das correntes estimuladas por ND96.

Canais TRP foram registrados com protocolos de rampa, com voltagem de membrana em -120mV e despolarização gradual de -120 a 80 mV durante 2 segundos, com intervalo de um segundo entre repetições, com aquisição de 1 kHz e filtrados com filtro tipo Bessel a 500 Hz (Figura 10 D).

O canal rNa<sub>v</sub>1.8 foi registrado com aquisição a 20 kHz e filtrado com filtro tipo Bessel a 2 kHz. Correntes capacitivas e de vazamentos foram canceladas com um protocolo -p/4 com *holding* de -90 mV e intervalos de 5s. As correntes foram ativadas com um protocolo *double-step*, com consiste em uma porção inicial do protocolo para registro das correntes referentes a ativação do canal e uma segunda porção referente a estimativa da inativação do canal. As correntes foram inicialmente ativadas a partir de um potencial de repouso de -90 mV incrementos de voltagem de 5 mV por *sweep* com duração de 50 ms, atingindo uma voltagem máxima de 40 mV para o registro da ativação dos canais, seguido por uma segunda porção do protocolo com voltagem única de 0 mV por 50 ms para o registro da porção inativada de canais iônicos (Figura 10E).

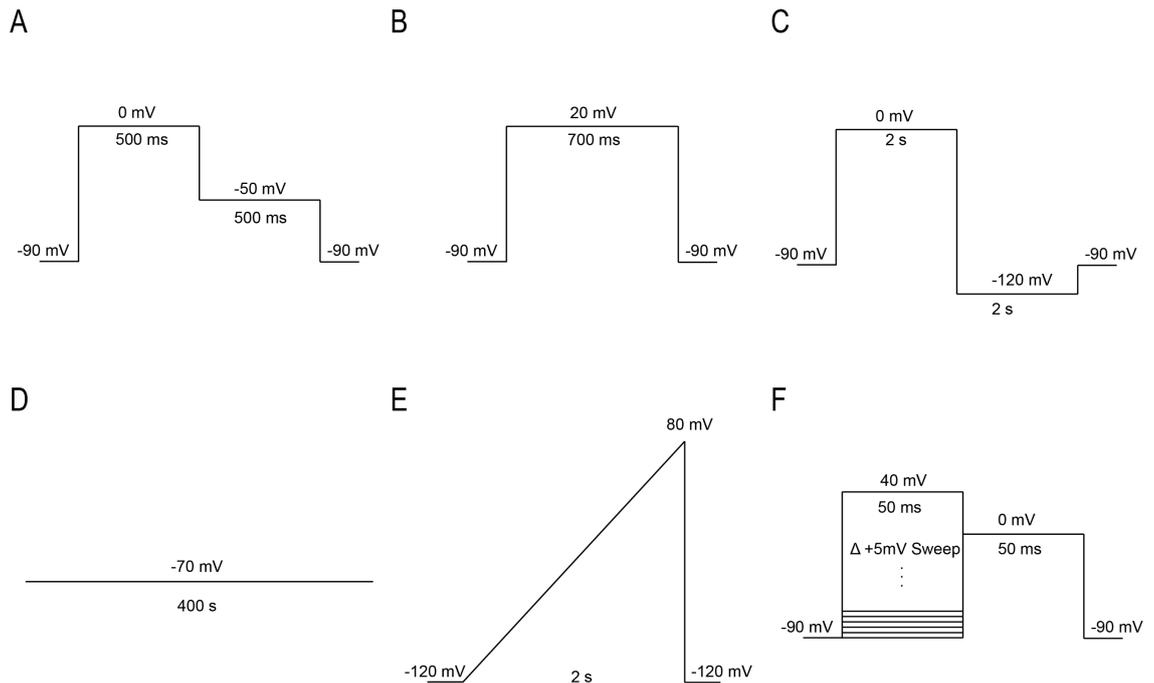


Figura 10 - Protocolos de voltagem *Two-Electrode Voltage Clamp*. (A) Protocolo de pulso com estímulos a 0 mV e -50 mV em seqüência para  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$ ,  $K_v1.4$ ,  $K_v1.5$ ,  $K_v1.6$ , Shaker IR,  $K_v4.2$  e  $K_v4.3$ . (B) Estímulo e 20 mV durante 700ms para os canais  $K_v7.1$ ,  $K_v7.2/K_v7.3$ ,  $K_v7.4$ ,  $K_v7.5$ , KQT1 e  $K_v10.1$ . (C) Protocolo para indução de correntes de cauda em  $K_v11.1$  (hErg1). (D) Protocolo de leitura das correntes ativadas por ligante utilizando uma voltagem de repouso para nAChRs, ENAC, LmGluCl. (E) rampa de voltagem de -120mV até 80 mV para os canais TRPV1 e TRPA1. (F) protocolo de voltagem *double-step* utilizando em  $Na_v1.8$  para ativação de correntes na ativação e correntes disponíveis na inativação.

#### 1.4.15 – Análises de dados eletrofisiológicos

Os valores de condutância foram calculados a partir das correntes utilizando a lei de Ohm,

$$g = \frac{I}{(V - V_{rev})}$$

onde V representa o potencial de estímulo que ativou a corrente, I a corrente do íon de interesse no dado potencial V, e  $V_{rev}$  é o potencial de reversão do íon de interesse calculado a partir das soluções interna e externa com a equação de Nernst,

$$V_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Ion]_{Externa}}{[Ion]_{Interna}}$$

onde R é a constante dos gases ideais, T a temperatura em Kelvin, F é a constante de Faraday,  $[Ion]_{\text{Externa}}$  é a concentração do íon sódio no meio externo e  $[Ion]_{\text{Interna}}$  é a concentração do íon no meio interno.

Os dados experimentais de condutância foram ajustados em uma equação simples de Boltzmann para avaliar a probabilidade de abertura dos canais (pO),

$$g \text{ ou } pO = \frac{1}{1 + e^{-(V - V_{1/2})/k}}$$

onde  $V_{1/2}$  é a voltagem em que metade dos canais estão no estado aberto, k é *slope* de voltagem. Os valores de  $\Delta V_{1/2}$  foram estipulados pela diferença entre o  $\Delta V_{1/2}$  na condição controle menos  $\Delta V_{1/2v}$  na presença do composto avaliado.

As correntes obtidas relacionada a disponibilidade de canais na inativação foram ajustados em equação simples de Boltzmann para avaliação da *Steady-State Inactivation* (SSI)

$$SSI = \frac{1}{1 + e^{-(V - V_{1/2h})/k}}$$

A porcentagem de inibição dos canais foi estipulada pela seguinte fórmula,

$$\% \text{ Inibição} = \left( \frac{100 \times I_{\text{maxToxina}}}{I_{\text{maxControle}}} \right) - 100$$

## 1.5 – Resultados

### 1.5.1 Cromatografia dos peptídeos sintéticos Ocyc9 e Omtx2

Foram obtidos comercialmente cerca de 10 mg dos peptídeos Ocyc9 e Omtx2 com as pontes dissulfeto já formadas na conformação especificada e com grau de pureza de 99%. Para confirmação da pureza dos peptídeos sintéticos foi realizado uma etapa de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) utilizando uma coluna analítica.

A cromatografia do peptídeo sintético Ocyc9 obteve o mesmo padrão de frações descrito anteriormente pela Beatriz Sarmiento (Sarmiento, 2019), mostrando duas frações (25,45% e 26,49% de acetonitrila) e ambas foram analisadas por espectrometria de massa (Figura 11).

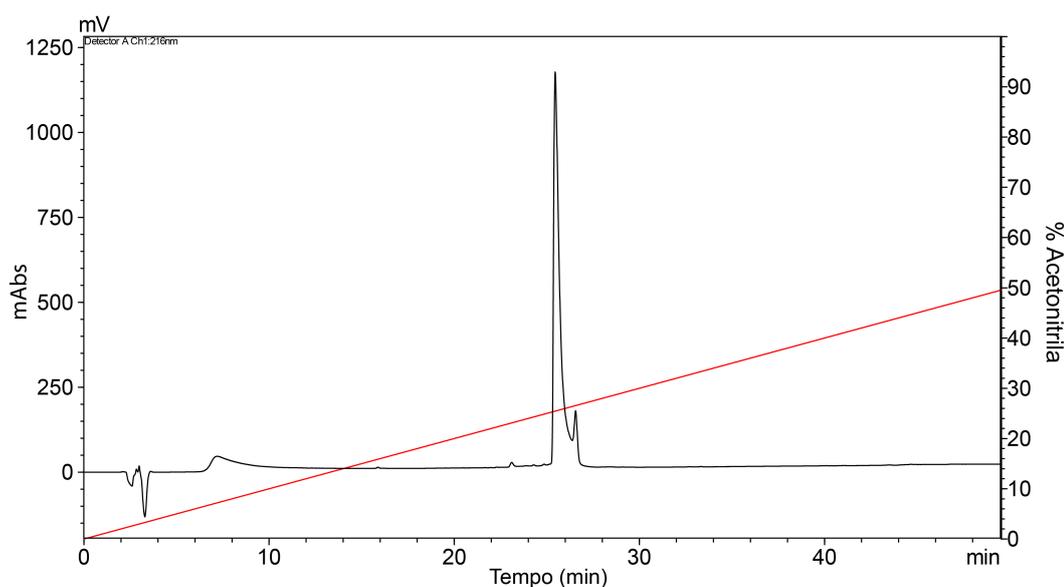


Figura 11 - Cromatografia líquida de alta eficiência RP-HPLC Ocyc9 sintético. 27  $\mu$ g do peptídeo foram utilizados nessa cromatografia. O peptídeo elui aos 25.45 % de ACN.

A cromatografia do peptídeo sintético Omtx2 mostrou apenas uma fração predominante eluindo em 23,10% de acetonitrila (Figura 12).

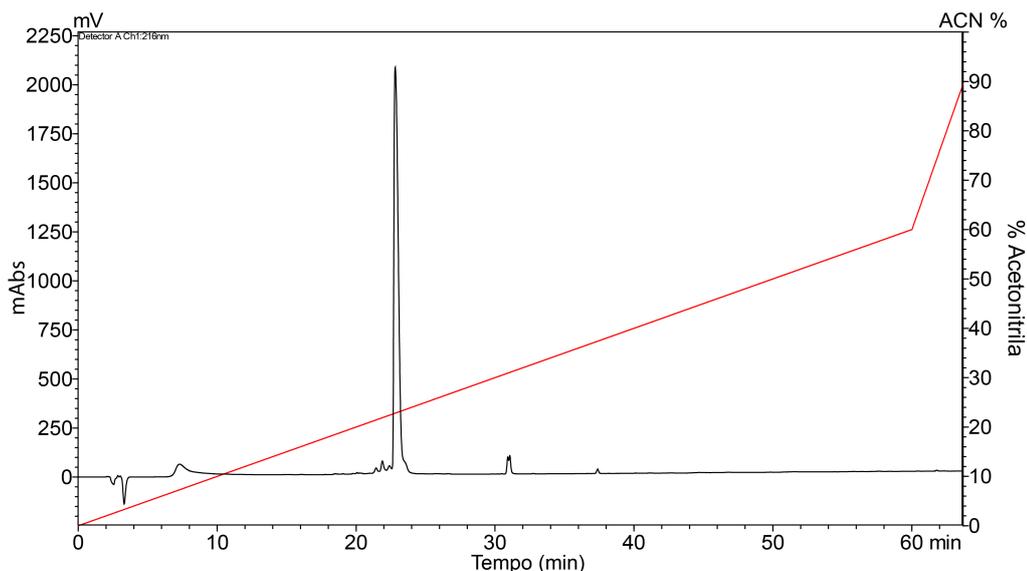


Figura 12 - Cromatografia líquida de alta eficiência RP-HPLC Omtx2 sintético. 55 µg do peptídeo foram utilizados nessa cromatografia. O peptídeo Omtx2 elui aos 23,10% de ACN.

### 1.5.2 - Cromatografia do peptídeo natural Ocyc9

A peçonha bruta de *Opisthacanthus cayaporum* foi fracionada por HPLC em projeto anterior e a fração liofilizada contendo o peptídeo Ocyc9 foi submetida a etapas de cromatografia conforme descrito anteriormente (Sarmiento, 2019). Na última etapa de purificação (Figura 13), a Ocyc9 eluiu a 23,53% de acetonitrila.

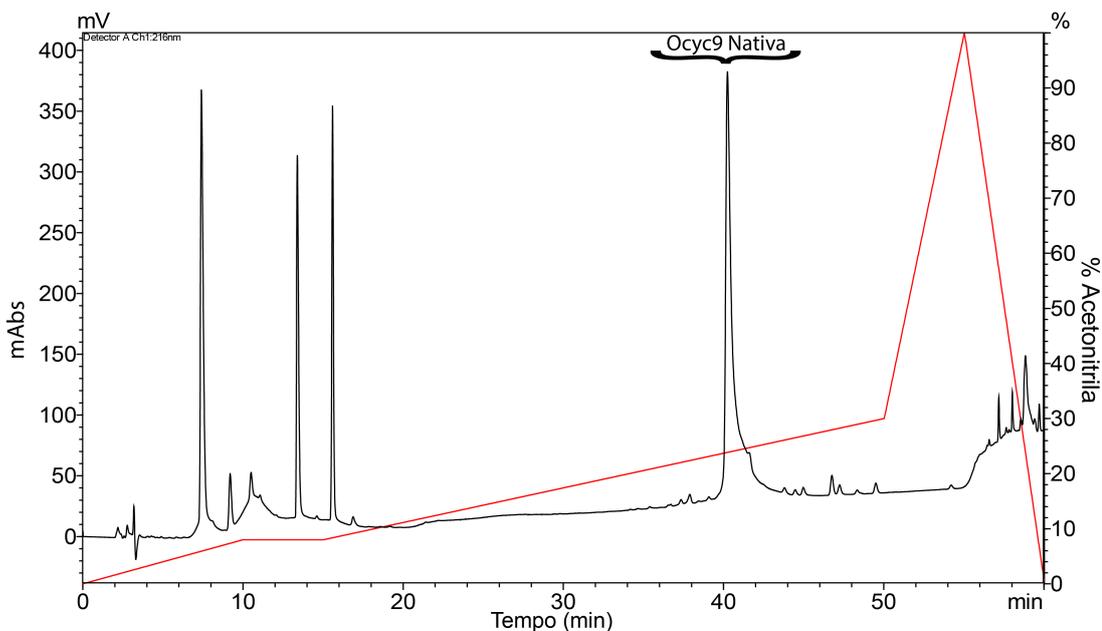


Figura 13 - Cromatografia líquida de alta eficiência RP-HPLC em coluna C18. O peptídeo elui aos 23,53% de ACN.

### 1.5.3 - Espectrometria de massa dos peptídeos sintéticos Ocyc9 e Omtx2

Adicional ao processo de cromatografia para confirmação da pureza dos peptídeos foi realizada a espectrometria de massas com a técnica MALDI ToF no modo refletivo para avaliação das massas monoisotópicas. O peptídeo sintético Ocyc9 apresentou uma massa monoisotópica  $[M+H]^+$  de 2545,13 Da (Figura 14). O peptídeo sintético Omtx2 possui massa monoisotópica  $[M+H]^+$  de 3146,40 Da. (Figura 15).

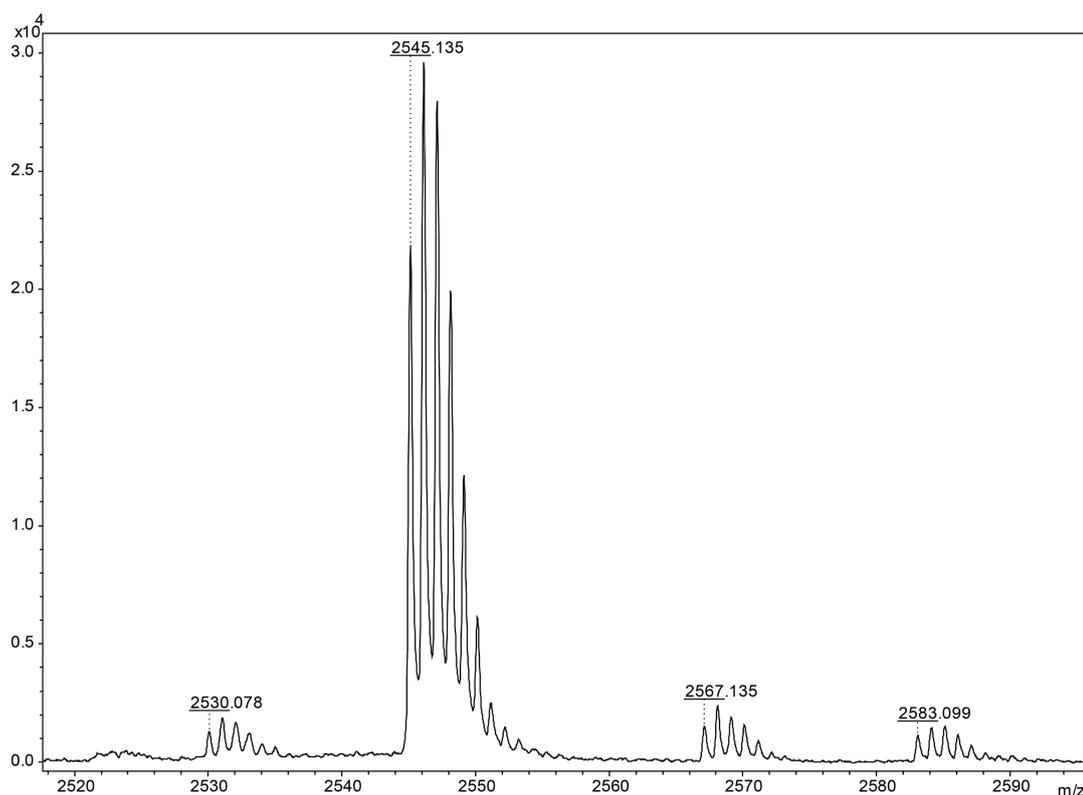


Figura 14 - Espectrometria de massa MALDI TOF, peptídeo sintético Ocyc9. Foi detectada a massa monoisotópica  $[M+H]^+ = 2545.13$  Da. Foram detectados os adutos de sódio  $[M+Na]^+$  de 2567.13 e de potássio  $[M+K]^+$  de 2583.09.

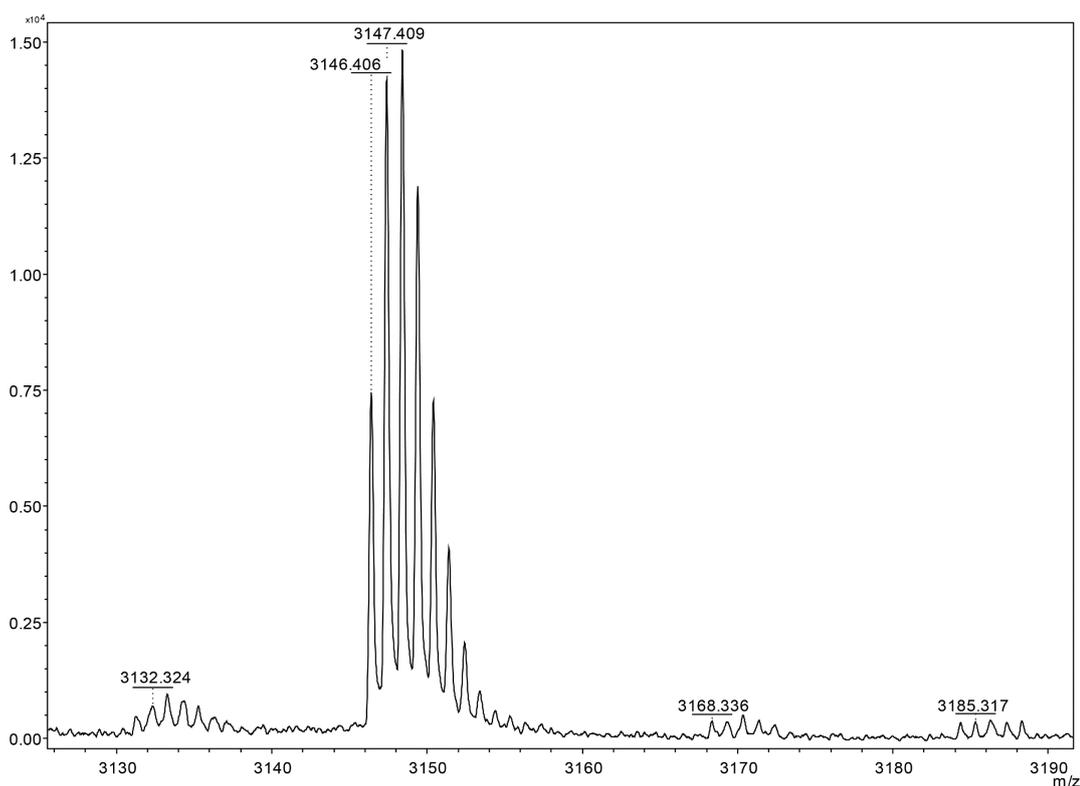


Figura 15 - Espectrometria de massa MALDI TOF, peptídeo sintético Omtx2. Foi detectada a Massa monoisotópica  $[M+H]^+ = 3146.40$  Da e os adutos de sódio  $[M+Na]^+ = 3168.33$  e de potássio  $[M+K]^+ = 3184,31$

Os valores de massa monoisotópica teórica (Tabela 1) e massa monoisotópica experimental apresentam uma diferença de 0,07 Da para o peptídeo sintético Ocyc9 e 0,10 Da para o peptídeo sintético Omtx2. Essa mínima diferença de massas é um indicativo que os peptídeos sintetizados correspondem aos peptídeos nativos e estão com pontes dissulfeto oxidadas.

Tabela 1 - Sequência e massas moleculares monoisotópicas dos peptídeos. Massa teórica monoisotópica calculada via *software* Isotope Pattern (Bruker Daltonics).

Toxin a	Sequência	Massa Teórica	Massa Experimental	AA
Ocyc9	FPPCVEVCVQHTGNVKECEAACGE	2545.06	2545.13	42
Omtx2	DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHPVEY	3146.50	3146.40	41

#### 1.5.4 - Espectrometria de Massa do peptídeo natural Ocyc9

Espectrometria de massas MALDI TOF/TOF foi realizada para confirmar se o peptídeo purificado se trata da Ocyc9. Foi detectado uma massa monoisotópica  $[M+H]^+ =$

2545.52 Da (Figura 16). Comparando o valor da massa experimental com a massa teórica (Tabela 1) verifica-se uma diferença de 0.39 Da. Essa baixa diferença entre os valores de massa indica que o peptídeo purificado é o de interesse.

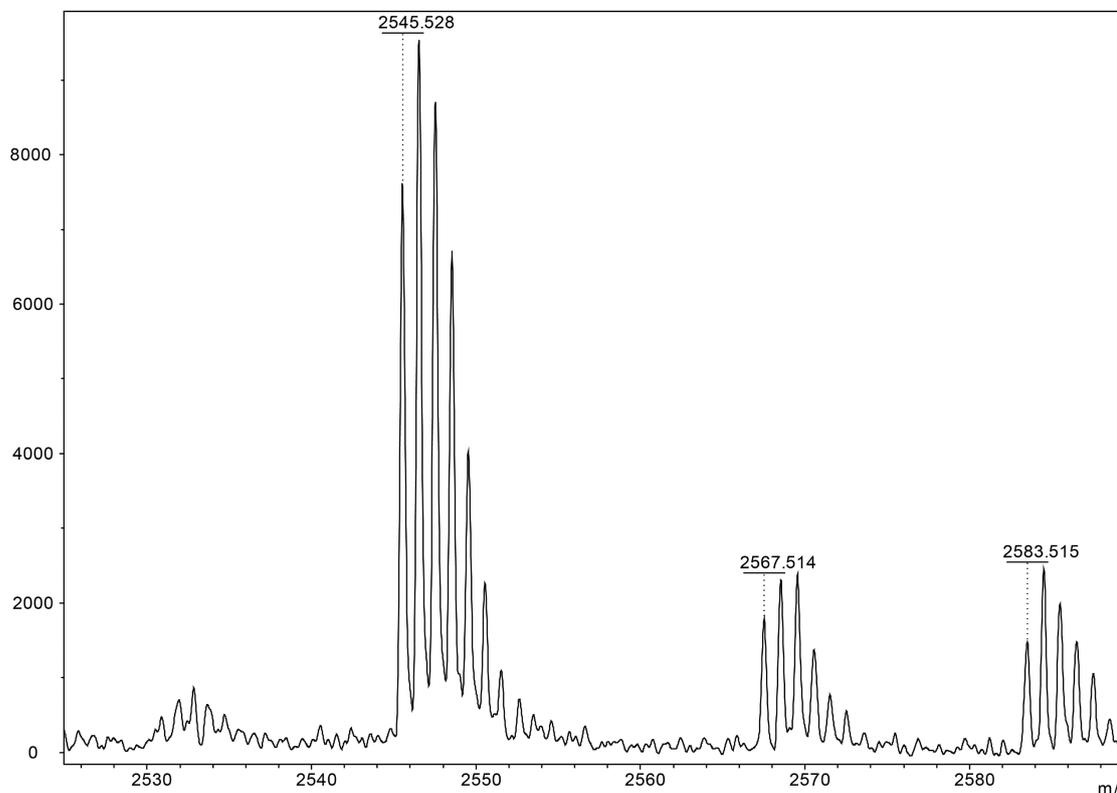


Figura 16 - Espectrometria de massa MALDI ToF do peptídeo Nativo Oyc9. Foi detectada a massa monoisotópica  $[M+H]^+$  de 2545.52 e os adutos de sódio  $[M+Na]^+$  de 2567.51 e de potássio  $[M+K]^+$  de 2583.51.

### 1.5.5 - Quantificação dos peptídeos

Os peptídeos utilizados neste trabalho foram quantificados utilizando a metodologia colorimétrica BCA. Os peptídeos sintéticos foram quantificados e observou-se conformidade com a quantidade solicitada.

Obteve-se 48,49  $\mu\text{g}$  da toxina Oyc9 nativa purificada da peçonha de *Opisthacanthus cayaporum*. Devido à baixa quantidade de material de origem natural, este foi separado para experimentos comparativos com o peptídeo sintético Oyc9 e possível confirmação de atividade.

### 1.5.6 - Busca de sequências homólogas em bancos de dados e alinhamento múltiplo

As sequências das toxinas Ocyc9 e Omtx2 foram submetidas em busca por sequências homólogas em bancos de dados e foram encontradas sete sequências, sendo que o conjunto das sequências representam todos os integrantes das  $\kappa$ -kTx2 (Figura 17).

				10	20	
Kappa-KTx2.5	Ocyc8	1	YDACVNACLEHHPNVRECEEEACKNPVPP			28
Kappa-KTx2.9	Pi6	1	VDACYEACMHHHMNSDDCIEACKNPVPP			28
Kappa-KTx2.8	Hetx204	1	GNACIEVCLQHTGNPAECDKPCDK----			24
Kappa-KTx2.7	Hetx203	1	GNACIEVCLQHTGNPAECDKACD-----			23
Kappa-KTx2.6	Ocyc9	1	FPPCVEVCVQHTGNVKECEAACGE-----			24
Kappa-KTx2.1	Omtx1	1	-DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHPVE-			26
Kappa-KTx2.2	Omtx2	1	-DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHPVEY			27
Kappa-KTx2.4	Omtx4	1	-DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHP---			24
Kappa-KTx2.3	Omtx3	1	NDPCEEVCLQHTGNVKACEEACQ-----			23

Figura 17 - Alinhamentos múltiplo das sequências com identidade com Ocyc9 e Omtx2. As sequências com homologia identificadas nos bancos de dados UniProt KB e Swiss-Prot. Representação do padrão das pontes dissulfeto Cys1-Cys4 e Cys2-Cys3.

### 1.5.7 - Eletrofisiologia em canal de cálcio dependente de voltagem $Ca_v2.3e$

Estudos preliminares a este trabalho indicaram que as toxinas Ocyc9 e Omtx2 apresentavam atividade bloqueadora sobre os canais de cálcio tipo R,  $Ca_v2.3e$ , nas concentrações de 100 e 300 nM (Tabelas 2 e 3)(Sarmiento, 2019). Com intuito de confirmar os resultados preliminares, a subunidade alfa do canal  $Ca_v2.3e$  foi coexpressa com a subunidade auxiliar  $\beta 2a$  em HEK293T e as correntes foram registrados com a metodologia de *Patch Clamp Whole Cell*.

Tabela 2 - Dados preliminares Ocyc9 em  $Ca_v2.3e$ . Porcentagem de bloqueios das correntes. Retirado da tese de doutorado de Beatriz Sarmiento (Sarmiento, 2019). C1-3 representam observações individuais

Ocyc9	C1	C2	C3	Media	Erro padrão
300 nM	77,90%	78,24%	69,56%	75,23%	0,0284
1uM	58,79%	47,07%	83,78%	63,22%	0,1083
3uM	85,28%	87,91%	74,55%	82,58%	0,0409

\*Significância estatística: p value:0,73 (One way Anova-Turkey); \* C: Célula

Tabela 3 - Dados preliminares Omtx2 em Cav2.3e. Porcentagem de bloqueios das correntes. Retirado da tese de doutorado de Beatriz Sarmiento (Sarmiento, 2019) C1-3 representam observações individuais

OmTx2	C1	C2	C3	Média	Erro padrão
300 nM	72,45%	69,61%		71,03%	0,0142
1µM	76,03%	68,95%	64,77%	69,92%	0,0328
3µM	32,74%	41,33%	47,35%	40,47%	0,0424

Ensaio realizado com a concentração de 300 nM e 3 µM das toxinas sintéticas Ocyc9 e Omtx2 demonstraram ausência de efeito bloqueador significativo das toxinas sobre o canal Cav2.3e, com inibições de 11.60±3.86%, 3.21±1.52% para Ocyc9 e Omtx2 a 300 nM, respectivamente, e inibições de 3.70±7.35% e 0.07±2.19% para Ocyc9 e Omtx2 a 3 µM, respectivamente (Figura 18 A-D). Devido à diferença nos valores de inibição da toxina Ocyc9 sintética entre os dados preliminares e os obtidos neste trabalho, optou-se por utilizar o peptídeo Ocyc9 nativo na concentração de 300 nM para confirmação dos resultados obtidos (Figura 18 E).

A toxina Ocyc9 nativa testada na concentração de 300 nM apresentou um valor médio de inibição de 1,77±1,63% (n=8) (Figura 18 E, Tabela 4). Este resultado indica a ausência de efeito da toxina nativa nos canais Cav2.3e a 300 nM, confirma a ausência de efeito demonstrada nos experimentos utilizando peptídeo sintético e difere dos resultados preliminares.

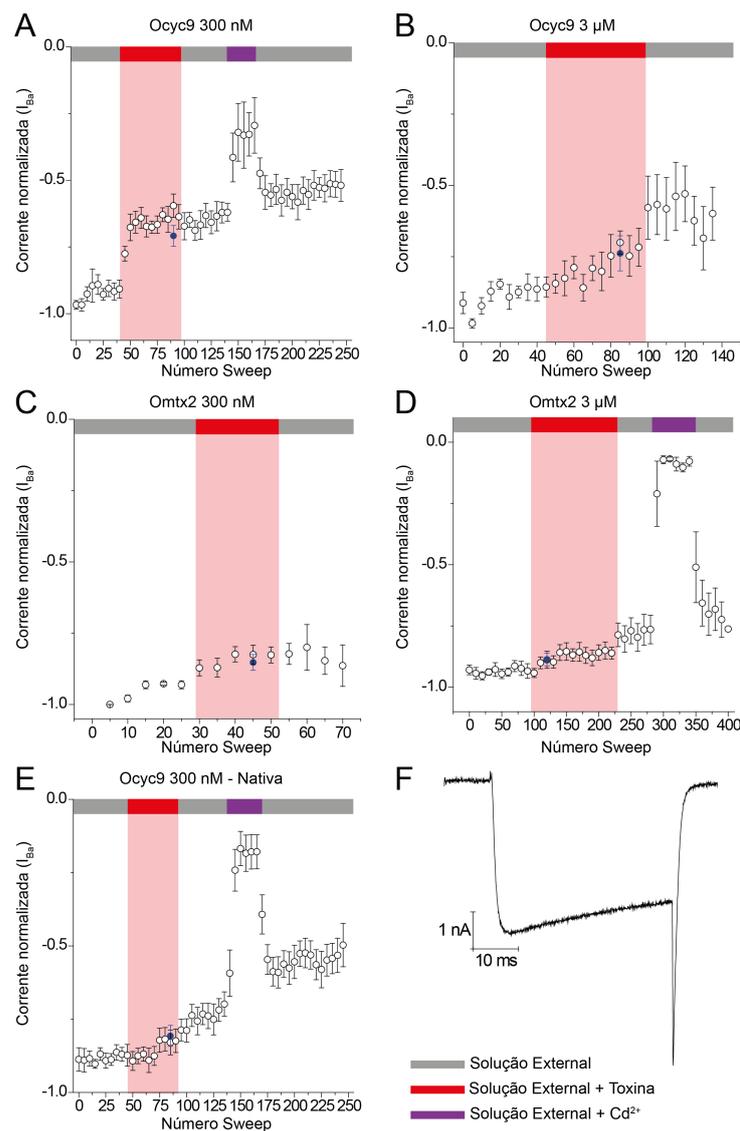


Figura 18 - Caracterização da atividade das toxinas Ocyc9 e Omtx2 no canal  $Ca_V2.3e$ . Correntes foram registradas considerando o decaimento da amplitude natural *rundown*. (A) Ocyc9 300 nM. (B) Ocyc9 3  $\mu$ M. (C) Omtx2 300 nM. (D) Omtx2 3  $\mu$ M. (E) Ocyc9 nativa 300 nM. (F) Traço de corrente representativa de  $Ca_V2.3e$ . Registros com a técnica *patch clamp whole cell* em células HEK293T com expressão transiente de canais  $Ca_V2.3e$

O grupo de pesquisa parceiro da Universidade de Innsbruck, na Áustria, onde foram realizados os estudos preliminares confirmaram em experimentos independentes a ausência do efeito inibitório das  $\kappa$ -Ktx Ocyc9 e Omtx2 sobre os canais  $Ca_V2.3e$  nas concentrações de 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M.

Tabela 4 - Resumo da atividade nos canais Cav2.3e obtidos neste trabalho. Valores médios de porcentagem de inibição e erro padrão.

	<b>Concentração</b>	<b>Média</b>	<b>n</b>
<b>Ocyc9 Sintética</b>	300 nM	11.6±3.86	5
	3 µM	3.70±7.35	4
<b>Ocyc9 Nativa</b>	300 nM	1.77±1.63	8
<b>Omtx2 Sintética</b>	300 nM	3.21±1.52	3
	3 µM	0.07±2.19	8

### 2.5.8 - Eletrofisiologia em canais K<sub>v</sub> *screening* a 10 µM

Com intuito de compreender o espectro de atividades que as toxinas Ocyc9 e Omtx2 podem apresentar sobre os canais de potássio dependentes de voltagem foram realizados experimentos na concentração de 10 µM nos canais rK<sub>v</sub>1.1, hK<sub>v</sub>1.3, rK<sub>v</sub>1.4, rK<sub>v</sub>1.5, rK<sub>v</sub>1.6, Shaker IR (*Drosophila melanogaster*), rK<sub>v</sub>4.2, rK<sub>v</sub>4.3, hK<sub>v</sub>7.1, hK<sub>v</sub>7.2/7.3, hK<sub>v</sub>7.4, hK<sub>v</sub>7.5, KQT1 (*Caenorhabditis elegans*), hK<sub>v</sub>10.1 e hK<sub>v</sub>11.1.

A toxina Ocyc9, na concentração de 10 µM, não apresentou atividade bloqueadora ou moduladora nos 15 canais K<sub>v</sub> testados, representando as famílias K<sub>v</sub>1.x, K<sub>v</sub>4.x, K<sub>v</sub>7.x, K<sub>v</sub>10.1 e K<sub>v</sub>11.1 (Figuras 19 e 20, Tabela 5).

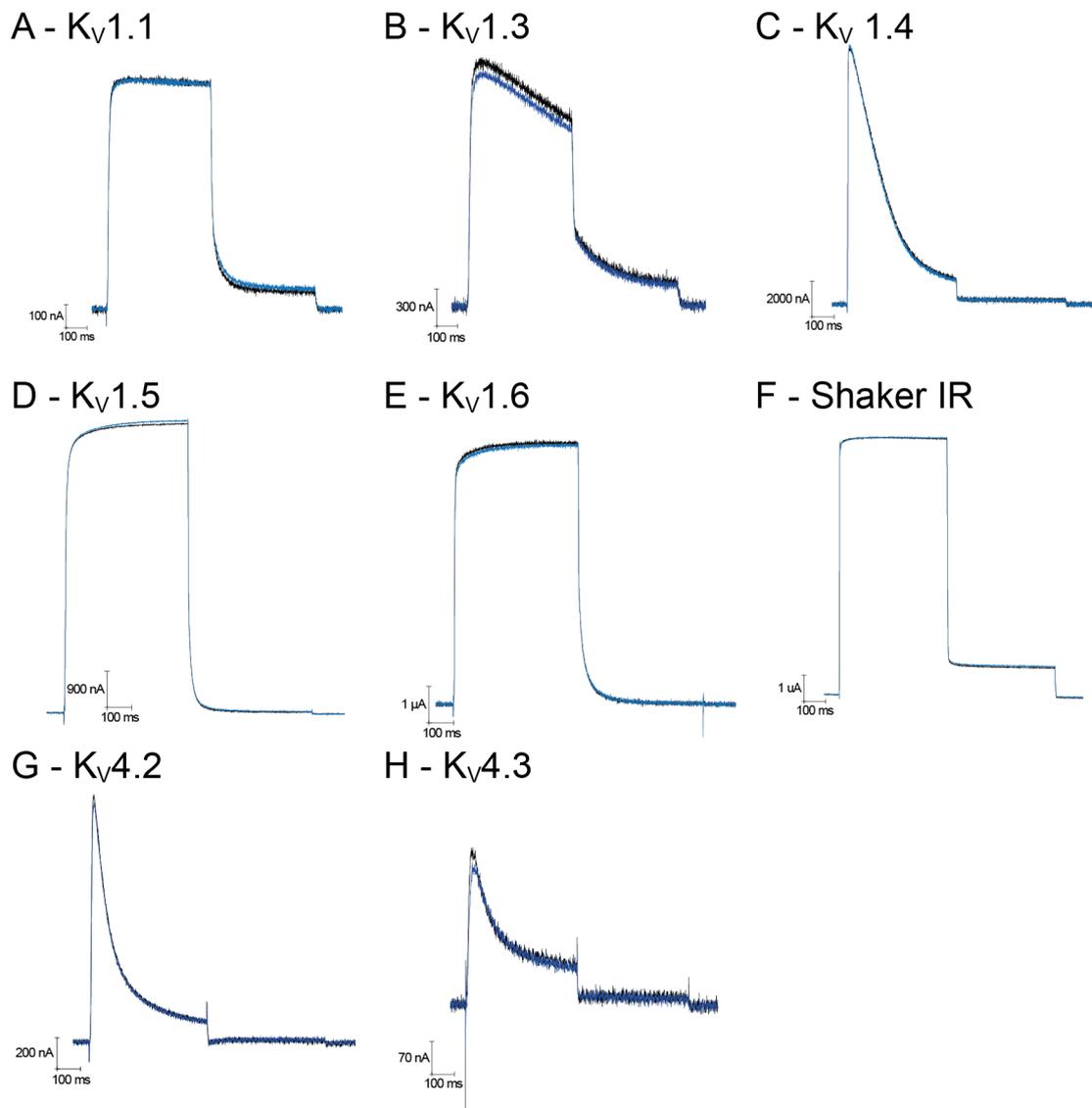


Figura 19 - *Screening* canais  $K_v$  Oyc9 10  $\mu$ M Bloco 1. (A)  $K_v$ 1.1. (B)  $K_v$ 1.2. (C)  $K_v$ 1.3. (D)  $K_v$ 1.4. (E)  $K_v$ 1.5. (F)  $K_v$ 1.6. (G) Shaker IR. (H)  $K_v$ 4.2. (I)  $K_v$ 4.3. Traços em preto representa correntes registradas na condição controle e traços azuis representam correntes registradas na condição de 10  $\mu$ M de Oyc9. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

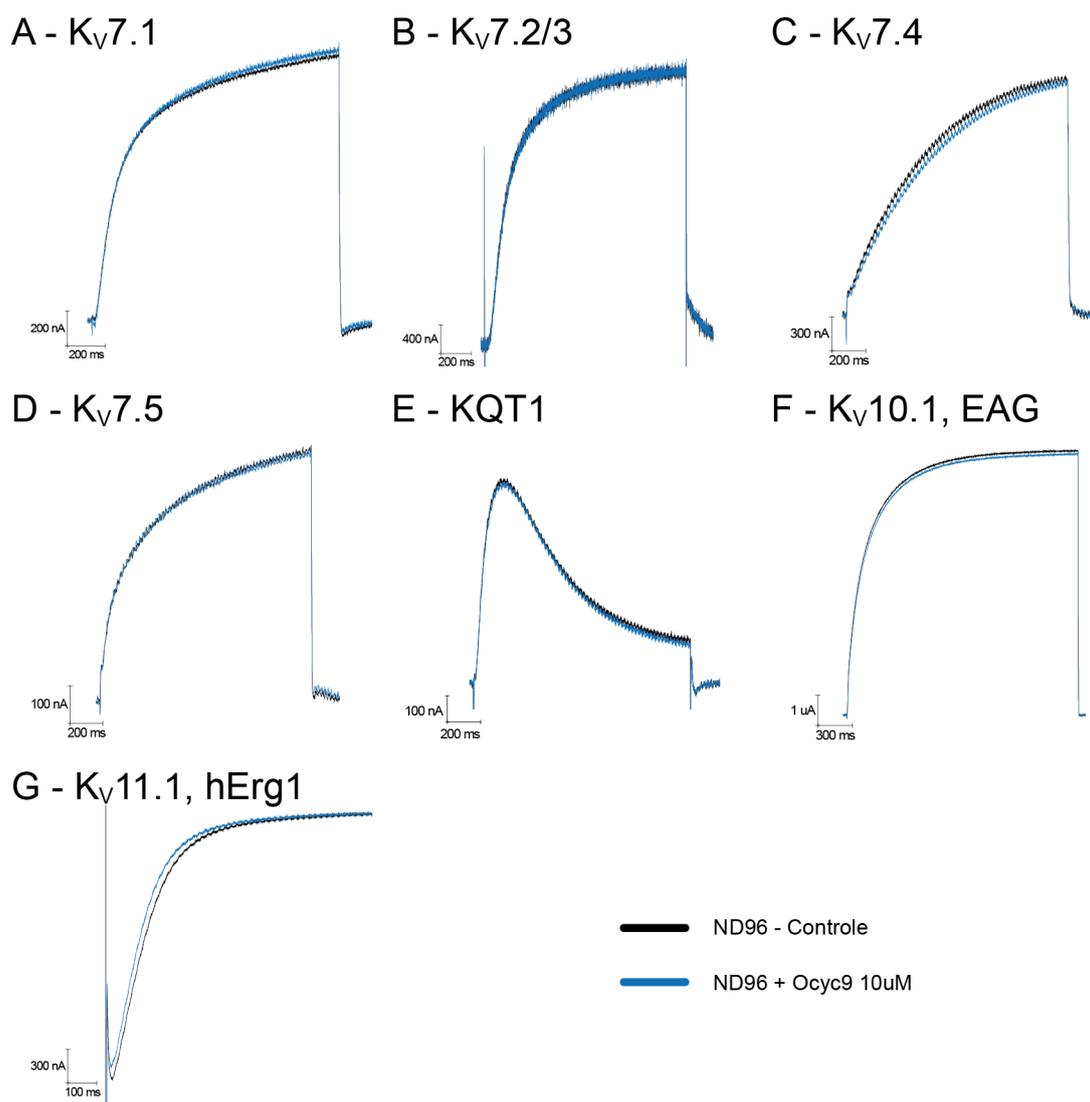


Figura 20 - *Screening* canais  $K_v$  Ocyc9 10  $\mu$ M Bloco 2. (A)  $K_v7.1$ . (B)  $K_v7.2/3$ . (C)  $K_v7.4$ . (D)  $K_v7.5$ . (E) KQT1. (F)  $K_v10.1$ . (G)  $K_v11.1$ . Traços em preto representa correntes registradas na condição controle e traços azuis representam correntes registradas na condição de 10  $\mu$ M de Ocyc9. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

Tabela 5 - Porcentagem de inibição dos canais  $K_v$  - Ocyc9 10  $\mu$ M. Valores médios de porcentagem de inibição e erro padrão.

Subtipo	$K_v1.1$	$K_v1.3$	$K_v1.4$	$K_v1.5$	$K_v1.6$	$K_v4.2$	$K_v4.3$	$K_v7.1$
% Inibição	$-0.23 \pm 0.63$	$-0.67 \pm 1.98$	$-0.52 \pm 1.77$	$-0.85 \pm 0.27$	$0.78 \pm 1.09$	$1.97 \pm 2.01$	$6.52 \pm 2.91$	$0.22 \pm 0.81$
n	5	6	3	4	4	3	3	7
Subtipo	$K_v7.2/3$	$K_v7.4$	$K_v7.5$	$K_v10.1$	$K_v11.1$	ShakerIR	KQT1	
% Inibição	$2.36 \pm 1.42$	$2.03 \pm 0.46$	$4.63 \pm 3.12$	$1.55 \pm 0.35$	$8.83 \pm 1.76$	$-1.98 \pm 1.18$	$3.35 \pm 2.20$	
n	3	4	3	3	6	4	3	

A toxina Omtx2 na concentração 10  $\mu$ M não apresentou atividade bloqueadora ou moduladora nos 15 canais testados (Figura 21 e 22, Tabela 6).

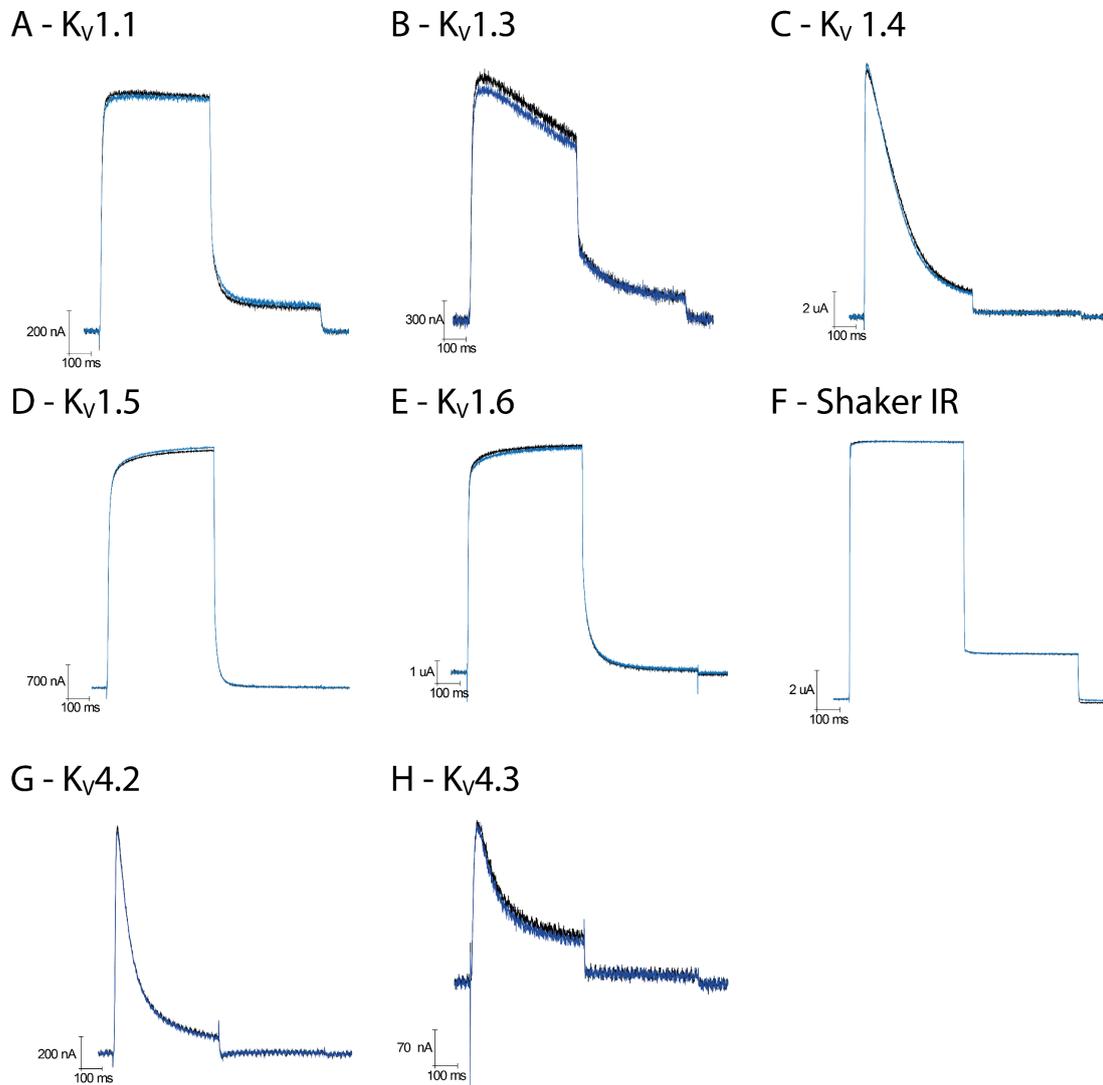


Figura 21 - *Screening* canais Kv Omtx2 10  $\mu$ M Bloco 1. (A) K<sub>V</sub>1.1. (B) K<sub>V</sub>1.2. (C) K<sub>V</sub>1.3. (D) K<sub>V</sub>1.4. (E) K<sub>V</sub>1.5. (F) K<sub>V</sub>1.6. (G) Shaker IR. (H) K<sub>V</sub>4.2. (I) K<sub>V</sub>4.3. Traços em preto representa correntes registradas na condição controle e traços azuis representam correntes registradas na condição de 10  $\mu$ M de Omtx2. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

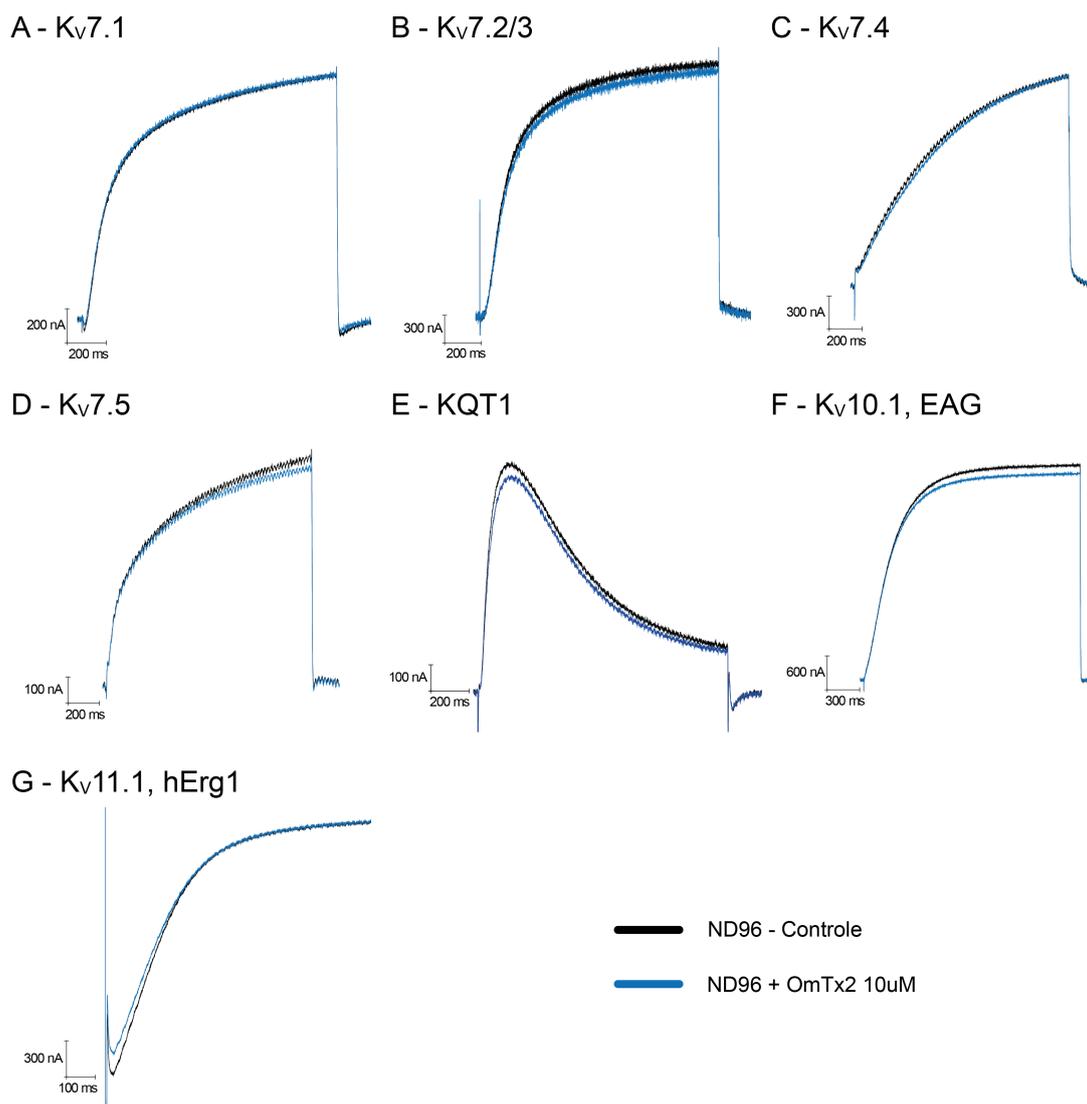


Figura 22 - *Screening* canais Kv Omtx2 10  $\mu$ M Bloco 2. (A)  $K_v7.1$ . (B)  $K_v7.2/3$ . (C)  $K_v7.4$ . (D)  $K_v7.5$ . (E) KQT1. (F)  $K_v10.1$ . (G)  $K_v11.1$ , hErg1. Traços em preto representa correntes registradas na condição controle e traços azuis representam correntes registradas na condição de 10  $\mu$ M de Omtx2. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

Tabela 6 - Porcentagem de inibição dos canais Kv – Omtx2 10  $\mu$ M. Valores médios de porcentagem de inibição e erro padrão.

Subtipo	$K_v1.1$	$K_v1.3$	$K_v1.4$	$K_v1.5$	$K_v1.6$	$K_v4.2$	$K_v4.3$	$K_v7.1$
%Inibição	$-0.80 \pm 0.83$	$0.57 \pm 1.45$	$2.11 \pm 2.67$	$1.85 \pm 1.35$	$1.21 \pm 0.29$	$-0.74 \pm 1.85$	$2.12 \pm 1.63$	$0.38 \pm 0.57$
n	5	6	3	5	3	3	3	6
Subtipo	$K_v7.2/3$	$K_v7.4$	$K_v7.5$	$K_v10.1$	$K_v11.1$	ShakerIR	KQT1	
%Inibição	$2.09 \pm 1.17$	$-3.53 \pm 1.87$	$3.62 \pm 0.58$	$-0.01 \pm 3.62$	$2.09 \pm 3.82$	$-0.76 \pm 1.02$	$5.70 \pm 0.74$	
n	3	3	3	3	6	5	3	

O *screening* das  $\kappa$ -KTx Ocyc9 e Omtx2 a 10  $\mu$ M nos 15 subtipos de canais de potássio dependentes de voltagem demonstram ausência de inibição com significância estatística (Figura 23).

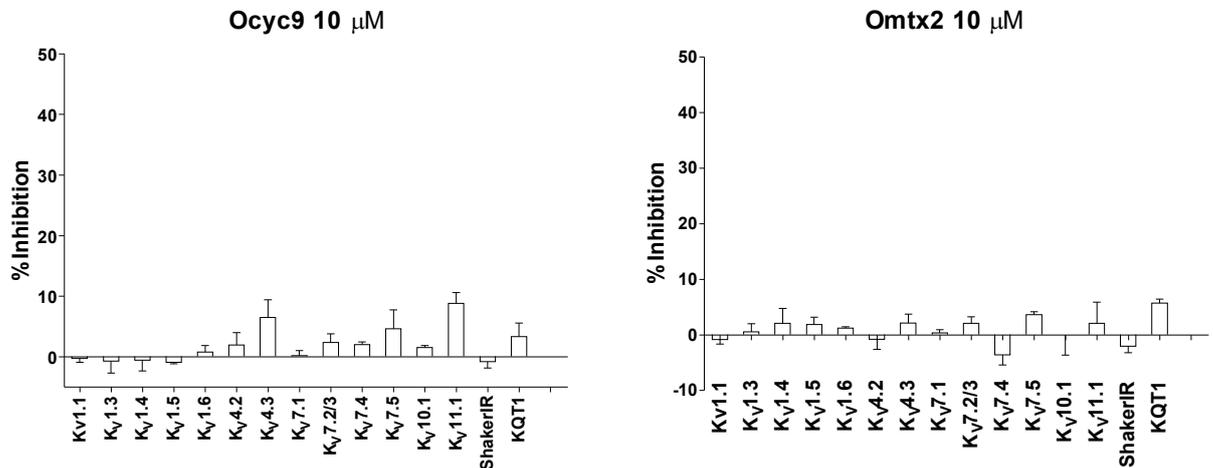


Figura 23 - Gráficos comparativos da porcentagem de inibição das toxinas Ocyc9 e Omtx2 em canais  $K_v$  a 10  $\mu$ M.

### 1.5.9 – Eletrofisiologia em canais dependentes de ligantes

O segundo grupo de receptores estudados como possíveis alvos moleculares das  $\kappa$ -KTxs Ocyc9 e Omtx2 foram os canais dependentes de ligantes, sendo os primeiros representantes testados os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)  $\alpha 7$  e  $\alpha 3\beta 4$ . Os receptores nAChR foram ativados com a perfusão de 10  $\mu$ M de cloreto de acetilcolina solubilizado em solução ND96, com pulsos inferiores a um segundo de perfusão e com intervalos de 60 segundos. Após o registro de três ativações na condição controle foram adicionadas as toxinas Ocyc9 e Omtx2 na concentração final de 10  $\mu$ M e a capacidade de inibir a ativação dos receptores frente a um novo estímulo de cloreto de acetilcolina foi avaliada. As toxinas Ocyc9 e Omtx2 a 10  $\mu$ M não apresentaram capacidade inibitória nestes receptores (Figuras 24 e 25).

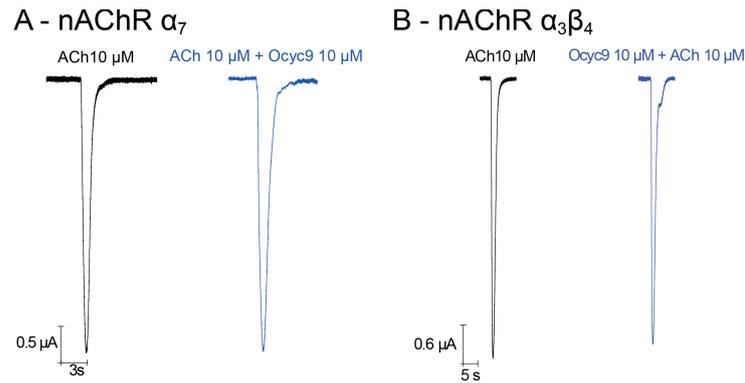


Figura 24 - Receptores nicotínicos de acetilcolina, avaliação do efeito antagonista da Ocyc9 10  $\mu$ M. (A) Receptor de acetilcolina  $\alpha_7$ . (B) Receptor de acetilcolina  $\alpha_3\beta_4$ . Correntes foram ativadas com a perfusão em pulsos de cloreto de acetilcolina a 10  $\mu$ M. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

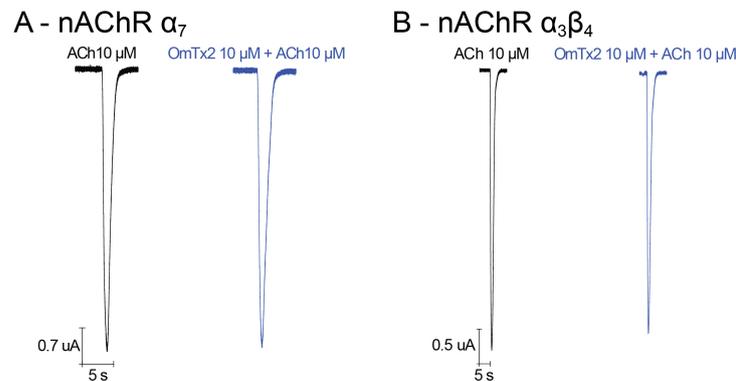


Figura 25 - Receptores nicotínicos de acetilcolina, avaliação do efeito antagonista da Omtx2 a 10  $\mu$ M. (A) Receptor de acetilcolina  $\alpha_7$ . (B) Receptor de acetilcolina  $\alpha_3\beta_4$ . Correntes foram ativadas com a perfusão em pulsos de cloreto de acetilcolina a 10  $\mu$ M. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

As toxinas Ocyc9 e Omtx2 foram testadas quanto à capacidade agonista e antagonista frente ao canal de cloreto dependente de glutamato do invertebrado *Locusta migratória*, denominado LmGluCl. Os canais de  $\text{Cl}^-$  foram ativados com a perfusão durante aproximadamente um segundo de 100  $\mu$ M de Glutamato (ácido glutâmico monossódico) solubilizado em solução ND96. Após registro de condição controle foram adicionados 10  $\mu$ M de Ocyc9 ou Omtx2 na câmara de registro para avaliação da capacidade agonista e posteriormente era realizado um pulso de 100  $\mu$ M de Glutamato para avaliar a capacidade antagonista das toxinas. As toxinas não apresentaram atividade sobre o receptor testado na concentração de 10  $\mu$ M (Figura 26).

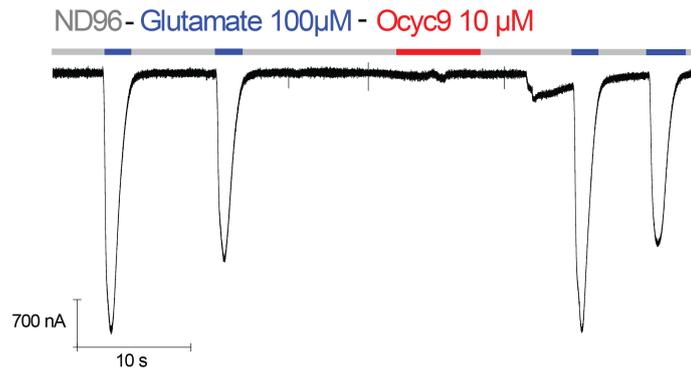


Figura 26 - Avaliação da atividade da toxina Ocyc9 a 10  $\mu\text{M}$  no canal de cloreto dependente de Glutamato de *Locusta migratória* (LmGluCl). Barra na parte superior da figura representa a solução perfundida momentaneamente, cor cinza para solução ND96, Azul para solução ND96 com adição de 100  $\mu\text{M}$  de Glutamato e vermelho para ND96 com a toxina. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

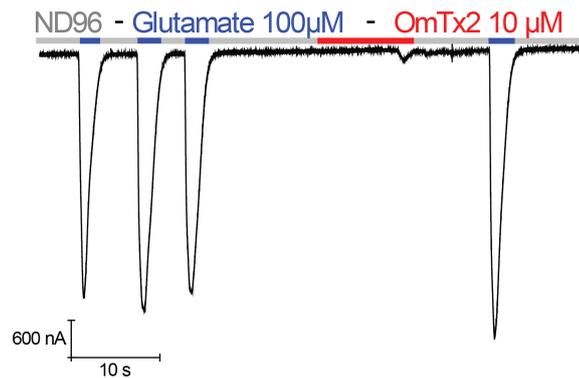


Figura 27 - Avaliação da atividade da toxina Omtx2 a 10  $\mu\text{M}$  no canal de cloreto dependente de Glutamato de *Locusta migratoria* (LmGluCl). Barra na parte superior da figura representa a solução perfundida momentaneamente, cor cinza para solução ND96, Azul para solução ND96 com adição de 100  $\mu\text{M}$  de Glutamato e vermelho para ND96 com a toxina. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

As toxinas Ocyc9 e Omtx2 foram avaliadas quanto à capacidade de interagir com os canais epiteliais de sódio ENaC  $\alpha\beta\gamma$ . As correntes foram ativadas com o aumento da concentração extracelular do íon  $\text{Na}^+$  (96mM) com a perfusão da solução ND96 e desativadas com a perfusão da solução HK que apresenta baixa concentração de  $\text{Na}^+$  (2 mM). Após três pulsos de ND96 para registro da amplitude máxima das correntes foi realizado um pulso longo e durante o pulso foram adicionadas as toxinas na concentração de 10  $\mu\text{M}$  (Figuras 28 e 29). Não foram observadas alterações na amplitude das correntes de ENaC na presença das toxinas Ocyc9 e Omtx2 na concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

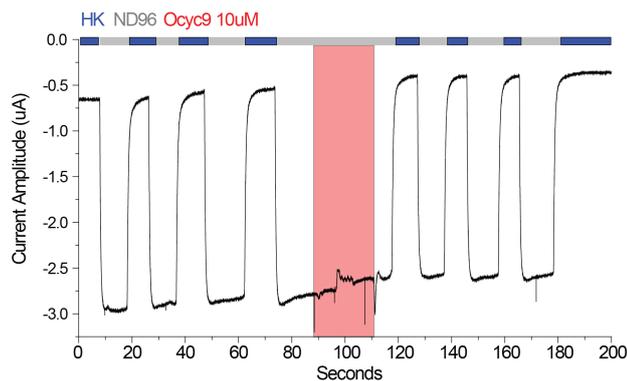


Figura 28 - Avaliação no bloqueio de correntes  $\text{Na}^+$  em canais ENaC  $\alpha\beta\gamma$  – Ocy9 10  $\mu\text{M}$ . Barra na parte superior da figura representa a solução perfundida momentaneamente, cor cinza para solução ND96, Azul para solução HK (*High K+*) e vermelho para ND96 com a toxina. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

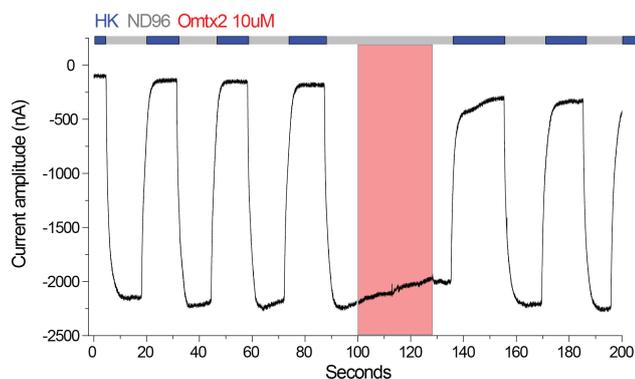


Figura 29 - Avaliação no bloqueio de correntes  $\text{Na}^+$  em canais ENaC  $\alpha\beta\gamma$  – Omtx2 10  $\mu\text{M}$ . Barra na parte superior da figura representa a solução perfundida momentaneamente, cor cinza para solução ND96, Azul para solução HK (*High K+*) e vermelho para ND96 com a toxina. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

As toxinas Ocy9 e Omtx2 foram testadas quanto à capacidade de afetar as correntes dos canais iônicos Receptores de Potencial Transiente Canônico (TRPV1) e Anquirina (TRPA1). As correntes foram ativadas com duplo estímulo, utilizando protocolos de rampas de voltagem associadas com a perfusão do ligantes específico. O receptor TRPV1 foi ativado com o ligante Capsaicina (CAP) na concentração de 10  $\mu\text{M}$  solubilizado em solução ND96. O receptor TRPA1 foi ativado com o ligante AITC na concentração de 20  $\mu\text{M}$ . Durante a ativação máxima com o ligante específico foram individualmente adicionadas à câmara de registro as toxinas na concentração final de 10  $\mu\text{M}$ . As toxinas Ocy9 e Omtx2 não apresentaram atividade bloqueadora nos receptores TRP testados (Figura 30 e 31).

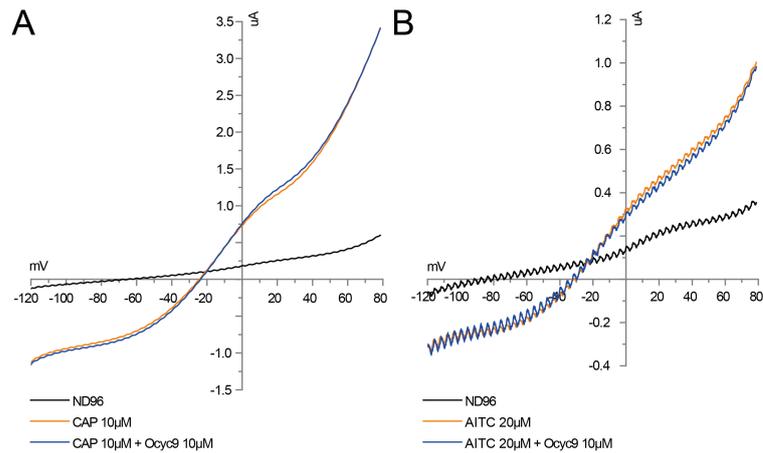


Figura 30 - Avaliação da atividade da toxina Ocyc9 em canais TRP. (A) Canal TRPV1 estimulado com rampa de voltagem e capsaicina a 10  $\mu$ M. (B) Canal TRPA1 estimulado com rampa de voltagem e AITC a 20  $\mu$ M. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

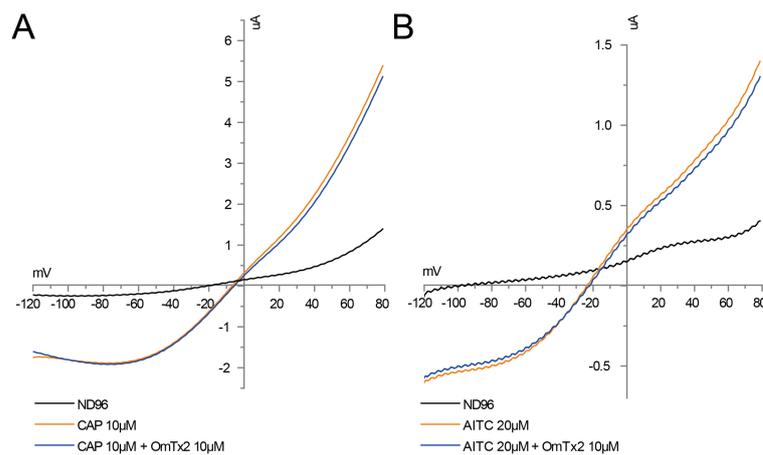


Figura 31 - Avaliação da atividade da toxina Omtx2 em canais TRP. (A) Canal TRPV1 estimulado com rampa de voltagem e capsaicina a 10  $\mu$ M. (B) Canal TRPA1 estimulado com rampa de voltagem e AITC a 20  $\mu$ M. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

### 1.5.10 – Eletrofisiologia $K_v1.x$ e Shaker IR a 500 $\mu$ M

As toxinas da família  $\kappa$ -KTx são definidas como bloqueadores de canais  $K_v$  de baixa afinidade, sendo necessárias altas concentrações para observar atividade. Para investigar essa atividade em altas concentrações, as toxinas Ocyc9 e Omtx2 foram testadas a 500  $\mu$ M frente aos canais  $rK_v1.1$ ,  $K_v1.3$ ,  $rK_v1.4$  e Shaker IR (Figuras 32 e 33). Para o estudo dessa interação foram avaliados dois parâmetros, a porcentagem de inibição das correntes e a

capacidade de alterar a probabilidade de abertura com observação da relação corrente-voltagem.

A toxina Ocyc9, a 500  $\mu$ M, provocou inibição da amplitude de correntes nos canais  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$ ,  $K_v1.4$  e Shaker IR, com inibições de  $58,16 \pm 5,85\%$ ,  $32,36 \pm 12,95\%$ ,  $33,14 \pm 2,28\%$  e  $64,29 \pm 9,31\%$  respectivamente (Figura 32, Tabela 7).

A inibição da amplitude de correntes nos canais  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$  e Shaker IR foi observada juntamente com o atraso na cinética de ativação observado nos traços das correntes e na modulação na probabilidade de abertura com deslocamentos da probabilidade de abertura para potenciais mais despolarizados, com variação de  $16,35 \pm 3,51$  mV em  $K_v1.1$ ,  $18,58 \pm 6,58$  mV em  $K_v1.3$ , e  $12,86 \pm 2,92$  mV em Shaker IR (Figura 32, Tabela 8).

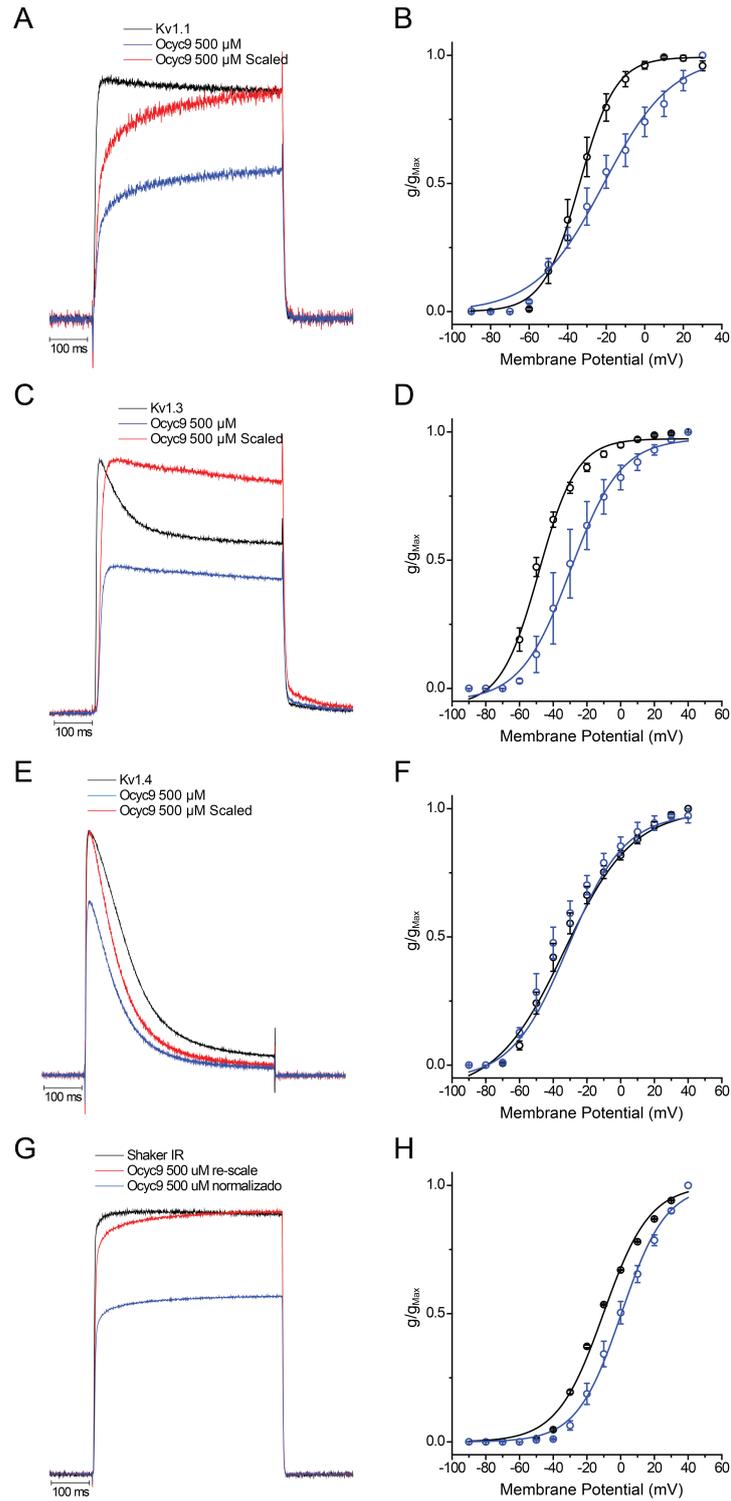


Figura 32 - Modulação de correntes de canais da família  $K_v1.x$  de mamíferos e Shaker IR de insetos por Ocyc9 a 500  $\mu$ M. (A, B) Traços do registro  $K_v1.1$  e relação I/V. (C, D) Traços do registro  $K_v1.3$  e relação I/V. (E, F) Traços do registro  $K_v1.4$  e relação I/V. (G, H) Traços do registro Shaker IR e relação I/V. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

Tabela 7 - Parâmetros de inibição Ocyc9 500  $\mu\text{M}$  em canais  $K_v$ . Valores médios de porcentagem de inibição e erro padrão. (\*) representa diferença estatística em Teste T pareado ( $P < 0.05$ ).

Subtipo	$K_v1.1$	$K_v1.3$	$K_v1.4$	Shaker IR
%Inibição	58.16 $\pm$ 5.85*	32.36 $\pm$ 12.95*	33.14 $\pm$ 2.28*	64.29 $\pm$ 9.31*
n	3	3	3	3

Tabela 8 – Parâmetros da probabilidade de abertura ativação dos canais  $K_v$  Ocyc9 500  $\mu\text{M}$ . Valores médios e erro padrão. (\*) representa diferença estatística em teste T pareado ( $P < 0.05$ )

	$P_o V_{1/2}$ (mV)	k	n
$K_v1.1$	-34.60 $\pm$ 3.05	9.16 $\pm$ 1.45	3
Ocyc9 500 $\mu\text{M}$	-18.25 $\pm$ 6.41	20.26 $\pm$ 1.8	
		5	
$\Delta$	16.35 $\pm$ 3.51*	11.10 $\pm$ 3.2	
		9*	
		11.11 $\pm$ 0.3	
$K_v1.3$	-48.54 $\pm$ 1.72	6	3
Ocyc9 500 $\mu\text{M}$		12.46 $\pm$ 0.3	
		9	
$\Delta$	18.58 $\pm$ 6.58	1.35 $\pm$ 0.75	
		17.56 $\pm$ 1.3	
$K_v1.4$	-35.16 $\pm$ 3.50	8	3
Ocyc9 500 $\mu\text{M}$		17.12 $\pm$ 0.7	
		3	
$\Delta$	-3.82 $\pm$ 5.17	0.26 $\pm$ 0.99	
		14.30 $\pm$ 0.2	
Shaker IR	-11.57 $\pm$ 0.15	2	3
Ocyc9 500 $\mu\text{M}$		14.42 $\pm$ 0.2	
		0	
$\Delta$	12.86 $\pm$ 2.92	0.11 $\pm$ 0.15	
	*		

A toxina Omtx2, a 500  $\mu\text{M}$ , provocou inibição da amplitude de correntes nos canais  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$ ,  $K_v1.4$  e Shaker IR, sendo que o canal mais afetado foi o  $K_v1.4$ . Neste, foram realizados experimentos a 250  $\mu\text{M}$  da toxina para avaliação dos demais parâmetros (Figura 33) (Tabela 9). Foram obtidas as inibições de amplitude de correntes de 51,95 $\pm$ 14,18% em  $K_v1.1$ , 63,77 $\pm$ 3,82% em  $K_v1.3$ , 89,31 $\pm$ 4,73% em  $K_v1.4$  e 74,34 $\pm$ 13,46% em Shaker IR (Tabela 9).

Nos canais  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$  e Shaker IR, a inibição de corrente foi observada com o atraso na cinética de ativação e deslocamento na probabilidade de abertura para potenciais mais despolarizados, com deslocamentos da probabilidade de abertura para potenciais mais despolarizados, com variação de  $10.1 \pm 1.47$  mV em  $K_v1.1$ ,  $45.61 \pm 9.50$  mV em  $K_v1.3$  e  $19.80 \pm 2.31$  mV em Shaker IR (Figura 33, Tabela 10). Na concentração de  $250 \mu\text{M}$ , a toxina Omtx2 provocou uma inibição de corrente em  $K_v1.4$  de  $89,31 \pm 4,73\%$  com ausência de modulação na probabilidade de abertura (Tabelas 9 e 10).

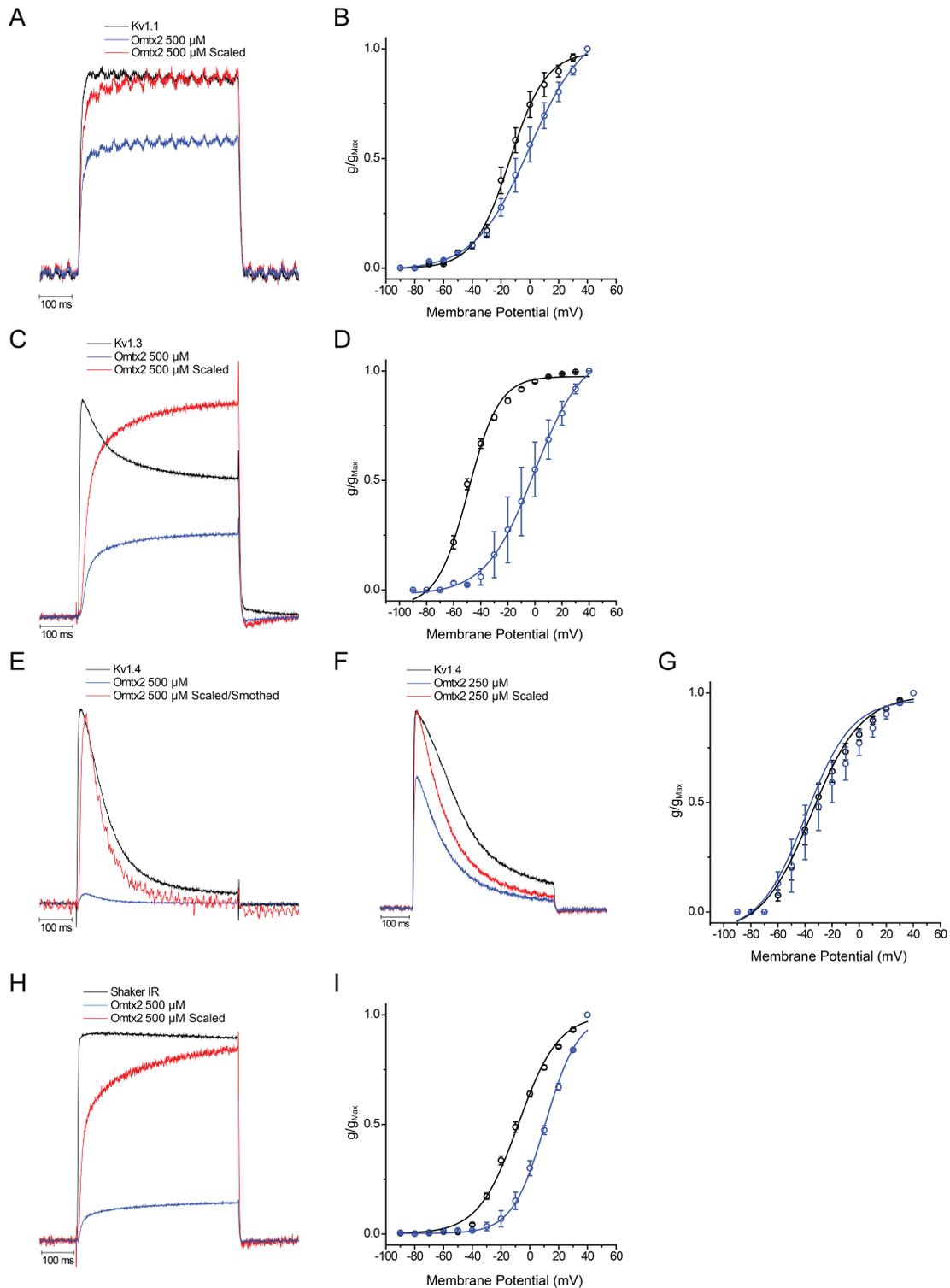


Figura 33 - Modulação de correntes de canais da família K<sub>v</sub>1.x de mamíferos e Shaker IR de insetos por Omtx2 500 μM. (A, B) Traços do registro K<sub>v</sub>1.1 e relação I/V. (C, D) Traços do registro K<sub>v</sub>1.3 e relação I/V. (E, F, G) Traços do registro K<sub>v</sub>1.4 e relação I/V. (H, I) Traços do registro Shaker IR e relação I/V. Registros com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

Tabela 9 - Parâmetros de inibição Omtx2 500 μM em canais K<sub>v</sub>. Valores médios de porcentagem de inibição e erro padrão. (\*) representa diferença estatística em teste T pareado (P<0.05)

Subtipo	K <sub>v</sub> 1.1	K <sub>v</sub> 1.3	K <sub>v</sub> 1.4	Shaker IR
%Inibição	51.95±14.18*	63.77±3.82*	89.31±4.73*	74.34±13.46*
n	3	6	3	3

Tabela 10 – Parâmetros da probabilidade de abertura ativação dos canais K<sub>v</sub> Omtx2 500 μM. Valores médios e erro padrão. (\*) representa diferença estatística em teste T pareado (P<0.05)

	Po V <sub>1/2</sub> (mV)	k	n
K <sub>v</sub> 1.1	-13.22±3.26	12.29±1.04	4
Omtx2 500 μM	-3.11±4.61	14.41±0.51	
Δ	10.1±1.47*	2.11±0.88*	
K <sub>v</sub> 1.3	-49.26±1.18	11.32±0.16	5
Omtx2 500 μM	-3.65±9.84	13.42±1.37	
Δ	45.61±9.50*	2.10±1.23	
K <sub>v</sub> 1.4	-35.57±4.85	17.56±1.38	3
Omtx2 250 μM	-30.23±9.90	17.12±0.73	
Δ	2.34±5.48	-0.26±0.99	
Shaker IR	-8.76±1.36	14.63±0.16	4
Omtx2 500 μM	11.04±1.17	11.64±1.01	
Δ	19.80±2.31*	-2.99±1.10*	

### 1.5.11 - Eletrofisiologia em canais Na<sub>v</sub>

A avaliação eletrofisiológica das toxinas Ocyc9 e Omtx2 nos canais Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.5, Na<sub>v</sub>1.7 e Na<sub>v</sub>1.8 nas concentrações de 1 μM e 10 μM para Nav1.8 demonstraram ausência de interação neste grupo de canais com essas toxinas, com ausência de inibição ou modulação nas probabilidades de abertura da ativação e inativação (Figuras 34-35, Tabelas 11-12).

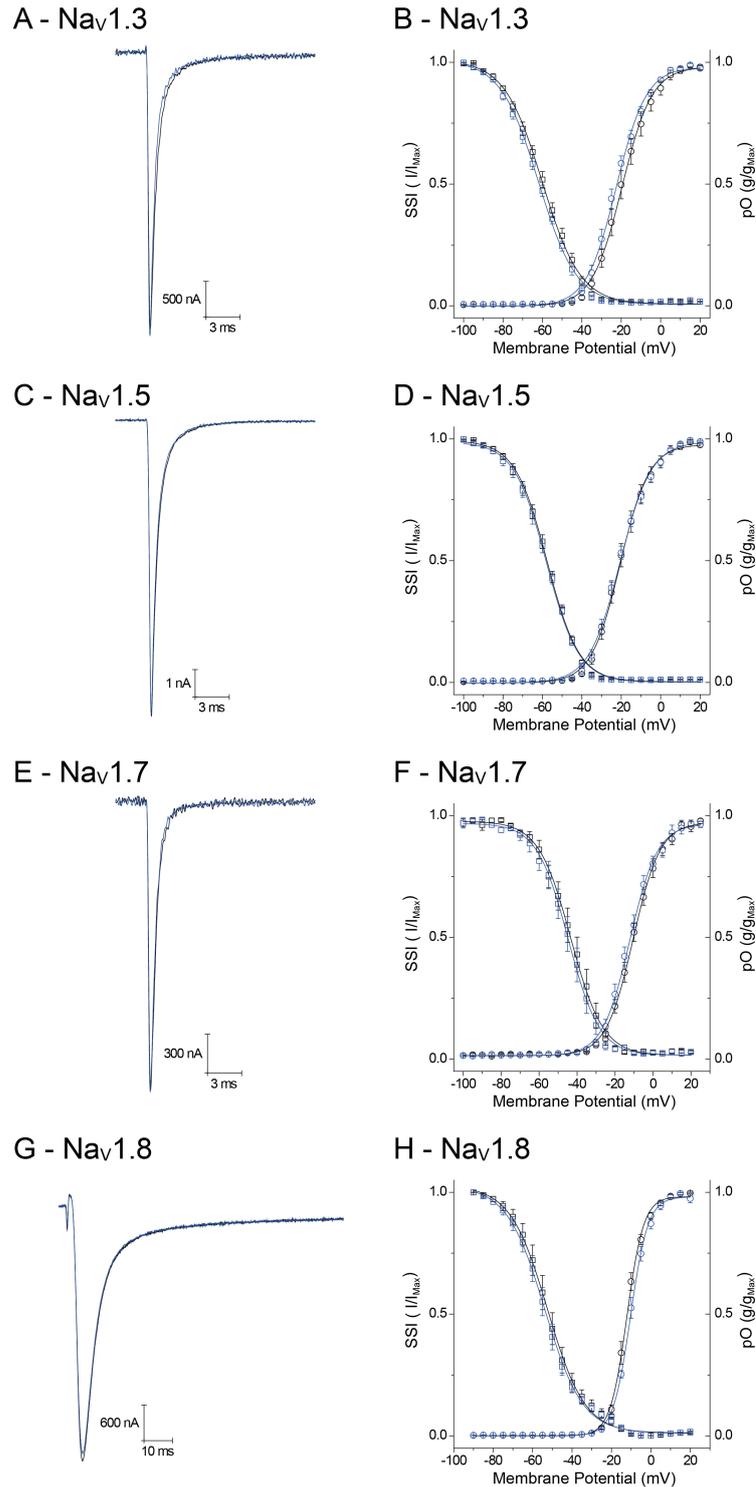


Figura 34 - Avaliação da atividade da Oyc9 1  $\mu$ M em isoformas de Nav. (A, B) Traços do registro Nav<sub>v</sub>1.3 e probabilidades de aberturas Po e SSI. (C, D) Traços do registro Nav<sub>v</sub>1.5 e probabilidades de aberturas Po e SSI. (E, F) Traços do registro Nav<sub>v</sub>1.7 e probabilidades de aberturas Po e SSI. (G, H) Traços do registro Nav<sub>v</sub>1.8 e probabilidades de aberturas Po e SSI. Traços na cor preta representam a condição controle. Traço na cor azul condição na presença da toxina a 1  $\mu$ M (10  $\mu$ M para Nav<sub>v</sub>1.8). Círculos abertos representam a probabilidade de abertura na inativação e quadrados abertos representam a probabilidade de abertura na inativação. Nav1.3, Nav1.5 e Nav1.6 registrado com a técnica de patch clamp Whole cell em células HEK e CHO. Nav1.8 registrado com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

Tabela 11 - Parâmetros das probabilidades de abertura e inibição dos canais Nav – Ocyc9 1 μM. Valores médios e erro padrão. (\*) representa diferença estatística em teste T pareado (p<0.05).

	Po V <sub>1/2</sub> (mV)	k	n	SSI V <sub>1/2</sub> (mV)	k <sub>h</sub>	n	Inibição (%)	n
<b>Nav1.3</b>	-19.27±1.91	7.40±0.45		-60.01±1.34	9.54±0.17			
<b>Nav1.3 + Ocyc9</b>	-22.48±1.27	7.44±0.16	5	-61.94±1.16	9.59±0.10	5	-5.82±3.51	5
<b>Δ</b>	-3.20±1.84	0.04±0.45		-0.62±0.92	-0.01±0.19			
<b>Nav1.5</b>	-19.58±1.67	7.13±0.50		-61.02±1.15	9.59±0.20			
<b>Nav 1.5 + Ocyc9</b>	-20.87±1.29	7.76±0.22	4	-61.47±0.95	9.60±0.10	4	0.74±2.10	10
<b>Δ</b>	-1.29±2.93	0.62±0.70		-0.44±1.05	-0.01±0.19			
<b>Nav1.7</b>	-10.36±1.17	7.01±0.21		-43.19±2.59	7.80±0.14			
<b>Nav1.7 + Ocyc9</b>	-12.09±1.24	7.16±0.31	5	-44.70±2.60	7.65±0.33	5	1.63±2.26	5
<b>Δ</b>	-1.72±0.31	0.14±0.13		-1.50±0.35	-0.15±0.30			
<b>Nav1.8</b>	-12.13±0.72	4.17±0.14		-52.41±2.41	9.12±0.70			
<b>Nav1.8 + Ocyc9</b>	-10.22±0.57	4.40±0.29	4	-54.05±2.07	9.12±0.70	4	2.06±2.85	4
<b>Δ</b>	-1.91±1.28	0.23±0.23		-1.64±0.76	0.30±0.30			

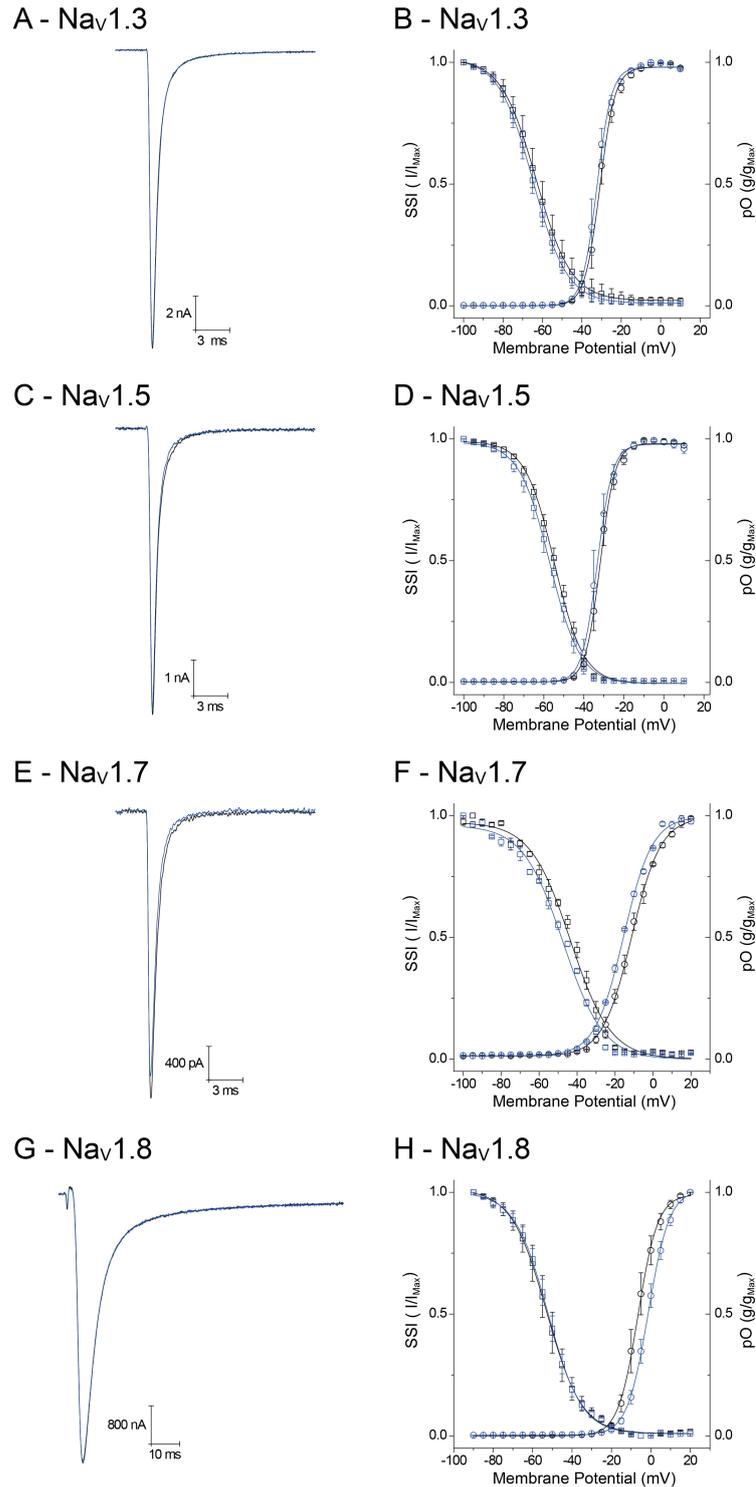


Figura 35 - Avaliação da atividade da Omtx2 1  $\mu\text{M}$  em isoformas de  $\text{Nav}$ . (A, B) Traços do registro  $\text{Nav}_{1.3}$  e probabilidades de aberturas  $P_o$  e SSI. (C, D) Traços do registro  $\text{Nav}_{1.5}$  e probabilidades de aberturas  $P_o$  e SSI. (E, F) Traços do registro  $\text{Nav}_{1.7}$  e probabilidades de aberturas  $P_o$  e SSI. (G, H) Traços do registro  $\text{Nav}_{1.8}$  e probabilidades de aberturas  $P_o$  e SSI a 10  $\mu\text{M}$ . Traços do registro  $\text{Nav}_{1.8}$  e probabilidades de aberturas  $P_o$  e SSI. Traços na cor preta representam a condição controle. Traço na cor azul condição na presença da toxina a 1  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{M}$  para  $\text{Nav}_{1.8}$ ). Círculos abertos representam a probabilidade de abertura na inativação e quadrados abertos representam a probabilidade de abertura na inativação.  $\text{Nav}_{1.3}$ ,  $\text{Nav}_{1.5}$  e  $\text{Nav}_{1.6}$

registrado com a técnica de patch clamp Whole cell em células HEK e CHO. Nav1.8 registrado com a técnica *Two electrode voltage clamp* em ovócitos.

Tabela 12 - Parâmetros das probabilidades de abertura e inibição dos canais Nav – Omtx2 1 µM. Valores médios e erro padrão. (\*) representa diferença estatística em teste T pareado (P<0.05)

	Po V <sub>1/2</sub> (mV)	k	n	SSI V <sub>1/2</sub> (mV)	k <sub>h</sub>	n	Inibição (%)	n
<b>Nav1.3</b>	-30.86±1.22	3.68±0.13		-65.52±2.02	8.26±0.19			
<b>Nav1.3 + Omtx2</b>	-32.45±1.46	3.41±0.08	3	-66.08±2.19	8.21±0.27	4	-5.82±3.51	4
<b>Δ</b>	-1.58±0.38	-0.26±0.04		-0.55±0.17	-0.04±0.07			
<b>Nav1.5</b>	-31.81±1.15	3.57±0.14		-54.77±1.23	7.19±0.24			
<b>Nav1.5 + Omtx2</b>	-33.30±1.88	3.35±0.25	3	-57.05±1.90	7.35±0.20	4	0.74±2.10	10
<b>Δ</b>	-1.49±0.93	-0.22±0.12		-2.27±0.92	0.16±0.05			
<b>Nav1.7</b>	-11.31±1.32	7.57±0.10		-43.47±1.32	10.47±0.15			
<b>Nav1.7 + Omtx2</b>	-15.46±0.13	7.56±0.18	3	-47.40±0.48	10.61±0.38	4	1.63±2.26	5
<b>Δ</b>	-4.15±1.38	-0.01±0.16		-3.93±1.49	0.13±0.22			
<b>Nav1.8</b>	-6.38±1.83	4.75±0.25		-53.04±2.95	8.51±0.23			
<b>Nav1.8 + Omtx2</b>	-1.24±1.14	5.26±0.08	3	-52.25±1.73	8.40±1.73	3	2.06±2.85	4
<b>Δ</b>	5.14±1.92	0.51±0.37		0.79±1.51	-0.11±0.15			

## 1.6 – Discussão

As  $\kappa$ -KTx são toxinas estruturadas no padrão de duas alfas hélices paralelas estabilizadas com duas cistinas (C $\alpha$ / $\alpha$ ), padrão que é único dessa família de toxinas. As  $\kappa$ -KTx são caracterizadas como bloqueadores de canais de potássio de baixa afinidade quando comparadas às toxinas que apresentam atividade na escala de nanomolar (Vandendriessche et al., 2012).

A  $\kappa$ -KTx Omtx2 ( $\kappa$ -Ktx 2.2), descrita inicialmente por Chagot et al., 2005 com o enovelamento não convencional C $\alpha$ / $\alpha$ , teve a de bloqueio dos canais K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.2 e K<sub>v</sub>1.3 caracterizada na concentração de 500  $\mu$ M e a propriedade de alterar a secreção de insulina dependente de glicose (Chagot et al., 2005). As toxinas Omtx2 e Ocyc9 ( $\kappa$ -KTx 2.6), ambas da família 2 das  $\kappa$ -KTx não apresentaram atividades nos canais K<sub>v</sub>2.1, BK (K<sub>Ca</sub>1.1), KATP (KIR6.2 / SUR 1), Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>1.3s, associados a secreção de insulina na primeira fase secreção de insulina, contudo resultados preliminares demonstraram atividade no canal Ca<sub>v</sub>2.3e nas concentrações de 100 e 300 nM (Sarmiento, 2019).

O canal Ca<sub>v</sub>2.3 está associado com a segunda fase de secreção de insulina (Jing et al., 2005), que se inicia aproximadamente 10-15 min após a fase inicial, responsável pela manutenção da secreção com o recrutamento de grânulos contendo insulina que estão em regiões distantes da maquinaria de secreção (Yang and Berggren, 2005). Além do potencial modulador da secreção de insulina, o canal Ca<sub>v</sub>2.3 é considerado um alvo molecular para o tratamento da doença de Parkinson, devido à sua expressão em neurônios dopaminérgicos e sua contribuição com do aumento da concentração citosólica de Ca<sup>2+</sup> para o estresse mitocondrial (Benkert et al., 2019).

O potencial farmacológico que as  $\kappa$ -KTx2 Omtx2 e Ocyc9 apresentam com a atividade preliminar em Ca<sub>v</sub>2.3e motivou inicialmente esse trabalho. Novos experimentos com a expressão de Ca<sub>v</sub>2.3e em células HEK293T e registro com a metodologia de *Patch Clamp Whole Cell* demonstraram ausência de efeito das toxinas sintéticas nas concentrações de 300 nM e 3  $\mu$ M (Figura 28). Devido à possibilidade de as toxinas sintéticas apresentarem o enovelamento incorreto com padrão de pareamento das cisteínas foi realizado experimento com uma amostra de Ocyc9 nativa purificada da peçonha de *Opisthacanthus cayaporum*,

porém essa hipótese foi descartada quando observada, novamente, a ausência de atividade na concentração de 300 nM com a toxina nativa (Figura 28E).

A ausência de efeito em  $Ca_v2.3$  mantém a modulação da secreção de insulina reportada por Chagot et al. (2005) sem explicação em nível molecular. Devido a isso um *screening* ampliando a investigação em canais iônicos associados à secreção de insulina e demais canais iônicos para caracterização dos potenciais alvos moleculares das  $\kappa$ -KTx foi realizado. Desta forma, 15 isoformas de canais de potássio dependentes de voltagem, duas isoformas do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), quatro isoformas canais de sódio dependentes de voltagem ( $Na_v$ ), o canal epitelial de sódio (ENaC), o canal de cloreto dependente de cloreto (GluCl) de invertebrados e duas isoformas de canais TRP foram testados neste trabalho.

As toxinas Omtx2 e Ocyc9 na concentração de 10  $\mu$ M não apresentaram atividade de bloquear as correntes nas 15 isoformas de canais  $K_v$  testadas (Figura 23). Entre as toxinas já descritas que apresentam identidade às  $\kappa$ -KTxs Omtx2 e Ocyc9, cuja caracterização em canais  $K_v$  foi realizada, estão as toxinas Ocyc8 (Camargos et al., 2011), Hefutoxin 1, Hefutoxin 2, Hefutoxin 3 (Srinivasan et al., 2002; Peigneur et al., 2013; Moreels et al., 2017), HeTx 203, HeTx204 (Chen et al., 2012), HelaTx1 (Vandendriessche et al., 2012; Peigneur et al., 2016) e Pi6 (Olamendi-Portugal et al., 2017).

A toxina Ocyc8 ( $\kappa$ -KTx2.5) do escorpião *Opisthacanthus cayaporum*, com identidade de 47,83% com Ocyc9 e 59,26% com Omtx2, foi avaliada frente aos canais  $K_v1.1$  e  $K_v1.4$  e resultou nas  $EC_{50}$  de  $217 \pm 46 \mu$ M e  $71 \pm 8,9 \mu$ M, respectivamente (Camargos et al., 2011).

A  $\kappa$ -KTx Hefutoxin 1 ( $\kappa$ -KTx1.1), isolada do escorpião *Heterometrus fulvipes*, com identidade de 18,18% com Ocyc9 e 28,57% com Omtx2, foi inicialmente testada nos canais  $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$  e  $K_v1.3$  a 100  $\mu$ M e apresentou capacidade de inibir, aproximadamente, 2% das correntes de  $K_v1.1$ , 17% as correntes de  $K_v1.2$  e 49% as correntes de  $K_v1.3$  (Srinivasan et al., 2002). Foi demonstrada a capacidade de atrasar as correntes na cinética de ativação com atividade dependente de concentração, mas não houve alteração no  $V_{1/2}$  da probabilidade de abertura da ativação (Srinivasan et al., 2002).

Posteriormente, a toxina Hefutoxin 1 foi avaliada a 40  $\mu\text{M}$  nos canais  $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$ ,  $K_v1.3$ ,  $K_v1.4$ ,  $K_v1.5$ ,  $K_v1.6$ , Shaker IR,  $K_v2.1$ ,  $K_v3.1$ ,  $K_v4.2$  e  $K_v11.1$ , sendo que apenas apresentou inibição de corrente em  $K_v1.2$ (8,4%),  $K_v1.3$  (54,2%) e  $K_v1.6$  (16,6% )(Peigneur et al., 2013). Em um estudo posterior, a toxina  $\kappa$ -KTx Hefutoxin 1 foi avaliada em  $K_v10.1$  e apresentou atividade de inibir corrente com  $IC_{50}$  de 26  $\mu\text{M}$  (Moreels et al., 2017). Nesse estudo, foram também testadas as toxinas  $\kappa$ -KTx Hefutoxin 2 e  $\kappa$ -KTx Hefutoxin 3 do mesmo escorpião, todavia apresentaram menores taxas de inibição e o valor de  $IC_{50}$  não foi calculado (Moreels et al., 2017).

HeTx203 ( $\kappa$ -KTx2.6) e HeTx204 ( $\kappa$ -KTx2.7), do escorpião *Heterometrus petersii*, foram avaliadas frente aos canais  $K_v1.3$  e  $K_v7.1$  (KCNQ1) (Chen et al., 2012). A toxina HeTx204 inibiu 35,1% das correntes de  $K_v1.3$  na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , enquanto a toxina HeTx203 não apresentou atividade neste canal. O canal  $K_v7.1$  foi inibido em 44,9% e 17,8% na concentração de 10  $\mu\text{M}$  pelas toxinas HeTx204 e HeTx203, respectivamente (Chen et al., 2012). A toxina HeTx204 também foi testada em TRPV1, BKCa e SKCa na concentração de 1  $\mu\text{M}$  e demonstrou ausência de atividade (Chen et al., 2012).

HeTx1 ( $\kappa$ -KTx 5.1), isolada do escorpião *Heterometrus laoticus* é denominada em alguns trabalhos como Hl15-1-1, apresenta identidade de 23,81% com Ocyc9 e 30,77% com Omtx2, foi testada na concentração de 30  $\mu\text{M}$  nos canais  $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$ ,  $K_v1.3$ ,  $K_v1.4$ ,  $K_v1.5$ ,  $K_v1.6$ ,  $K_v1.8$ , sendo que os canais mais sensíveis foram  $K_v1.1$  e  $K_v1.6$ , com  $EC_{50}$  de  $9,9 \pm 1,6 \mu\text{M}$  e  $1,75 \pm 0,53 \mu\text{M}$ , respectivamente (Vandendriessche et al., 2012). Experimentos utilizando análogos sintéticos de HeTx1 demonstraram que a remoção de seis resíduos de amino ácidos na região C-terminal mantiveram a atividade nos canais  $K_v1.1$  com redução de aproximadamente três vezes na potência, todavia apenas a deleção de uma única serina N-terminal foi capaz de reduzir a atividade, indicando ser um resíduo fundamental para a interação com o receptor (Peigneur et al., 2016). Ensaio competitivo com o receptor nAChR  $\alpha 7$  resultaram no  $IC_{50}$  de 1,4  $\mu\text{M}$ , indicando maior afinidade a este receptor que para os canais de potássio testados (Kasheverov et al., 2019).

A toxina Pi6 ( $\kappa$ -KTx2.9) de *Pandinus imperator*, apresenta identidade de 34,78% com Ocyc9 e 51,85% com Omtx2, foi testada a 100 nM nos canais Shaker B, Shab,  $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$ ,

K<sub>v</sub>1.3 e K<sub>v</sub>1.4, inibindo K<sub>v</sub>1.2 em, aproximadamente, 30% e K<sub>v</sub>1.3 em, aproximadamente, 25% (Olamendi-Portugal et al., 2017).

As  $\kappa$ -KTx são consideradas bloqueadores fracos dos canais K<sub>v</sub>, necessitando de concentrações elevadas (10-500  $\mu$ M) para desempenhar inibição de corrente (Chagot et al., 2005; Camargos et al., 2011; Peigneur et al., 2013). A toxina Omtx2 foi anteriormente caracterizada na concentração de 500  $\mu$ M frente aos canais K<sub>v</sub>1.1 K<sub>v</sub>1.2 e K<sub>v</sub>1.3, com inibição de 8%, 10% e 36%, respectivamente (Chagot et al., 2005). No presente trabalho, experimentos com as toxinas Ocyc9 e Omtx2 a 500  $\mu$ M foram realizados nos canais K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.3, K<sub>v</sub>1.4 e Shaker IR após o esgotamento de possíveis alvos moleculares disponíveis para *screening* (Figuras 32 e 33).

A toxina Ocyc9 inibiu os canais K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.3, K<sub>v</sub>1.4 e Shaker IR em, aproximadamente, 60%, 30%, 35% e 65%, respectivamente (Tabela 7). A inibição das correntes foi observada concomitante com a modulação nas cinéticas de ativação nos traços de corrente e deslocamento da probabilidade de abertura para voltagem maiores, valores de  $\Delta V_{1/2}$  de cerca de 16 mV em K<sub>v</sub>1.1 e 12 mV em Shaker IR (Tabela 7 e 8).

Em novos experimentos, a toxina Omtx2 a 500  $\mu$ M inibiu os canais K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.3, K<sub>v</sub>1.4 e Shaker IR, com valores aproximados de 50%, 65%, 90% e 75%, respectivamente, e, assim como observado para a toxina Ocyc9, a inibição de corrente ocorreu associada à modulação nas cinéticas e ao deslocamento da probabilidade de abertura, com valores de cerca de 10 mV, 45 mV e 19 mV, para os canais K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.3 e Shaker IR (Tabela 9 e 10), respectivamente. O canal K<sub>v</sub>1.4 foi o único com ambas as toxinas que apresentou inibição de corrente com ausência de modulação nas cinéticas e probabilidades de abertura.

As toxinas KTx escorpiônicas são denominadas bloqueadoras de canais de potássio por interagirem diretamente com o domínio do filtro de seletividade e cessando o fluxo iônico (Kuzmenkov et al., 2015). A interação com o filtro de seletividade é propiciada para a maioria das toxinas pela presença de uma dupla de aminoácidos separados por 6-7 Å, sendo essa dupla denominada de díade funcional (Dauplais et al., 1997). A díade é formada de uma lisina e um segundo resíduo podendo ser tirosina, fenilalanina ou leucina, onde a lisina é responsável por acessar o interior do poro iônico, enquanto o resíduo aromático ou alifático

interage com resíduos presentes na região exterior ao poro (Dauplais et al., 1997; Gasparini et al., 1998; Kuzmenkov et al., 2015).

A toxina denominada Ocyc9MOD, que apresenta a substituições Val5Tyr e Gly23Lys para a formação da díade funcional, demonstrou a capacidade de desempenhar o mesmo efeito que a toxina Ocyc9 em metade da concentração (250  $\mu$ M), indicando que a díade funcional não é necessária para a interação com o poro mas afeta diretamente a potência (Sarmiento, 2019).

A toxina  $\kappa$ -hefutoxin 1 apresenta a díade funcional com Tyr5 e Lys19 e apresenta a característica de atrasar a cinética de ativação, mas com ausência de modulação na probabilidade de abertura (Srinivasan et al., 2002). Em estudo computacional estrutural, foi indicado que a mudança dos resíduos da díade funcional na  $\kappa$ -hefutoxin1 afeta a interação, entretanto foi observado que a interação não estava localizada na Lys19 e sim na Tyr5, que está mais associada a interagir com a região externa ao poro iônico (Chagot et al., 2005).

Os resultados obtidos no presente trabalho com Ocyc9 e Omtx2 a 500  $\mu$ M indicam que inibição da corrente ocorre devido à modulação de *gating*, por atrasarem a cinética de ativação dos canais testados e deslocar a probabilidade de abertura para potenciais mais positivos. Possivelmente, estas toxinas interagem com baixa afinidade no poro iônico e com maior afinidade com a região exterior ao poro, assim como proposto para  $\kappa$ -hefutoxin1 (Chagot et al., 2005). A ausência de modulação dos canais  $K_v1.4$  poderia ser explicada por uma maior afinidade ao poro iônico em comparação à região externa do poro e atuando apenas como bloqueador.

A modulação da secreção de insulina dependente de glicose proposta para a toxina Omtx2 não pode ser explicada por modulação nos canais  $K_v$  em concentrações até 10  $\mu$ M, todavia caso utilizadas concentrações superiores poderia a inibição de corrente seguir o mecanismo proposto no parágrafo anterior.

Componentes da peçonha de animais com capacidade de alterar o metabolismo de glicose são descritas na literatura (Sarmiento et al., 2019). A modulação em canais de sódio dependentes de voltagem é um dos mecanismos possíveis, entretanto as toxinas Ocyc9 e

Omtx2 a 10  $\mu$ M demonstraram ausência de interação com canais  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.7$  e  $Na_v1.8$  (Figuras 34 e 35).

A alfa toxina TsTx-V, atualmente conhecida como Ts3, de *Tityus serrulatus*, foi capaz de despolarizar a membrana de células beta pancreáticas, além de diminuir a resistência de membrana e aumentar a secreção de insulina (Gonçalves et al., 2003). Os canais  $Na_v1.6$  e  $Na_v1.7$  estão presentes nas células beta pancreáticas, porém calcula-se que esses canais não possuem grande participação na secreção de insulina, uma vez que a voltagem de repouso que a membrana se estabiliza afetaria a disponibilidade de canais não inativados (Gil-Rivera et al., 2021). Entretanto, a ação da alfa toxina Ts3 é capaz de aumentar a disponibilidade e permitir que atuem na despolarização (Tibery, 2024).

A toxina SpTx1, um peptídeo de 54 aminoácidos e presente na peçonha da lacraia *Scolopendra polymorpha*, possui uma alta afinidade ao canal  $K_{ATP}$ , com um  $K_D$  de 15 nM para o canal de humanos e 670 nM para o canal de murino (Ramu et al., 2018, 2022). Experimentos de *current clamp* com células  $\beta$  pancreáticas isoladas de camundongos transgênicos mKir6.2-V108E, uma mutação pontual para resíduo que difere do canal humano, demonstraram que a toxina SpTx1 a 200 nM foi capaz de provocar a despolarização da membrana devido ao bloqueio do canal  $K_{ATP}$  (Ramu et al., 2022). A toxina associada ao alto nível de glicose no sangue (16,7 mM) potencializou a secreção de insulina, além de demonstrar que em camundongos diabéticos <sup>Rosa26</sup>mKir6.2<sup>NDM-V108E</sup> causa aumento da secreção de insulina e diminuição dos níveis de glicose, confirmando o potencial farmacêutico de bloqueadores de canais  $K_{ATP}$  (Ramu et al., 2022). As toxinas Ocyc9 e Omtx2 não apresentaram afinidade pelo canal  $K_{ATP}$  e não foi detectada modulação de atividade (Sarmiento, 2019).

As ilhotas pancreáticas apresentam inervações parassimpáticas que liberam acetilcolina, modulando a secreção de insulina (Ahrén, 2000). Nas células  $\beta$  pancreáticas são encontrados receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina, entre os nicotínicos são descritas subunidades principais  $\alpha3$ ,  $\alpha4$ ,  $\alpha5$ ,  $\alpha7$  e as auxiliares  $\beta2$  e  $\beta4$  (Yoshikawa et al., 2005). A ausência do receptor de nicotínico de acetilcolina  $\alpha7$  em camundongos *knock-out*  $\alpha7^{-/-}$  parece ser um fator para indução de estados pré-diabéticos, com resistência à insulina e o aumento de massa corpórea (Gausserès et al., 2020). Os receptores nicotínicos  $\alpha7$  e  $\alpha3\beta4$

não foram modulados pelas toxinas Ocyc9 e Omtx2 na concentração de 10  $\mu$ M (Figura 24 e 25).

O bloqueio dos canais  $K_{ATP}$  provoca aumento na resistência de membrana (*Input resistance*), isso significa que pequenas correntes transientes podem ter efeitos sobre a voltagem de membrana, dentre essas correntes um dos possíveis agentes no modulares são os canais TRP (Colsoul et al., 2012). Os canais TRP são canais catiônicos capazes de despolarizar membranas frente a estímulos de ligantes, voltagem, temperatura ou mecânico, por esse motivo são considerados um dos grandes sensores fisiológicos (Gees et al., 2012). Nas células pancreáticas de camundongos e ratos, são descritos os TRP vanilóide V1, TRPV2 e V4, os canônicos C1, C2, C3, C4, C6, os melastina M2, M3, M4 e M5 e o anquirina A1 (Islam, 2011; Cao et al., 2012). As toxinas Ocyc9 e Omtx2 não apresentaram atividade na concentração de 10  $\mu$ M nos canais TRPV1 e TRPA1 (Figura 30 e 31).

Um dos fármacos que trouxeram muitas notícias nos últimos anos relacionado ao emagrecimento foram os agonistas do receptor de GLP-1 (Peptídeo similar a glucagon), como por exemplo o exanatida (Byetta) e a semaglutida (Ozempic), que induzem a secreção de insulina e suprimem a secreção de glucagon, prescritos para pacientes com diabetes do tipo dois (Yang and Yang, 2024). Além dos efeitos diretos sobre o metabolismo de glicose é reportado que ativação de receptor GLP-1 aumenta a frequência de disparos de neurônios dopaminérgicos em modelos parkinsonianos (Liu et al., 2024), além do efeito inibitório da exanatida nos canais  $K_v1.5$  e  $Na_v1.5$ , efeito associado ao potencial uso cardioprotetor em fibrilação atrial (Zhou et al., 2024).

## 1.7 - Conclusão

Com os resultados obtidos nesta tese e em trabalhos prévios compreende-se que as toxinas Ocyc9 e Omtx2 em concentrações até 10  $\mu$ M não modulam a secreção de insulina por meio da interação com canais iônicos. Sarmiento (2019) demonstrou ausência de efeitos nos canais  $K_v1.3$ ,  $K_v2.1$ , BK (KCa1.1), KATP (KIR6.2 / SUR 1),  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3s$ . No presente trabalho, também mostramos a ausência de efeito nos canais  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$ ,  $K_v1.4$ ,  $K_v1.5$ ,  $K_v1.6$ ,  $K_v4.2$ ,  $K_v4.3$ ,  $K_v7.1$ ,  $K_v7.2$ ,  $K_v7.5$ ,  $K_v7.5$ ,  $K_v10.1$ ,  $K_v11.1$ , TRPA1, TRPC1, nAchr  $\alpha 7$  e  $\alpha 3\beta 4$ ,

ENaC, Nav1.3, Nav1.5, Nav1.7 e Nav1.8. Acreditamos que os resultados reportados mostrando a modulação da secreção de insulina em ilhotas do pâncreas de camundongos só poderiam ser explicados pelas  $\kappa$ -KTx Ocyc9 e Omtx2 quando em concentrações próximas a 500  $\mu$ M.

As  $\kappa$ -KTx foram consideradas em diversos trabalhos como bloqueadores de poro iônicos com capacidade de alterar mecanismos de *gating* devido ao atraso nas cinéticas de ativação, entretanto até o presente momento não havia sido demonstrada seus efeitos em alterar a dependência de voltagem. No presente trabalho, as toxinas Ocyc9 e Omtx2 foram avaliadas na concentração de 500  $\mu$ M e foi descrita a inibição de corrente associada com o deslocamento da probabilidade de abertura, indicando um mecanismo de *gating*.

Possivelmente, as  $\kappa$ -KTx interagem com o domínio do poro iônico, entretanto com maior afinidade ao vestíbulo externo do poro iônico como os epítomos das alfas hélices S5 e S6, assim como sugerido por Chagot et al. (2005). O deslocamento da probabilidade de abertura para potenciais mais positivos indica que o canal iônico necessita de maiores variações de voltagem para a abertura, logo, sugerindo que as  $\kappa$ -KTx moduladoras estabilizam os canais iônicos em conformação fechada, dificultando a transição para o estado aberto.

## 1.8 – Perspectivas futuras Capítulo 1

- Caracterização da interface de interação de  $\kappa$ -KTx e canais de potássio dependentes de voltagem.

- Registro do padrão de despolarizações na configuração *current clamp* do potencial de membrana de células beta pancreáticas na presença de  $\kappa$ -KTx.

## Capítulo 2 – Anestésicos e canais iônicos, seletividade dentro da inespecificidade

### 2.1 - Introdução capítulo 2

#### Anestesia geral

A prática empírica da anestesia data antes de 1846, mas foi nesse ano que foi realizada a primeira cirurgia oficial com anestesia geral, realizada por Willian Morton com a utilização de éter sulfúrico puro (Robinson and Toledo, 2012). Anteriormente outras metodologias eram utilizadas para “enganar” a dor, como, por exemplo, hipnoses (Facco, 2016), ingestão de álcool, extratos de plantas sedativas (Safford, 1915) e acupuntura (Jin et al., 2017). Apesar de ser considerada uma das maiores revoluções da medicina moderna, o mecanismo de ação da anestesia geral continua sem explicação (Pardo, 2018).

Anestesia geral é uma condição neurofisiológica induzida farmacologicamente em que é alcançada a inconsciência, amnésia, analgesia e a imobilidade do paciente (Ishizawa, 2007). Cada uma das condições clínicas ocorre com aumento progressivo da concentração dos anestésicos, sendo a primeira observada a perda da memória, seguido da perda da consciência, analgesia e por último a imobilização – dependendo do agente anestésico os graus ocorrem sobrepostos (Antognini and Carstens, 2002).

Compostos anestésicos não atuam apenas em vertebrados, como observado por Claude Bernard (1813-1878), com seu paradigma que propôs que a vida é definida pela sensibilidade à anestesia e que apenas organismos vivos poderiam ser anestesiados (Perouansky, 2012). Desde organismos unicelulares são observadas a imobilização e a insensibilidade a estímulos químicos, efeitos potencialmente associados à modulação de canais iônicos (Kelz and Mashour, 2019).

Plantas apresentam sensibilidade a anestésicos e perdem a capacidade de responder a estímulos, como, por exemplo, na planta carnívora *Mimosa pudica*, que deixa de detectar a presença de moscas em sua armadilha (Grémiaux et al., 2014; Yokawa et al., 2019).

Existem diferentes tipos de anestesia utilizadas na clínica, a anestesia geral como comentado anteriormente; a local que consiste na aplicação de agentes no local do procedimento (Pardo, 2018, chap. 10), com mecanismo de ação definido pelo bloqueio dos poros iônicos dos canais de sódio dependentes de voltagem (Hille, 1977), provocando a anestesia. A terceira anestesia é a regional ou bloqueio regional, na qual um anestésico local é aplicado em regiões próximas a nervos e promove a anestesia em toda a região descendente, como a anestesia epidural e o bloqueio de nervos periféricos (Pincus, 2019).

Estudos epidemiológico indicaram uma taxa de mortalidade associada ao uso da anestesia geral entre 1-4 óbitos a cada 10.000 procedimentos entre 1940 e 1990 (Nocite, 1991). O aprimoramento das metodologias de utilização dos anestésicos gerais e a descoberta de novos agentes promoveram a redução dessa taxa, com 0.4 óbitos a cada 100.000 procedimentos (Gottschalk et al., 2011).

Mesmo com todo o sucesso na utilização de anestésicos gerais efeitos adversos ocorrem, em sua maioria cardiovasculares e respiratórios, durante o procedimento e pós operatórios como náuseas, vômitos, taquicardia, choros, espasmos, hiperreflexia, hipertermia maligna e raramente neurotoxicidade (Pardo, 2018, chap. 12). Os anestésicos gerais estão entre os fármacos mais perigosos para uso, com índices terapêuticos ( $LD_{50}/ED_{50}$ ) entre 2 e 4 (Brunton and Knollmann, 2023, chap. 24), indicando que pequenas diferenças na concentração durante os procedimentos podem levar a efeitos adversos.

Foi relatada pelo FDA, em 2016, a possibilidade da associação entre exposições repetidas ou prolongada a anestesia no final da gravidez ou antes do três anos com o desenvolvimento neuronal de crianças (Davidson and Sun, 2018). Os fatores não são totalmente esclarecidos, mas existem indicações para neuro-inflamação, estresse oxidativo, alteração na plasticidade sináptica por redução da proteína estrutural do *cluster* de receptores PSD-95 "*postsynaptic density protein 95*" e o efeito excitatório de GABA<sub>A</sub> durante o desenvolvimento neuronal (Niu et al., 2022).

### **Mecanismo moleculares propostos para a interação de anestésicos gerais**

Meyer e Overton propuseram que a potência dos anestésicos inaláveis estava correlacionada com a lipofilicidade (Missner and Pohl, 2009), ou seja, quando maior o

coeficiente de partição óleo:água, maior o potencial narcótico (Figura 36), indicando um efeito direto nas membranas fosfolipídicas. Os estudos de Claude Bernard sobre a indicação de um mecanismo único para funcionamento dos anestésicos gerais (Perouansky, 2012) e a descoberta da correlação da potência do anestésico e o particionamento em solventes lipídicos (Missner and Pohl, 2009) guiaram por muitos anos a conclusão que os anestésicos gerais interagem com as membranas de neurônios.

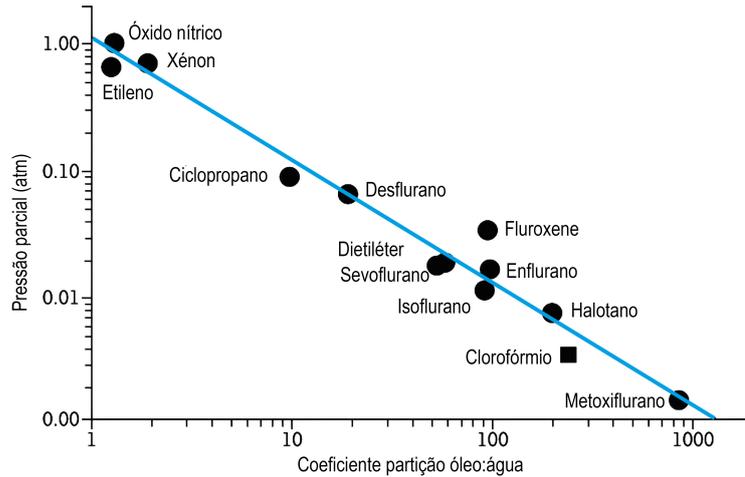


Figura 36 - Correlação de Meyer-Overton para anestésicos inaláveis. Figura adaptada (Campagna and Forman, 2003)

O estudo de Nicholas Franks e Willian Lieb, em 1984, com a demonstração da inibição por anestésicos da fluorescência da proteína fluorescente luciferase em solução aquosa (Franks and Lieb, 1984) mudou a percepção dos possíveis mecanismo de ação, mudando o foco para possíveis receptores proteicos.

Um fator que confronta a teoria de Meyer-Overton é a incapacidade anestésica álcoois de cadeia longas, com a adição de grupos metílenos ocorria a perda da atividade anestésica, mesmo se tornando mais lipossolúveis (Raines et al., 1993).

Outro fator que rebate a teoria de Meyer-Overton é a existência de estereoseletividade dos anestésicos, ou seja, um dos enantiômeros apresenta maior potência, demonstrando que moléculas com o mesmo coeficiente de partição óleo:água agem de forma diferente (Weiskopf et al., 2002). Um exemplo é a modulação em magnitudes diferentes dos canais Kv por S(+) Isoflurano e R(-) Isoflurano (Franks and Lieb, 1994). No uso clínico, são utilizadas misturas racêmicas (Pardo, 2018).

A teoria sobre o efeito em membranas não foi totalmente descartada. Foi demonstrada a perturbação por anestésicos locais e gerais de barcas lipídicas - *Lipid Rafts* (Krogman et al., 2024), que são domínios lipídicos de 10-200 nm ordenados nas membranas celulares ricas em colesterol e esfingolipídios (Pike, 2006).

## **Receptores de membrana envolvidos com anestesia geral**

### **GABA<sub>A</sub>**

O receptor do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) do tipo A, denominado GABA<sub>A</sub>, é um canal dependente de ligante da família Cys-loop com seletividade para o íon cloreto e sua abertura é associada com a hiperpolarização da membrana celular e sinapses rápidas inibitórias (Kim and Hibbs, 2021). O receptor GABA<sub>A</sub> é alvo molecular de fármacos anestésicos gerais, antidepressivos e ansiolíticos (Sieghart and Savić, 2018).

Um dos fatores da neurotoxicidade dos anestésicos gerais em cérebros em desenvolvimento ocorre devido a uma maior expressão do co-transportador NKCC1 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>) em relação ao outro co-transportador KCC2 (K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>), que induz alteração no potencial de reversão do íon cloreto devido à maior concentração intracelular (Ben-Ari, 2002). A ativação do receptor GABA<sub>A</sub> por anestésicos em cérebros imaturos promove o efluxo de íon cloreto, promovendo a despolarização da membrana e caracterizando uma ação excitatória (Ben-Ari, 2002).

Diversos anestésicos gerais atuam nos receptores GABA<sub>A</sub> (McGrath et al., 2020), como, por exemplo, isoflurano, sevoflurano, propofol e halotano (Brohan and Goudra, 2017; Kim and Hibbs, 2021), modulando positivamente sua ativação e promovendo a hiperpolarização da membrana de neurônios (Zhou, 2012).

### **Receptor de Glicina - GlyR**

A glicina e seu receptor (GlyR) são os principais responsáveis pelas sinapses inibitórias na medula espinhal, tronco cerebral e cérebro caudal, com função de inibir neurônios motores e sensoriais (Dutertre et al., 2012). Os receptores GlyR são pentâmeros da família dos Cys-loops, assim como os receptores GABA<sub>A</sub> e formam poros permeáveis a cloreto (Langosch et al., 1988). Os receptores GlyR são associados com a percepção da dor e

mutações que promovem a perda da função diminuem o limiar para a sensação da dor (Vuilleumier et al., 2018). Anestésicos inalatórios como sevoflurano potencializaram correntes de cloreto inibitórias proveniente dos receptores de glicina em neurônios da medula espinhal (Eckle et al., 2013).

### **Receptor de Glutamato Ionotrópico – NMDA**

Os receptores de glutamato ionotrópicos são divididos em três grupos: receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores de AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) e receptores de Cainato (Cull-Candy et al., 2001). Esses receptores são envolvidos com sinapses excitatórias devido à sua seletividade a cátions, em particular aos íons de cálcio em receptores de NMDA (Alexander et al., 2023), envolvidos na transmissão de sinapses excitatórias, plasticidade neuronal e excitotoxicidade (Cull-Candy et al., 2001).

Os receptores AMPA e Cainato apresentam baixa sensibilidade aos anestésicos gerais, por outro lado o receptor NMDA é um dos alvos moleculares descritos (Franks, 2008). Os anestésicos que atuam no receptor de NMDA induzem o bloqueio do receptor, prevenindo a despolarização de neurônios.

### **Canais $K_{2P}$**

Os canais de potássio com dois domínios de poro ( $K_{2P}$ ) são estruturados em quatro domínios transmembrânicos (4TM) e apresentam duas reentrâncias de p-loop (Enyedi and Czirják, 2010). São canais sensíveis a diferentes estímulos para a abertura, como temperatura, pH, mecânicos, potencial de membrana, segundo-mensageiros (Enyedi and Czirják, 2010) e são responsáveis pelas condutâncias de potássio de “Background”, que atuam diretamente no estabelecimento do potencial de membrana durante o repouso.

Agentes anestésicos demonstraram capacidade de ativar estes alguns canais da família  $K_{2P}$ , como halotano, clorofórmio e isoflurano (Zhou, 2012), que levam a abertura dos poros iônicos, promovendo a diminuição da resistência de membrana, hiperpolarização e, por fim, dificuldade da geração de potenciais de ação. Animais knockout do canal  $Trek1$ -/- apresentam maior resistência a indução anestésica por clorofórmio, halotano, sevoflurano, desflurano e pentobarbital (Heurteaux et al., 2004).

## Canais de potássio dependentes de voltagem (K<sub>v</sub>)

Os efeitos de anestésicos gerais sobre os canais de potássio dependentes de voltagem são demonstrados desde o primeiro canal mutante clonado de *Drosophila*, onde a mosca apresentava tremores nas pernas sobre anestesia de éter (Salkoff and Wyman, 1981; Tempel et al., 1987).

A família dos canais de potássio dependentes de voltagem é a mais diversa entre os canais existentes, possuindo papéis essenciais no controle da excitabilidade neuronal (Gamper and Wang, 2021). As regiões de expressão dos K<sub>v</sub> nos neurônios centrais são atualmente bem descritas (Vacher et al., 2008), com a família Kv1 predominante nos axônios e terminais nervosos (Jan and Jan, 2012), essenciais para a regulação dos disparos e padrão dos potenciais de ação.

Microinfusão de anticorpos anti K<sub>v</sub>1.2 (Alkire et al., 2009) e de uma toxina bloqueadora específica de Kv1 (Lioudyno et al., 2013) no núcleo medial talâmico, responsável por suprimir a excitabilidade durante a anestesia, foram capazes de reverter momentaneamente o estado inconsciente de camundongos anestesiados com Sevoflurano.

Os canais Shaker B, K<sub>v</sub>1.2 e K<sub>v</sub>1.5 demonstraram sensibilidade a sevoflurano 1 mM, com potencialização das correntes (Barber et al., 2012). Em concentrações menores (0,2 mM) sevoflurano também induziu redução no pico da corrente em K<sub>v</sub>1.4 e K<sub>v</sub>1.5, além de confirmar o efeito potencializador em K<sub>v</sub>1.1 e K<sub>v</sub>1.2 (Lioudyno et al., 2013).

O canal K<sub>v</sub>1.2 é modulado de forma dose-dependente por sevoflurano, apresentando dois mecanismos separados, aumento de condutância e facilitação probabilidade de abertura em voltagens mais negativas (Liang et al., 2015). Os dois efeitos ocorrem devido a mecanismo moleculares distintos e em sítios alostéricos diferentes, sendo um dependente de voltagem envolvendo o linker S4-S5 e a alfa hélice s6 e o segundo independente de voltagem envolvendo uma região externa próxima ao filtro de seletividade (Woll et al., 2017).

Estudos baseados na ideia que os anestésicos gerais atuam no processo da transdução mecânica da dependência de voltagem e abertura do poro iônico avaliaram mutações no *linker* S4-S5 no canal K-Shaw2 (Harris et al., 2000; Barber et al., 2011). A

inserção do *linker* S4-S5 de K-Shaw2 no canal  $K_v1.2$  (intitulado  $K_v1.2$ -FRAKT) nas posições 319-329 aumenta a capacidade potencializadora do sevoflurano sobre o canal (Liang et al., 2015), além de tornar sensível a propofol. Substituições individuais dos resíduos do *linker* S4-S5 demonstraram que a substituição pontual G329T ( $K_v1.2$ -G329T) conferiu a capacidade de ser potencializado por sevoflurano (Liang et al., 2015). Junto com as informações citadas anteriormente Liang et al demonstrou a criação de um modelo mínimo com  $\Delta T1$ - $K_v1.2$  e  $\Delta T1$ - $K_v1.2$ -G329T para o estudo da interação de anestésicos (Liang et al., 2015).

### **Canais de sódio dependentes de voltagem ( $Na_v$ )**

Os canais  $Na_v$  são os principais responsáveis por detectar pequenas variações na voltagem de membrana e permitir a despolarização total da membrana por gerar a fase ascendente dos potenciais de ação na maioria dos tecidos (Hille, 2001).

Dentre as nove isoformas de canais  $Na_v$ , oito são expressas e detectadas no sistema nervoso central (Wang et al., 2017a). As isoformas  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$  e  $Na_v1.6$  são amplamente expressas no cérebro (Wang et al., 2017a), como  $Na_v1.1$  predominante nos corpos celulares e segmentos iniciais do axônio, enquanto  $Na_v1.2$  é expresso em dendritos e axônios (Westenbroek et al., 1989) e  $Na_v1.3$  com expressão no soma e dendritos (Vacher et al., 2008).  $Na_v1.5$  foi inicialmente detectado no miocárdio e associado como específico desse tecido, entretanto estudos posteriores demonstraram a expressão no cérebro de ratos e mRNA em neurônios corticais humanos (Donahue et al., 2000), além do subsequente registro de correntes em neurônio piramidais da camada 5 no lóbulo frontal (Wang et al., 2017b).  $Na_v1.6$  no sistema nervoso central, em maior densidade nos nodos de Ranvier, do sistema nervoso central e periférico (Caldwell et al., 2000), demonstrando a importância desse canal para a condução dos potenciais de ação. As subunidades  $Na_v1.7$ ,  $Na_v1.8$  e  $Na_v1.9$  são expressas predominantemente no sistema nervoso periférico, como os gânglios da raiz dorsal e estão associados com a nocicepção (Bennett et al., 2019).

Os anestésicos gerais, tanto inalatório e intravenosos, atuam em canais  $Na_v$  reduzindo a amplitude das correntes e alterando a disponibilidade de canais devido hiperpolarização em curvas de *steady-state inactivation* (Herold and Hemmings Jr., 2012; Zhou, 2012).

Canais de sódio bacteriano (NaChBac) também são sensíveis a sevoflurano em concentrações clínicas, demonstraram efeitos excitatórios e inibitórios na presença de sevoflurano (Barber et al., 2014). Em baixa concentração foi observado características excitatórias, com aumento da amplitude de corrente e facilitação da probabilidade de abertura com variação para potenciais mais hiperpolarizados concentração de 0.2 mM, todavia na concentração de 2 mM foi observado a inibição de corrente com aceleração na cinética de inativação rápida (Barber et al., 2014).

### **Os agentes anestésicos utilizados neste estudo**

Os anestésicos gerais atualmente são classificados em dois grandes grupos devido ao método de administração, podendo ser voláteis e aplicados via inalação ou serem administrados intravenosamente (Pardo, 2018). A diversidade estrutural das moléculas com capacidades anestésicas é uma das indicações da ausência de receptor específico que induz a inconsciência terapêutica, desde moléculas pequenas como gases inertes (Giacalone et al., 2013) até grandes moléculas como a alfa-cloralose (Ishizawa, 2007).

#### **Anestésicos voláteis**

A maioria dos gases voláteis propostos como agentes anestésicos eram inflamáveis/explosivos. Devido a isso, a halogenação de carbonos foi proposta para a redução da inflamabilidade, dentre esses compostos foi gerado o halotano, com introdução na clínica em 1956. Todavia seu uso foi associado à falência do fígado (Robinson and Toledo, 2012).

A pressão parcial dos gases anestésicos ao final da expiração pulmonar (*end-tidal*), ou seja a pressão alveolar, é a mesma pressão parcial no cérebro durante a anestesia, conceito definido por Seymore S. Kety (1915–2000) (Pardo, 2018). Essa definição foi essencial para a caracterização do MAC (*Minimum alveolar concentration*), que é a concentração do anestésico na expiração que permite a imobilização de 50% dos pacientes frente a um estímulo nocivo (Eger et al., 1965).

Sevoflurano (Figura 37) foi sintetizado em 1975 (Wallin et al., 1975), com as características físico-químicas de ser incolor, volátil, não inflamável, ponto de ebulição de

58,6° C e solubilidade de 1,48 g/L (PubChem, 2024). Devido ao odor mais agradável em comparação a outros gases anestésicos e ausência de irritação nas vias respiratórias, pode ser utilizado em idosos, adultos e crianças, todavia existe uma variação no MAC entre esses grupos, sendo 3,3-2,5% para recém-nascidos e crianças, 2,05 % para adultos (Scheller et al., 1988) e 1,45% para idosos (De Hert and Moerman, 2015).

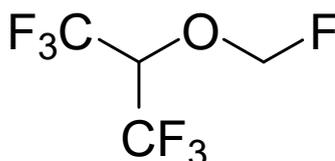
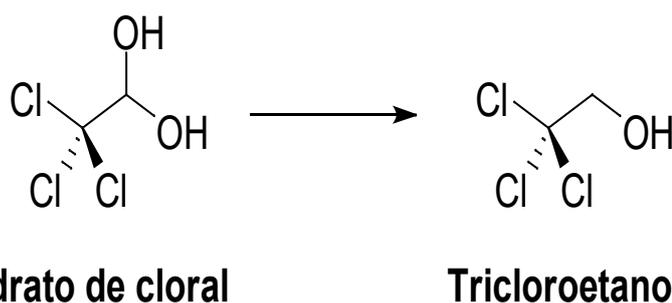


Figura 37 – Representação da estrutura molecular Sevoflurano.

### Anestésicos Injetáveis

O primeiro composto utilizado para anestesia intravenosa foi o hidrato de cloral (Figura 38) em 1872, administrado por Pierre-Cuprien (Robinson and Toledo, 2012). O Hidrato de Cloral, 2,2,2-trichloroethane-1,1-diol, foi sintetizado a primeira vez em 1832 (Liebig, 1832), e indicado inicialmente para o tratamento de insônia e, atualmente, recomendado para sedação moderada via oral em procedimentos não invasivos pediátricos (Fong et al., 2021), além de apresentar pouca interferência em leituras de EEG (Malviya et al., 1997).



**Hidrato de cloral**

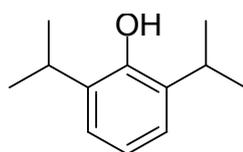
**Tricloroetanol**

Figura 38 - Conversão metabólica do hidrato de cloral em Tricloroetanol. Reação metabolizada *in vivo* pelo conjunto das enzimas álcool desidrogenases.

Trata-se de um fármaco sedativo hipnótico não opioide, não benzodiazepínico e possui como metabólito ativo o 2,2,2-Tricloroetanol (TCE), produto da ação enzimática de álcool desidrogenases (Figura 38).

Posteriormente, foram testados outros agentes intravenosos, como barbitúricos, morfina associada com escopolamina e tiopental de sódio. Até que, em 1977, quando o propofol foi desenvolvido (Kay and Rolly, 1977) e revolucionou com o desenvolvimento da técnica conhecida como TIVA - *Total intravenous anesthesia*, sem a necessidade do auxílio de gases voláteis para alcançar a anestesia geral (Robinson and Toledo, 2012).

O propofol, 2,6 diisopropilfenol (Figura 39), é um anestésico exclusivamente intravenoso, utilizado para indução e manutenção da anestesia, além de não induzir náuseas (Pardo, 2018). Utilizando amplamente devido à sua indução e recuperação rápida, com tempo de meia vida de aproximadamente 10 minutos em perfusões de três horas e até 30 minutos em perfusões de oitos horas (Bateman and Kesselheim, 2015; Pardo, 2018).



**Propofol**

Figura 39 – Representação da estrutura molecular do Propofol; 2,6 diisopropilfenol

Os alvos moleculares dos anestésicos propofol, sevoflurano e tricloretanol estão resumidos na tabela 13.

Tabela 13 - Alvos moleculares dos anestésicos. LGIC – sigla em inglês para canais iônicos dependentes de ligantes; VGIC - sigla em inglês para canais iônicos dependentes de voltagem. I – Inibidor, A – Ativador.

Agente	LGIC	Referência	VGIC	Referência
Propofol	GABA (A)	(McGrath et al., 2020)	Kv1.2-G329T (A)	(Bu et al., 2018)
	NMDA (I)	(Yamakura et al., 1995)	Kv1.2-FRAKT (A)	(Liang et al., 2015)
	GlyR (A)	(Moraga-Cid and Peoples, 2011)	Kv1.5 (I)	(Kojima et al., 2015)
			Kv2.1 (I)	(Zhang et al., 2016)
			K-Shaw (A)	(Liang et al., 2015)
			Kv11.1 (I)	(Han et al., 2016)
			BK (A)	(Klockgether-Radke et al., 2004)
			TRPV1 (A)	(Fischer et al., 2010)

			TRPA1 (A)	(Fischer et al., 2010)
			NavMS (I)	(Yang et al., 2021)
			NaChBac (I)	(Yang et al., 2018)
			Nav1.4 (I)	(Haeseler et al., 2001)
			Nav1.4-R1448H (I)	(Haeseler et al., 2001)
			HCN1 (I)	(Cacheaux et al., 2005)
			HCN2 (I)	(Cacheaux et al., 2005)
			HCN3 (I)	(Cacheaux et al., 2005)
<b>TCE</b>	GABA <sub>A</sub> (A)	(Krasowski and Harrison, 2000)	TREK-1 (A)	(Harinath and Sikdar, 2004)
	5-HT3 (A)	(Lovinger and Zhou, 1993)	TRAAK (A)	(Harinath and Sikdar, 2004)
	GlyR (A)	(Krasowski and Harrison, 2000)	BK (A)	(Gruss et al., 2002)
	AMPA (I)	(Fischer et al., 2000)	I <sub>Na+</sub> TTX <sub>R</sub> (I)	(Kim et al., 2023)
	NMDA (I)	(Scheibler et al., 1999)	mitoK <sub>ATP</sub> (A)	(Zaugg et al., 2002)
<b>Sevoflurano</b>	GABAA (A)	(Woll et al., 2018)	Kv1.1 (A)	(Lioudyno et al., 2013)
	GlyR (A)	(Downie et al., 1996)	Kv1.2 (A)	(Barber et al., 2012)
	NMDA (I)	(Hollmann et al., 2001)	Kv1.2-G329T (A)	(Liang et al., 2015)
	HCN rato (I)	(Schwerin et al., 2021)	KV1.2-FRAKT (A)	(Liang et al., 2015)
			Kv1.3 (A)	(Lioudyno et al., 2013)
			Kv1.5 (A)	(Barber et al., 2012)
			Kv1.4 (I)	(Lioudyno et al., 2013)
			Kv7.1 (I)	(Kim et al., 2007)
			Kv7.1 (I)	(Kim et al., 2007)
			K-Shaw (A)	(Liang et al., 2015)
			Nav1.2 (I)	(Rehberg et al., 1996)
			Nav1.4 (I)	(Yokoyama et al., 2011)
			Nav1.6 (I)	(Pal et al., 2015)
			Nav1.7 (I)	(Yokoyama et al., 2011)
			Nav1.8 (I)	(Yokoyama et al., 2011)
			NaChBac (I)	(Barber et al., 2014)

## 2.2 - Justificativa

A anestesia geral é considerada uma das maiores revoluções da medicina moderna, vencendo a barreira da dor e permitindo o avanço em processos cirúrgicos com procedimentos mais duradouros e precisos (Pardo, 2018), entretanto o mecanismo de ação não é completamente compreendido.

Canais iônicos dependentes de voltagem estão envolvidos em diversos processos celulares e, em maior importância para esse trabalho, com a capacidade de controlar o potencial de membrana, iniciar e propagar potenciais de ação e liberação de vesículas com neurotransmissores (Hille, 2001; Catterall et al., 2017).

Modelos para explicar o funcionamento de anestésicos gerais sugerem que o estado final da anestesia é obtido via a modulação de diversos receptores, ou seja, trata-se de um efeito devido à inespecificidade dos agentes, sendo os canais iônicos um dos alvos mais propostos tanto para o efeito final quanto os efeitos adversos (Franks, 2008; Herold and Hemmings Jr., 2012).

A compreensão dos efeitos em diversos canais iônicos é essencial para decifrar os mecanismos de ação envolvidos na anestesia geral. Devido a isso é proposto a caracterização da atividade dos anestésicos Propofol e Tricloroetanol em isoformas de canais de sódio, além do desenvolvimento de uma plataforma celular com características neuronais para estudo da influência de anestésicos e outros fármacos em canais iônicos específicos na excitabilidade celular.

## 2.3 - Objetivos

O Objetivo geral desse capítulo é a análise dos efeitos de anestésicos gerais sobre as correntes de canais iônicos dependentes de voltagem para compreensão das possíveis associações com a indução e manutenção da anestesia.

- Caracterização da atividade do Propofol nas isoformas de canais de sódio em concentração subclínica, na faixa de manutenção e saturante.
- Caracterização da atividade de Tricloroetanol a 5 mM nas isoformas de canais de sódio e na isoforma de canal de potássio Kv1.2 e o mutante Kv1.2-FRAKT
- Desenvolvimento de um modelo celular SH-SY5Y para estudos de anestésicos gerais e avaliação do modelo celular com a utilização de Sevoflurano.

## **2.4 - Metodologia**

### **2.4.1 - Cultivo celular e diferenciação células SH-SY5Y**

A linhagem de neuroblastoma humano (ATCC SH-SY5Y), que possui características de neurônios prematuros, foi cultivada em meio DMEM/F12 (1:1), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100 µM de penicilina/estreptomicina.

As células foram mantidas em uma incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após plaqueamento de células SH-SY5Y não-diferenciadas em placas de petri pré-tratadas com colágeno, as células foram tratadas com 10 µM de ácido retinoico diluído em meio Glutamax, suplementado com 15% de SFB, a cada dois dias, por seis dias. Após este período, foi adicionado 12,5 ng/ml de *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) e, após 24 horas, as células foram usadas para experimentação.

### **2.4.2 – Genes transfectados**

Para a expressão dos canais murinos K<sub>v</sub>1.2-WT e K<sub>v</sub>1.2-FRAKT foi utilizado o vetor pcDNA3.1(-). O inserto para expressão do canal K<sub>v</sub>1.2-WT escolhido foi a ORF principal da sequência de referência NCBI NM\_008417. O inserto para a expressão de K<sub>v</sub>1.2-FRAKT foi construído a partir da ORF de NM\_008417 com as modificações pontuais necessárias. Os genes foram obtidos comercialmente.

Foi realizada a transformação bacteriana de *E.coli* DH10B foram transformadas com vetores de interesse e selecionadas com a resistência a ampicilina conferida pelo vetor pcDNA3.1(-). Para a utilização dos vetores de expressão em etapas subsequentes foi realizada uma extração plasmidial em larga escala (Maxi-prep) com o KIT PureLink™ Expi Endotoxin-Free Maxi Plasmid Purification Kit (ThermoFisher) para a garantia da ausência de endotoxinas.

Os vetores foram transfectados em células HEK293T e SH-SY5Y utilizando lipofectamina 300, como previamente descrito nos métodos do capítulo 1, tópico 1.4.7, página 44.

### 2.4.3 – Patch Clamp Whole Cell

As correntes iônicas foram registradas com a técnica de *Patch Clamp* na configuração *Whole Cell* com um amplificador HEKA EPC 10 e controlado via *software* PatchMaster (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Alemanha). Experimentos foram realizados a temperatura ambiente (21 a 25° C). Pipetas de vidro borossilicato foram fabricadas imediatamente antes do uso com um *Puller* horizontal (Sutter Instruments, USA) e após o preenchimento com a solução interna foram detectadas resistências de pipeta entre 1,5 e 2,5 MΩ.

#### **Soluções de registros e protocolos de estímulo**

As correntes dos canais Na<sub>v</sub> em células HEK Na<sub>v</sub>1.1-Na<sub>v</sub>1.6 e CHO Na<sub>v</sub>1.7 foram registradas com a solução de preenchimento de pipeta constituída (mM) 105 CsF, 27 CsCl, 5 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES (pH ajustado para 7,3 com CsOH). As células foram banhadas em uma solução externa contendo (mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Glicose (pH 7,4). As correntes foram registradas com um protocolo *double-step* com a primeira parte do protocolo contendo um pulso de voltagem de duração de 30 ms com variação de voltagem em turnos de -100 até 30 mV, com acréscimo de 5 mV por *sweep* (Turnos), seguido imediatamente de uma segunda parte do protocolo com estímulo único de -10 mV por 10 ms.

As correntes dos canais K<sub>v</sub> foram registradas com uma solução de preenchimento de pipeta constituída (mM) de 140 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES, com pH 7.2 corrigido com KOH. A solução externa é constituída de (mM) 155 NaCl, 4,5 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES e pH 7.4 corrigido com NaOH. As correntes foram registradas com protocolo de variação de voltagem com pulsos com duração 50 ms a partir -70 mV até 80 mV com incrementos de 10 mV por *sweep*.

As correntes endógenas das células SH-SY5Y e SH-SY5Y diferenciada com ácido retinóico e BDNF (SH-SY5Y-RA) foram registradas com um conjunto de solução de preenchimento de pipeta e externa que permite o funcionamento dos canais condutores dos íons potássio, sódio e cálcio. A solução de preenchimento de pipeta é constituída de 140 KCl, 5 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 4 MgATP, com pH 7.3 corrigido com KOH. A solução externa é constituída 155 NaCl, 4,5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 Glicose, 5 HEPES com pH 7.4 corrigido com

NaOH. Para a inibição dos canais  $\text{Na}_v$  foi utilizado 300nM de tetrodotoxina e para a inibição de canais  $\text{K}_v$  foi utilizado 20 mM de Tetraetilamônio. As correntes foram registradas com protocolo de variação de voltagem com pulsos com duração 500 ms a partir -70 mV até 60 mV com incrementos de 10 mV por *sweep* com o potencial de repouso em -80 mV.

Os dados foram analisados assim como descritos no tópico 1.4.15 do capítulo 1, página 50.

Para o registro do potencial de membranas nas células SH-SY5H-RA as células foram forçadas a potenciais de repouso próximos a -80 mV com a injeção de -70 pA, processo necessário devido as células apresentarem um potencial de repouso próximo de -30 mV que inativaria os canais de sódio dependentes de voltagem. A indução dos potenciais de ação ocorreu com pulsos com incrementos por *sweep* de 5 pA até o valor máximo de 50pA, cada pulso durando 100 ms.

Para a análise dos potenciais de ação foi construído um script em linguagem python 3.12 e processado em um ambiente virtual Jupyter Notebook. Para a detecção do potencial de repouso foi analisada o valor do potencial de membrana 10 ms antes dos pulsos de estímulos. Um evento de potencial de ação foi considerado quando ocorre uma variação superior ou igual a 15 mV/ms, sendo esse ponto considerado o também o limiar de ativação. O valor pico do potencial de ação foi definido como o valor de amplitude máxima detectada após ocorrência de um evento de potencial de ação. O valor do potencial de membrana após repolarização foi definido como o valor mínimo detectado 20 ms após um potencial de ação.

As osmolaridades das soluções foram avaliadas com a utilização de um osmômetro de ponto de congelamento (KNAUER 7-400S) para garantir uma variação de osmolaridade menor que 30 mOsmol entre as soluções externa e solução de preenchimento de pipeta e evitar danos osmóticos na membrana celular.

### **Solubilização dos anestésicos em solução de experimento**

Propofol nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  foi preparado a partir da formulação medicamentosa Propofol®, que consiste em uma solução de Propofol 1%, 200 mg de Propofol em 20 mL de veículo contendo 10% óleo de soja, 1.2% de fosfatídeo de ovo purificado, 2.25% de glicerol, hidróxido de sódio e água.

O volume necessário para preparo das amostras foi adicionado a soluções externa para registro no patch clamp contendo 0.05% de DMSO para garantir a solubilidade do propofol. Soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

#### **2.4.4 – Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com o Software GraphPad versão 10. Para a comparação na variação entre duas médias observadas nas mesmas células após adição do anestésico foi utilizado o teste t pareado. Para a comparação se houve algum tratamento entre isoformas avaliadas foi utilizado o teste anova *one way* com pós teste de tukey.

#### **2.4.5 - Metodologia para perfusão de anestésico volátil Sevoflurano**

Sevoflurano (0,0250 g, 16,425  $\mu$ L) (densidade 1,522 g/L) foi adicionado a 50 mL solução externa de Patch Clamp para a composição de uma solução estoque de 2,5 mM (500 ppm) e utilizada para a formulação da solução de trabalho de 0,3 mM (60 ppm). As soluções de estoque e de trabalho foram preparadas imediatamente antes dos registros e amostras de um 1 mL foram recolhidas para quantificação posterior.

A solução de trabalho a 0,3 mM foi rapidamente adicionada em uma seringa Gas-Tight SGE de 25 mL com ausência de bolhas de ar e impulsionada com uma bomba de seringa para o fluxo de 0.5 mL/min. As vias de perfusão foram montadas com mangueiras de OD 0.3 mm (adicionar nome da marca de vias resistentes) e associadas com microfill (micropipetas flexíveis, microfill de Gauge 28) para aproximar a células durante o registro eletrofisiológico.

#### **2.4.6 - Quantificação de anestésicos voláteis – GC/MS Headspace**

1 mL de solução de trabalho após finalização dos registros foram armazenadas em frascos de 20 mL específicos para o equipamento de GC/MS (22.5 mm x 75.5mm, fundo redondo), lacradas com tampas de alumínio do tipo *crimp* revestidas em PTFE e submetidas a quantificação em GC/MS na configuração *Headspace*. Para as análises foi utilizado um GC/MS com cromatógrafo GC-2010, detector GCMS-QP2010 Plus e injetor AOC-5000 (Shimadzu, Japão). O forno para os frascos de analitos foi aquecido a 50°C, com agulha do

injetor a 55°C e coluna cromatográfica a 35°C. Foram injetados 250 µL de “ar Headspace”, com *Split-Ratio* de 10. O pico contendo Sevoflurano eluiu aos 1,67 min e sua área foi utilizada para quantificação e comparação com uma curva de calibração (Figura 40).

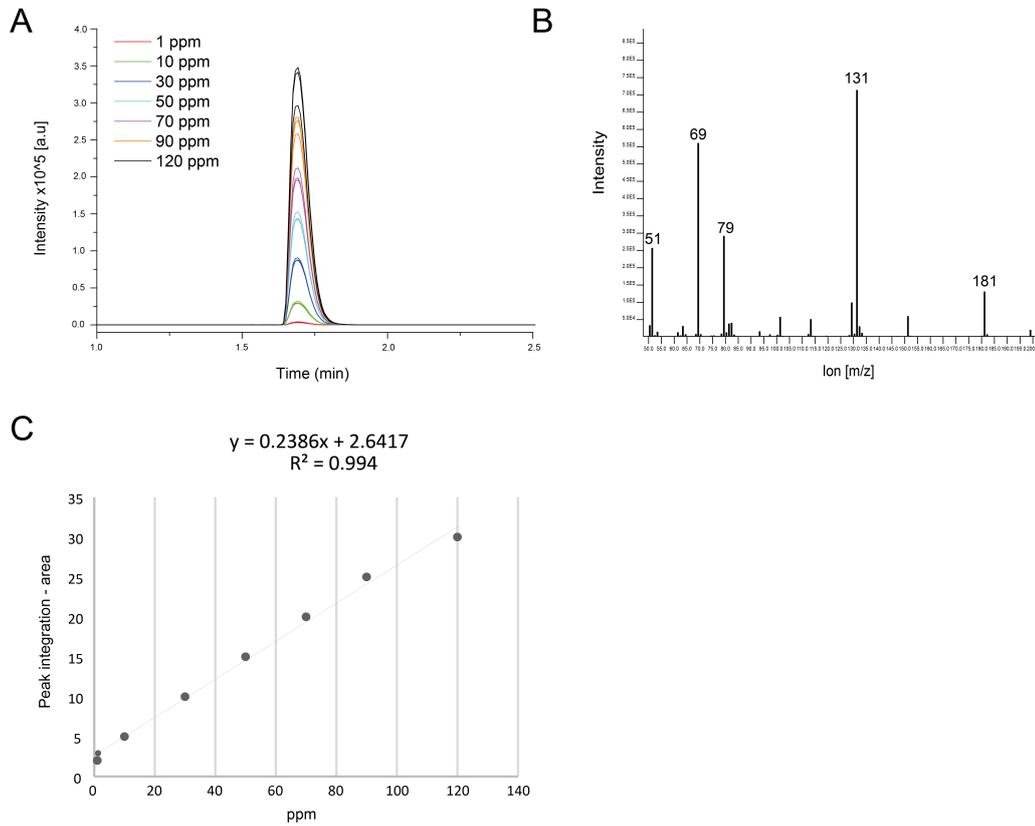


Figura 40 - Quantificação de Sevoflurano por CG/MS com injeção *Headspace*. (A) Cromatografia em fase gasosa dos padrões para curva de calibração. (B) Ion detectados na fração cromatográfica. (C) Curva de quantificação com os padrões.

## 2.5 - Resultados

### 2.5.1 – Modulação do funcionamento de isoformas de canais de sódio dependentes de voltagem por propofol.

Foi avaliada a capacidade do sedativo hipnótico propofol em modular o funcionamento das diferentes isoformas de canais de sódio dependentes de voltagem ( $Na_v1.1$  a  $Na_v1.7$ ) em concentrações definidas como subclínica ( $10 \mu M$ ), na faixa de manutenção de anestesia ( $30 \mu M$ ) e saturante ( $100 \mu M$ ). Foram analisados três parâmetros: A inibição do pico de corrente (Figura 41), a modulação na probabilidade de abertura durante a ativação (Figura 42) e modulação disponibilidade de canais na inativação (*Steady-state inactivation*) (Figura 44).

Em todos os subtipos de canais foi observado atividade de inibitória, sendo que, na concentração de  $10 \mu M$ , não houve diferença estatística entre os grupos testados. Todavia, é interessante ressaltar que em doses subclínicas de  $10 \mu M$  de propofol causaram um aumento na amplitude de corrente de  $5,16 \pm 2,73\%$  no canal  $Na_v1.4$ , enquanto, em todos os outros canais, foi observada inibição de corrente (Figura 42).

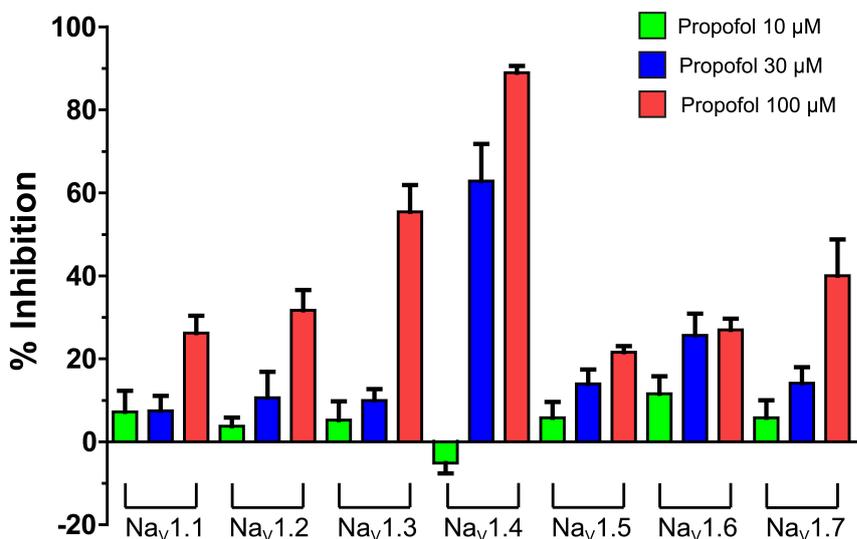


Figura 41 – Inibição do pico de corrente em canais de sódio dependentes de voltagem por Propofol em três concentrações. Dados apresentados como valores médios e barras de erro padrão.  $n \geq 3$  para todas as análises.

Na presença de 30  $\mu\text{M}$  de propofol, o efeito observado no canal  $\text{Na}_v1.4$  apresentou diferença estatística em relação aos demais canais (*anova one-way*,  $p < 0,0001$ ), com inibição de  $62,83 \pm 8,94\%$ . Na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , o canal mais afetado foi o  $\text{Na}_v1.4$  com inibição de  $88,94 \pm 1,62\%$ , seguido dos canais  $\text{Na}_v1.3$  com  $55,43 \pm 6,45\%$  e  $\text{Na}_v1.7$  com  $40,03 \pm 8,73\%$  (Tabela 14).

Propofol, nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , modulou a probabilidade de abertura entre 2-3 mV na maioria dos canais (Figura 43, Tabela 14). O canal  $\text{Na}_v1.4$  sofreu modulação na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , com deslocamento da probabilidade de abertura para potenciais mais negativos, caracterizando um aumento na excitabilidade, porém nas concentrações de 30 e 100  $\mu\text{M}$  foi observado um deslocamento para potenciais mais positivos, demonstrando uma diminuição na excitabilidade do canal (Figura 44)

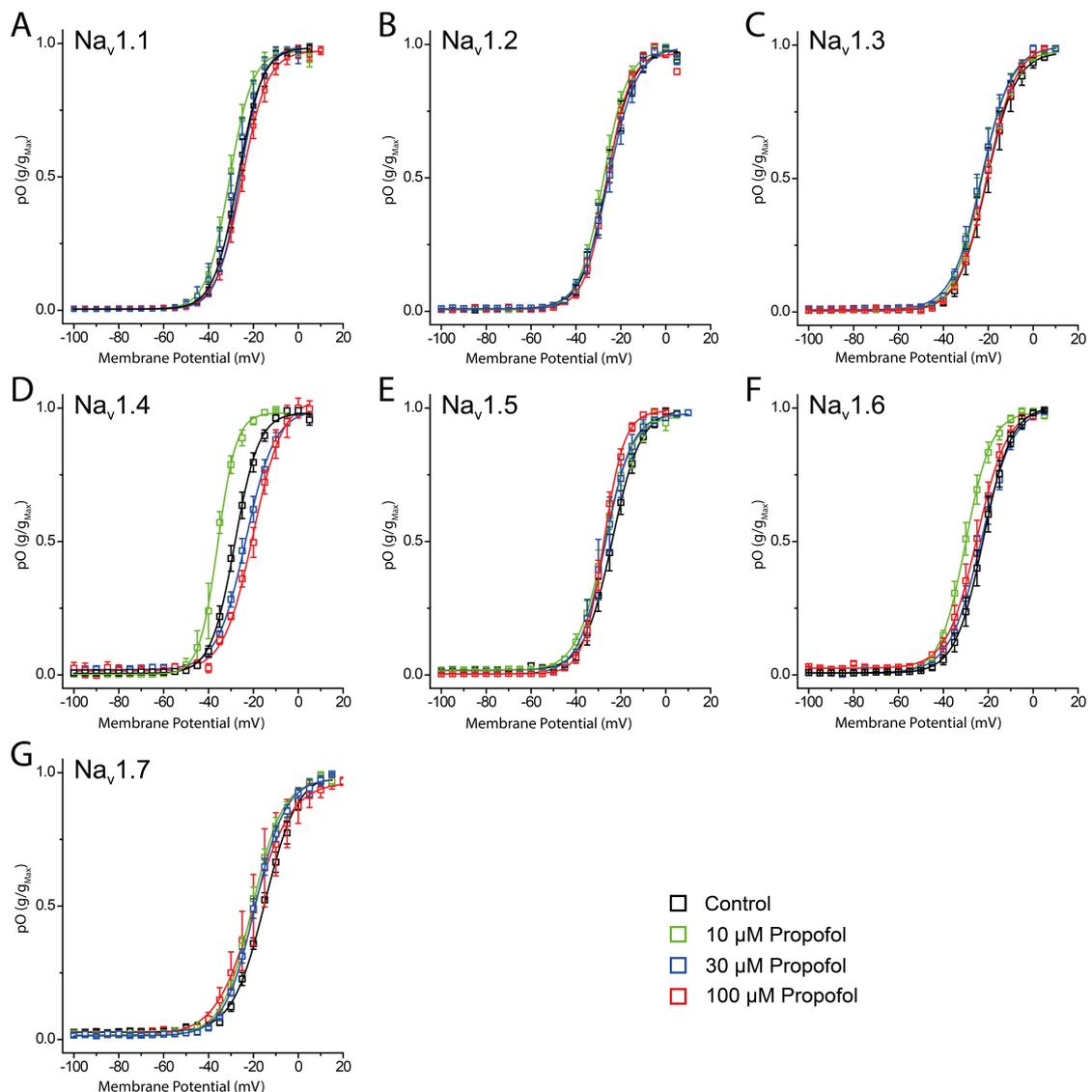


Figura 42 - Probabilidade de abertura durante ativação (pO) em subtipos de  $\text{Na}_v$  modulada por Propofol a 10  $\mu\text{M}$ . (A)  $\text{Na}_v1.1$ . (B)  $\text{Na}_v1.2$ . (C)  $\text{Na}_v1.3$ . (D)  $\text{Na}_v1.4$ . (E)  $\text{Na}_v1.5$ . (F)  $\text{Na}_v1.6$ . (G)  $\text{Na}_v1.7$ . Registros realizado com a técnica patch clamp Whole cell em células HEK e CHO

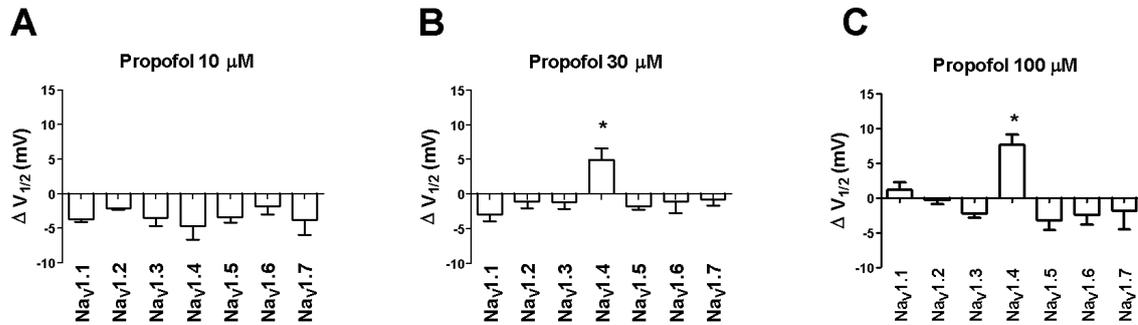


Figura 43 - Avaliação da variação do  $V_{1/2}$  nos canais de sódio dependentes de voltagem após aplicação de três concentrações de Propofol (10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ). Valores em média e barras de erros representam o erro padrão. Valores negativos representam o deslocamento do  $V_{1/2}$  para potenciais polarizantes, valores positivos representam o deslocamento para potenciais mais despolarizantes. (\*) Representa diferença estatística significativa em Anova com pós teste de Tukey 's em comparação a todas as médias.

A modulação promovida pelo Propofol nos canais  $\text{Na}_v$  tornou-se mais claro quando observado o resultado da disponibilidade de canais durante a inativação (SSI), com a deslocamento do valor de  $V_{1/2h}$  para valores mais negativos em todos os canais e concentrações. Na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , todos os canais tiveram o funcionamento modulado na mesma intensidade (Figura 45A) com variação entre 4 e 8 mV, já na concentração de 30  $\mu\text{M}$  houve diferença estatística no grau de modulação sofrida em  $\text{Na}_v1.4$ , com um  $\Delta V_{1/2h}$  de  $-21.55 \pm 2.85$  (Figura 45B, Tabela 14).

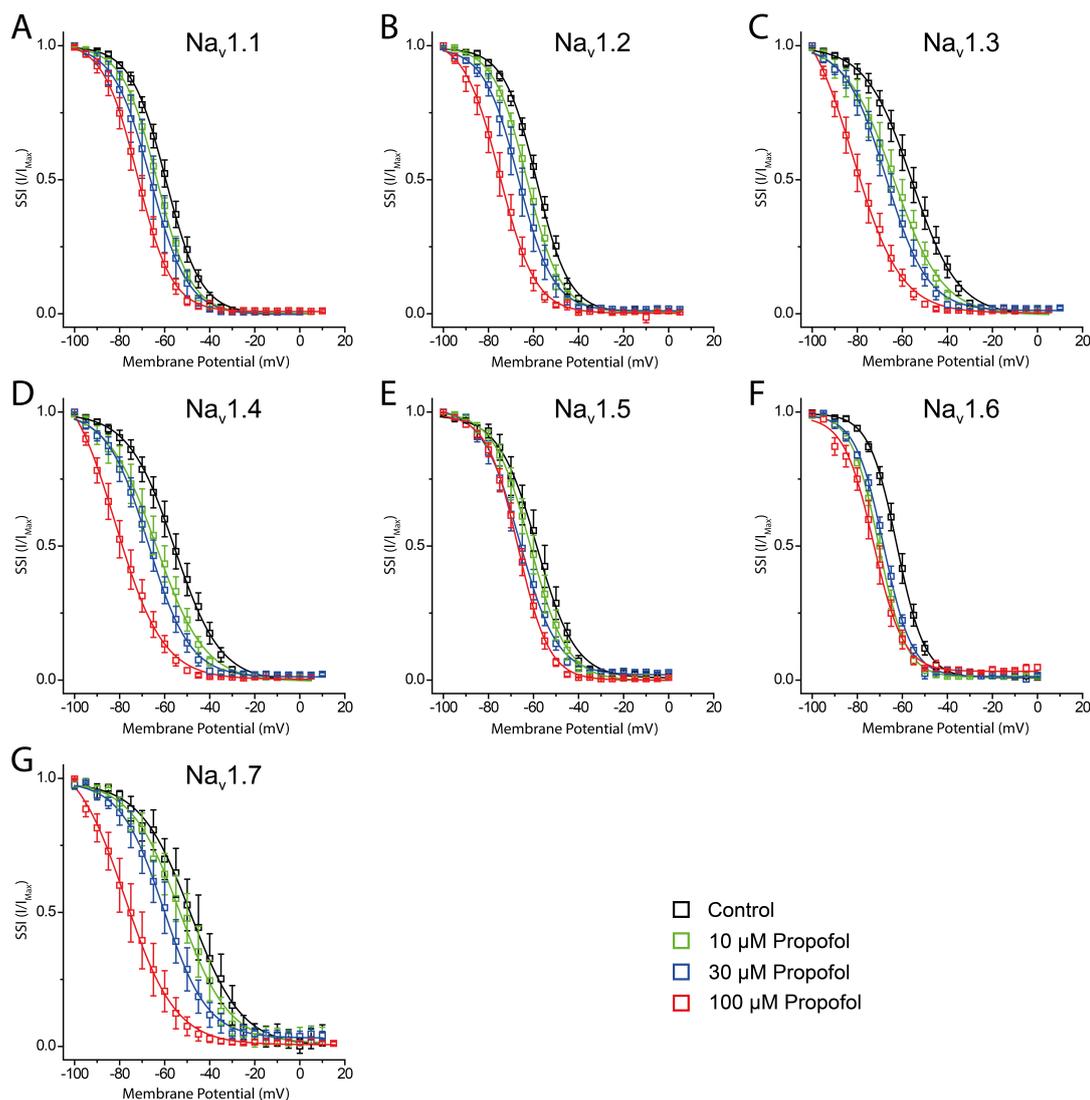


Figura 44 - Steady-State Inactivation (SSI) dos Canais  $Na_v$  modulados por Propofol. (A)  $Na_v1.1$ . (B)  $Na_v1.2$ . (C)  $Na_v1.3$ . (D)  $Na_v1.4$ . (E)  $Na_v1.5$ . (F)  $Na_v1.6$ . (G)  $Na_v1.7$ . Registros realizado com a técnica patch clamp Whole cell em células HEK e CHO

Na concentração saturante de 100  $\mu M$ , foi observada uma alteração na disponibilidade de canais inativados, sendo os canais mais afetados o  $Na_v1.4$  e  $Na_v1.3$ , com uma modulação de  $-29,43 \pm 2,31$  mV e  $-25,41 \pm 2,57$  mV, respectivamente, e o menos afetado foi o canal  $Na_v1.5$ , com uma modulação de apenas  $-9,43 \pm 2,46$  mV (Tabela 14).

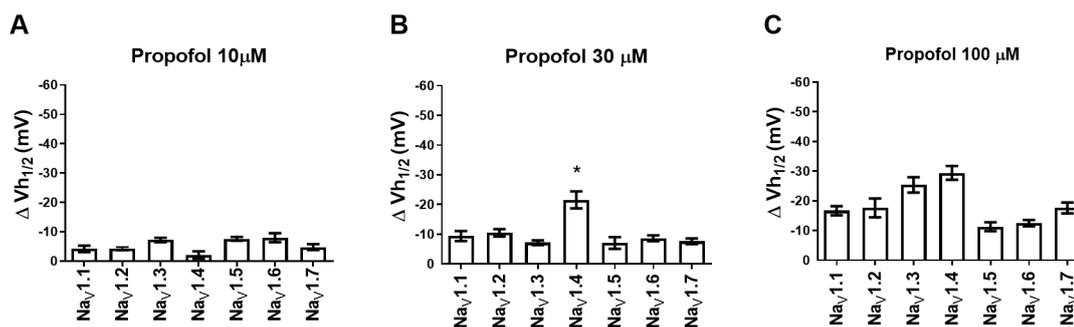


Figura 45 - Avaliação da variação do  $V_{1/2h}$  em canais de sódio dependentes de voltagem após aplicação de três concentrações de Propofol (10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M e 100  $\mu$ M). Valores em média e barras de erros representam o erro padrão. Valores negativos representam o deslocamento do  $V_{h1/2}$  para potenciais polarizantes, valores positivos representam o deslocamento para potenciais mais despolarizantes. (\*) Representa diferença estatística significativa em Anova com pós teste de Tukey's em comparação a todas as médias.

Tabela 14 – Parâmetros da modulação das isoformas de  $N_{av}$  por Propofol. % Inibição representa a taxa de inibição da amplitude no pico da corrente.  $V_{1/2}$  representa a voltagem em que metade dos canais estão ativados.  $V_{1/2h}$  representa a voltagem em que metade dos canais estão inativados. Valores apresentados em média e erro padrão. \* indica valores que apresentaram diferença estatística em teste t pareado.

		<b>Nav1.1</b>			<b>Nav1.5</b>		
	<b>% Inibição</b>	<b><math>\Delta V_{1/2}</math> (mV)</b>	<b><math>\Delta V_{1/2h}</math> (mV)</b>		<b>% Inibição</b>	<b><math>\Delta V_{1/2}</math> (mV)</b>	<b><math>\Delta V_{1/2h}</math> (mV)</b>
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	7,21 $\pm$ 5.08	-3.69 $\pm$ 0.42*	-4.17 $\pm$ 1.09*	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	5,79 $\pm$ 3.80	-2.26 $\pm$ 1.06*	-7.57 $\pm$ 0.64*
<b>30 <math>\mu</math>M</b>	7,44 $\pm$ 3.65	-2.91 $\pm$ 0.98	-9.39 $\pm$ 1.67*	<b>30 <math>\mu</math>M</b>	13,95 $\pm$ 4.02*	-1.78 $\pm$ 0.4*	-7.03 $\pm$ 1.98*
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	26,20 $\pm$ 4.82*	1.14 $\pm$ 1.09	-16.70 $\pm$ 1.53*	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	21,57 $\pm$ 1.48*	-3.27 $\pm$ 1.27	-9.43 $\pm$ 2.46*
		<b>Nav1.2</b>			<b>Nav1.6</b>		
	<b>% Inibição</b>	<b><math>\Delta V_{1/2}</math> (mV)</b>	<b><math>\Delta V_{1/2h}</math> (mV)</b>		<b>% Inibição</b>	<b><math>\Delta V_{1/2}</math> (mV)</b>	<b><math>\Delta V_{1/2h}</math> (mV)</b>
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	3,77 $\pm$ 2.06	-2.08 $\pm$ 0.19*	-4.15 $\pm$ 0.60*	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	11,55 $\pm$ 4.25	-1.49 $\pm$ 0.95	-8.00 $\pm$ 1.50*
<b>30 <math>\mu</math>M</b>	10,59 $\pm$ 6.26	-2.45 $\pm$ 4.00	-10.46 $\pm$ 1.26*	<b>30 <math>\mu</math>M</b>	25,64 $\pm$ 5.25*	-0.91 $\pm$ 1.48	-8.62 $\pm$ 1.00*
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	31,67 $\pm$ 4.89*	-0.29 $\pm$ 0.59	-17.63 $\pm$ 3.17*	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	26,97 $\pm$ 2.67*	-1.62 $\pm$ 1.23	-12.48 $\pm$ 1.08*
		<b>Nav1.3</b>			<b>Nav1.7</b>		
	<b>% Inibição</b>	<b><math>\Delta V_{1/2}</math> (mV)</b>	<b><math>\Delta V_{1/2h}</math> (mV)</b>		<b>% Inibição</b>	<b><math>\Delta V_{1/2}</math> (mV)</b>	<b><math>\Delta V_{1/2h}</math> (mV)</b>
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	5,23 $\pm$ 4.53	-3.45 $\pm$ 1.12	-7.22 $\pm$ 1.97*	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	5,78 $\pm$ 4.20	-2.50 $\pm$ 1.95	-3.18 $\pm$ 1.44*
<b>30 <math>\mu</math>M</b>	9,97 $\pm$ 2.74*	-0.18 $\pm$ 1.55	-6.45 $\pm$ 0.92*	<b>30 <math>\mu</math>M</b>	14,10 $\pm$ 3.86*	-0.69 $\pm$ 0.94	-7.62 $\pm$ 0.93*
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	55,43 $\pm$ 6.45*	-2.27 $\pm$ 0.55*	-25.41 $\pm$ 2.57*	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	40,03 $\pm$ 8.73*	-1.41 $\pm$ 3.23	-17.93 $\pm$ 2.31*
		<b>Nav1.4</b>					
	<b>% Inibição</b>	<b><math>\Delta V_{1/2}</math> (mV)</b>	<b><math>\Delta V_{1/2h}</math> (mV)</b>				
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	-5,16 $\pm$ 2,73	-3.87 $\pm$ 1.97*	-1.73 $\pm$ 1.17				
<b>30 <math>\mu</math>M</b>	62,83 $\pm$ 8.94*	4.48 $\pm$ 2.13*	-21.55 $\pm$ 2.85*				
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	88,94 $\pm$ 1.62*	7.67 $\pm$ 1.44*	-29.43 $\pm$ 2.31*				

### 2.5.2 – Caracterização da atividade de tricloroetanol nas isoformas de canais $Na_v$ .

O metabólito ativo do hidrato de cloral, tricloroetanol (TCE), foi avaliado na concentração de 5 mM em canais de sódio dependentes de voltagem (Figura 46, 47). Foi observado a inibição de corrente nas sete isoformas testadas, sendo as duas isoformas com maiores taxas de inibição  $Na_v1.7$  com  $20.02 \pm 2.4\%$  e  $Na_v1.4$  com  $16.42 \pm 1.21\%$  (Tabela 15).

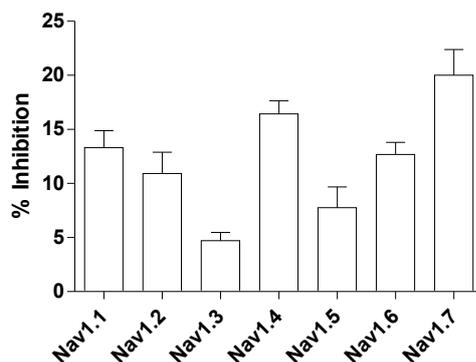


Figura 46 - Inibição do pico de corrente das isoformas de  $Na_v$  com 5 mM de TCE. Valores de média e erro padrão.

A inibição de corrente nas isoformas  $Nav1.1$ - $Nav1.7$  ocorreram sem modulação das probabilidades de abertura na ativação ( $pO$ ), entretanto foi observado a ocorrência de modulação na disponibilidade de canais, *steady-state inactivation* (SSI), com a tendência da hiperpolarização das curvas em volta de -3 mV nas isoformas  $Na_v1.1$ - $Na_v1.6$  (Tabela 15).

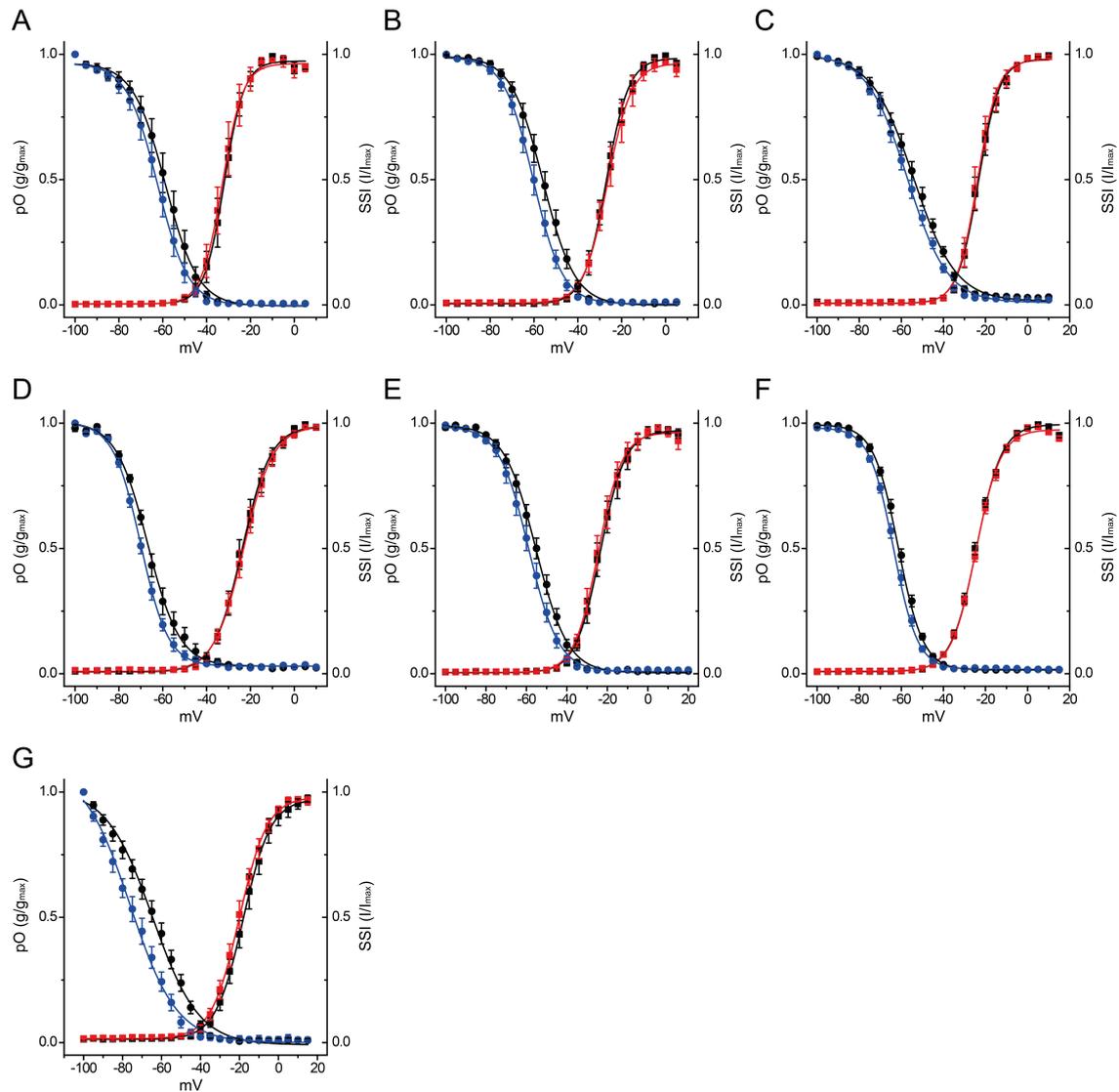


Figura 47 - Probabilidades de abertura ativação e disponibilidade de canais inativados das isoformas  $Na_v$  na presença de TCE a 5 mM. (A)  $Na_v1.1$ . (B)  $Na_v1.2$ . (C)  $Na_v1.3$ . (D)  $Na_v1.4$ . (E)  $Na_v1.5$ . (F)  $Na_v1.6$ . (G)  $Na_v1.7$ . Círculos representam a curva de disponibilidade de canais durante inativação na condição controle (preto) e na condição TCE (azul). Quadrados representam a curva da probabilidade de abertura na ativação controle (preto) e na presença de TCE (Vermelho). Curvas foram ajustadas em função de Boltzmann. Valores demonstrados em média e erro padrão.

Na isoforma  $Na_v1.7$  ocorreu modulação na SSI com o deslocamento de  $-11.43 \pm 2.20$  mV com diferença estatística as demais isoformas (Figura 48), indicando ser a isoforma mais afetada.

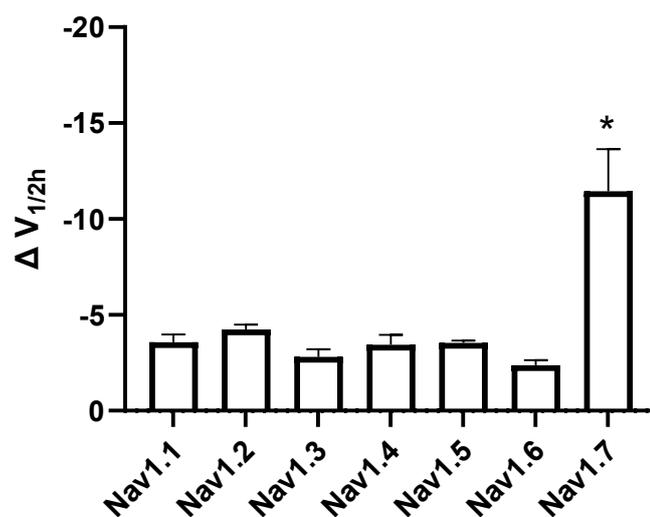


Figura 48 - Gráficos comparativos da variação no valor de  $V_{1/2h}$  do TCE em canais  $Na_v$ . Valores de média e erro padrão. (\*) representa diferença estatística em teste ANOVA *one-way* com pós teste de Tukey.

Os resultados obtidos demonstram que a inibição induzida por TCE a 5mM ocorre devido à modulação na disponibilidade de canais inativados, sem alterar a probabilidade de abertura na ativação e ausência de modulação na capacidade dos canais se recuperarem após inativação (Figura 49).

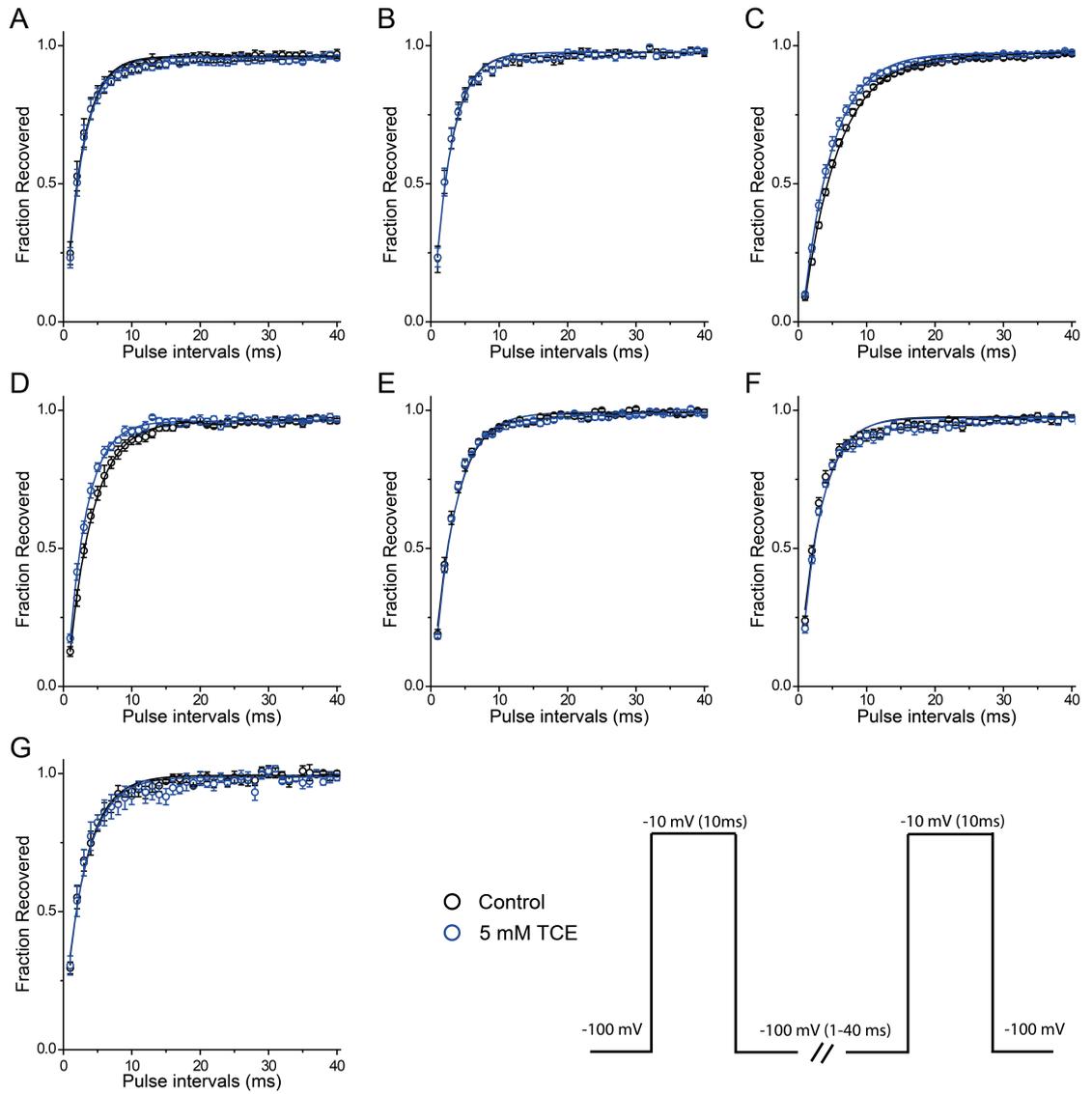


Figura 49 – Avaliação da recuperação da inativação das isoformas na presença de 5 mM de TCE. (A)  $Na_v1.1$ . (B)  $Na_v1.2$ . (C)  $Na_v1.3$ . (D)  $Na_v1.4$ . (E)  $Na_v1.5$ . (F)  $Na_v1.6$ . (G)  $Na_v1.7$ . Registros realizado com a técnica patch clamp Whole cell em células HEK e CHO

Tabela 15 – Parâmetros da modulação das isoformas de Na<sub>v</sub> por TCE. % Inibição representa a taxa de inibição da amplitude no pico da corrente. V<sub>1/2</sub> representa a voltagem em que metade dos canais estão ativados. V<sub>1/2h</sub> representa a voltagem em que metade dos canais estão inativados. T (Tau) representa a constante de tempo do ajuste na função exponencial da recuperação da inativação. Valores apresentados em média e erro padrão. \* indica valores que apresentaram diferença estatística em teste t pareado.

TCE 5 mM								
	% Inibição	n	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	n	$\Delta V_{1/2h}$ (mV)	n	$\Delta T$ (ms)	n
Na <sub>v</sub> 1.1	13.31±1.57*	6	-0.44±0.90	4	-3.57±0.39*	4	-0.05±0.06	6
Na <sub>v</sub> 1.2	10.92±1.97*	6	-1.02±0.42	5	-4.24±0.24*	5	0.02±0.14	6
Na <sub>v</sub> 1.3	4.72±0.74*	6	-0.49±0.24	4	-2.80±0.40*	4	-0.81±0.13	6
Na <sub>v</sub> 1.4	16.42±1.21*	5	0.47±0.15	4	-3.43±0.52*	4	-0.76±0.11	6
Na <sub>v</sub> 1.5	7.75±1.92*	6	-0.94±0.35	6	-3.54±0.12*	6	-0.05±0.21	6
Na <sub>v</sub> 1.6	12.67±1.12*	7	0.47±0.33	7	-2.38±0.25*	7	-0.20±0.05	6
Na <sub>v</sub> 1.7	20.02±2.40*	6	-2.32±0.75	6	-11.43±2.20*	6	0.37±0.58	6

### 2.5.3 – Avaliação da modulação de isoformas de canais de potássio dependentes de voltagem por Tricloroetanol.

O metabólito TCE foi avaliado quanto à capacidade de modular os canais da família relacionada a Shaker, com as isoformas Kv1.3, Kv1.2 e o mutante Kv1.2-FRAKT, que apresenta *linker* S4-S5 de K-Shaw2.

O primeiro canal avaliado foi o K<sub>v</sub>1.3, a fim de compreender a sensibilidade que este canal possui foi realizada uma curva dose resposta e foi observado um EC<sub>50</sub> de 26,68 mM (Figura 50 A). Estudando a probabilidade de abertura do canal na presença de uma concentração próxima ao EC<sub>50</sub> de TCE (25 mM) não foi observada modulação (Figura 50 C), indicando que o mecanismo para a atuação não envolve a modulação na probabilidade de abertura.

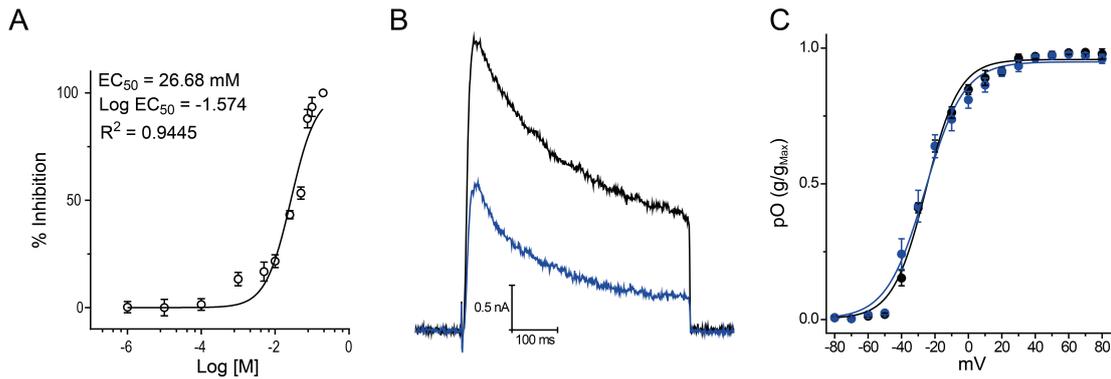


Figura 50 – Caracterização da modulação de TCE em Kv1.3. (A) Curva EC50 da inibição de amplitude de corrente. (B) Traços brutos de corrente em Kv1.3 ativados a 40 mV na presença de TCE a 25 mM, traços pretos representam a condição controle e azuis na presença de TCE. (C) Curva da probabilidade de abertura da ativação, círculos pretos representam a condição controle e azuis na condição com 25 mM de TCE. Registros realizado com a técnica patch clamp Whole cell em células HEK293T.

TCE foi testado na concentração de 5 mM, demonstrando potencial inibidor do canal WT Kv1.2 com redução da amplitude de corrente em  $9,97 \pm 3,01\%$  ( $n=3$ ) em estímulos de 40 mV (Figura 51 A). A inibição de corrente ocorreu com ausência de modulação na probabilidade de abertura (Figura 51 B).

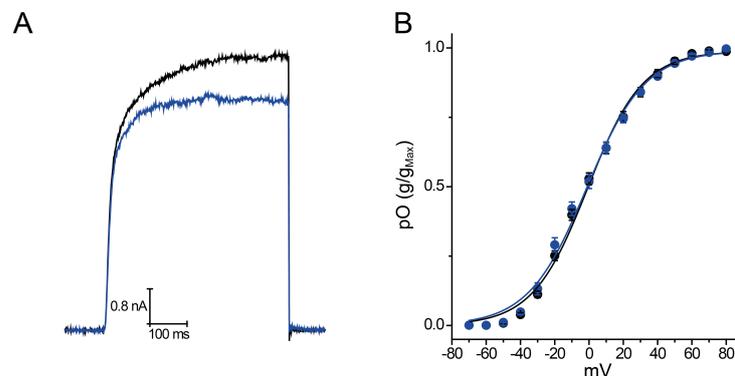


Figura 51 - Caracterização da modulação de TCE em Kv1.2. (A) Traços brutos de corrente em Kv1.2 ativados a 40 mV na presença de TCE a 5 mM. (B) Curva da probabilidade de abertura da ativação. Círculos pretos representam a condição controle e azuis na condição com 25 mM de TCE. Registros realizado com a técnica patch clamp Whole cell em células HEK293T.

No canal mutante Kv1.2-FRAKT, com o *linker* S4-S5 de K-Shaw, foi observado um efeito potencializador da condutância na presença de TCE 5 mM, com aumento de  $24,87 \pm 8,71\%$  ( $n=5$ ), em estímulo de 40 mV (Figura 52 A-B). O efeito potencializador ocorreu com ausência de modulação na probabilidade de abertura (Figura 52 C).

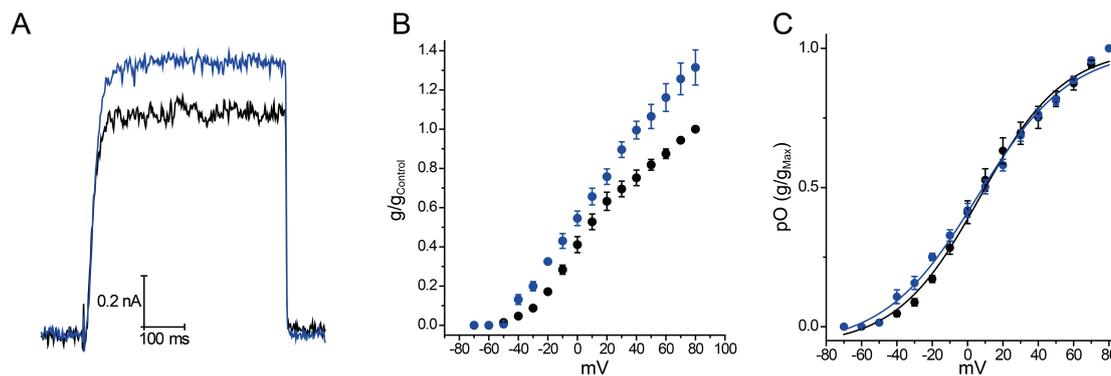


Figura 52 - Caracterização da atividade do Tricloroetanol a 5 mM em Kv1.2-FRAKT. (A) Tricloroetanol a 5 mM potencializa a amplitude de corrente de Kv1.2-FRAKT. (B) Curva condutância por voltagem de Kv1.2 FRAKT e TCE 5 mM. (C) Probabilidade de abertura Kv1.2 FRAKT na presença de TCE 5 mM. Traços e símbolos em preto representa a condição controle e em Azul represente a condição com TCE 5 mM. Registros realizado com a técnica *Patch clamp Whole Cell* em células HEK293T.

#### 2.5.4 Resultados modelo celular SH-SY5Y-RA

Para construção de um modelo celular para estudos da interação de anestésicos em canais iônicos foi escolhida a célula SH-SY5Y, que se trata de um subclone de uma linhagem de neuroblastoma que apresenta a expressão endógena de canais de sódio e potássio dependentes de voltagem (Figura 53 A). Com o intuito de induzir a diferenciação celular e o desenvolvimento de características neuronais foi realizada tratamento com ácido retinóico (RA) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Este cultivo celular após diferenciação foi nomeado de SH-SY5Y-RA.

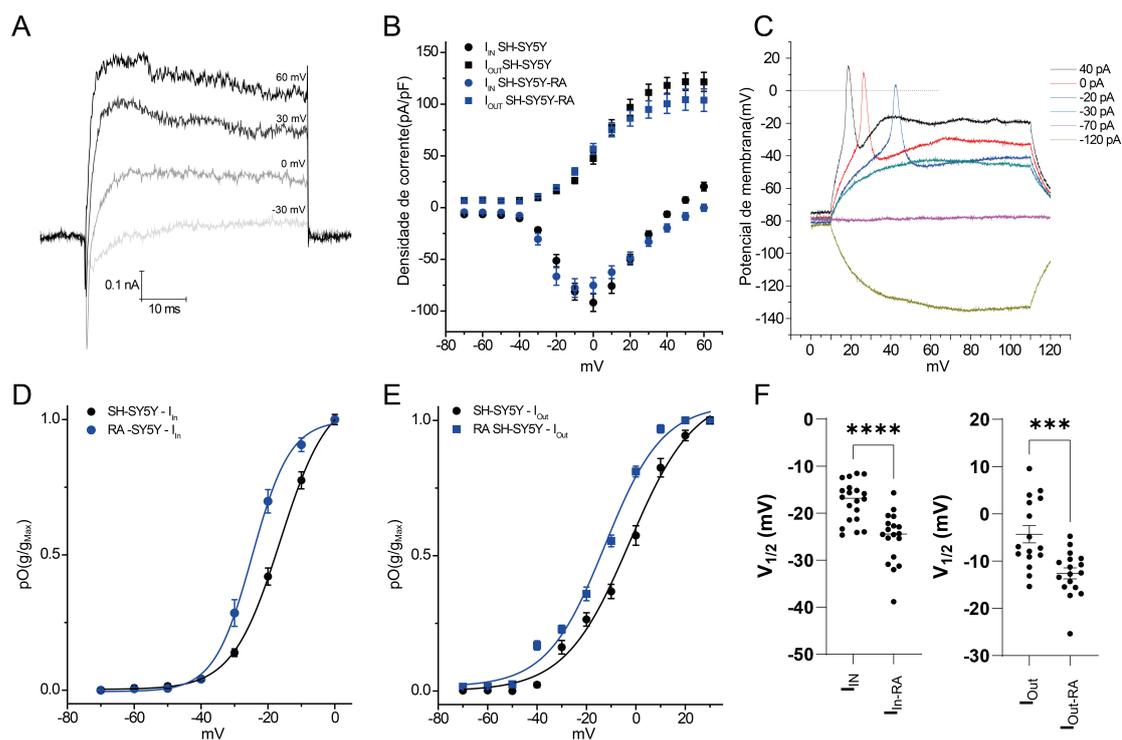


Figura 53 – Caracterização das correntes endógenas e probabilidades de aberturas do modelo SH-SY5Y diferenciada com ácidos retinóico. (A) Corrente endógenas de SH-SY5Y. (B) Curvas corrente por voltagem das densidades de corrente das células SH-SY5Y e SH-SY5Y-RA. (C) Demonstração de potenciais de ação induzidos em células SH-SY5Y-RA. Probabilidade de abertura durante ativação das correntes de entrada (D) e das correntes de saída (E). (F) Análise estatística dos valores de  $V_{1/2}$  nas correntes de entrada e saída, realizada com teste t não pareado. Registros realizado com a técnica *Patch clamp Whole Cell* em células SH-SY5Y.

O processo de diferenciação não alterou a densidade de corrente (Figura 53 B), mas ao comparar a probabilidade de abertura das correntes de saída, associadas com os canais de potássio, e as correntes de entrada, associadas com os canais de sódio majoritariamente observa-se que em ambos ocorreu o deslocamento da probabilidade de abertura para potenciais mais negativos (Figura 53 D, E), indicando um aumento da excitabilidade celular, com uma alteração de aproximadamente -8 mV para as correntes de saída e -7 mV para as correntes de entrada (Figura 53 F).

O aumento da excitabilidade celular permitiu o registro de potenciais de ação na configuração *current-clamp*. Todavia, a célula não apresenta um potencial de repouso natural que permite o registro, sendo assim necessária a injeção de corrente negativa para obtenção de uma voltagem de repouso próxima de -80 mV (Figura 53 C). Para o registro das densidades de corrente e da probabilidade de abertura, as células foram tratadas quando

necessário com 300nM de tetrodotoxina (TTX) para inibir canais de  $Na_v$  ou 20 mM de Tetraetilamônio (TEA) para inibir canais  $K_v$ .

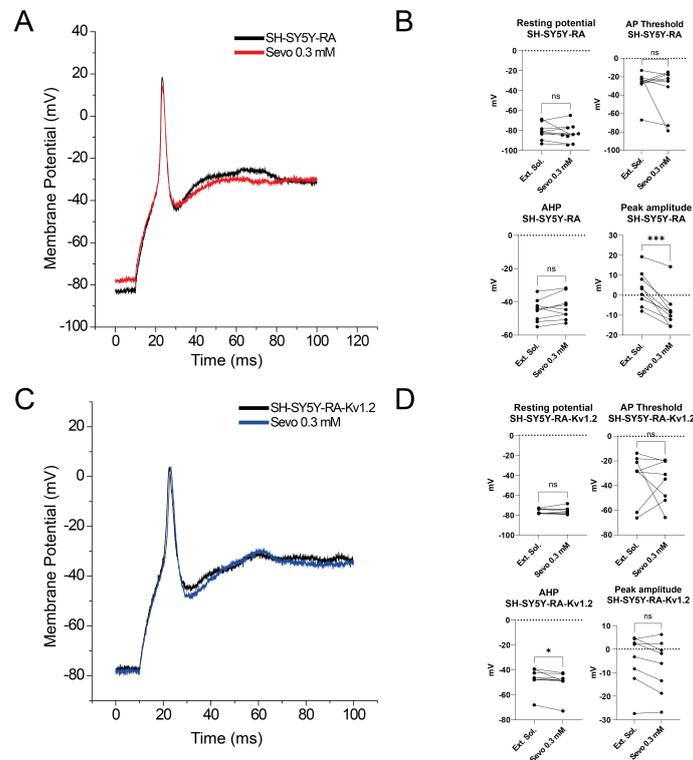


Figura 54 - Registro de potenciais de ação induzidos. (A) Traços do potencial de ação das células SH-SY5Y-RA com sevoflurano a 0,3 mM. (B) parâmetros calculados do potencial de ação das células SH-SY5Y-RA e análise estatística test T pareado. (C) Traços do potencial de ação das células SH-SY5Y-RA- $K_v1.2$  com sevoflurano a 0,3 mM. (D) parâmetros calculados do potencial de ação das células SH-SY5Y-RA- $K_v1.2$  e análise estatística test T pareado. Registros realizado com a técnica *Patch clamp Whole Cell* em células SH-SY5Y.

As células SH-SY5Y-RA foram avaliadas em quatro parâmetros iniciais quanto às propriedades dos potenciais de ação induzidos: o potencial de repouso quando estabilizadas com -70 pA, o limiar de disparos quando a variação é superior a 15 mV/mS, o valor máximo do pico e a voltagem de membrana após repolarização (AHP). Os potenciais de ação em células SH-SY5Y-RA na presença de 0,3 mM de Sevoflurano apenas apresentaram variação quanto à inibição do pico máximo, redução de  $3,33 \pm 2,84$  mV, para  $-7,52 \pm 2,98$  mV ( $p < 0,001$ ), aproximadamente 10 mV (Figura 54 A, B).

Células SH-SY5Y-RA transfectadas com canal  $K_v1.2$ , nomeadas de SH-SY5Y-RA- $K_v1.2$ , apresentaram uma amplitude máxima do potencial de ação relativamente menor,  $-5,53 \pm 3,69$  mV, em comparação a SH-SY5Y-RA, que apresentou  $3,33 \pm 2,84$  mV. Quando tratadas com 0,3 mM de sevoflurano, o único parâmetro que demonstrou variação foi o

potencial de membrana após repolarização com variação de  $-47,13 \pm 3,04$  mV para  $-49,95 \pm 3,22$  mV ( $p=0.037$ ) (Figura 54 A, B).

## 2.6 Discussão

### **Caracterização da atividade do anestésico propofol em canais de sódio dependentes de voltagem**

A concentração plasmática de propofol que previne a movimentação em humanos é entre 3-4  $\mu\text{g/mL}$ , aproximadamente 16,8-22  $\mu\text{M}$ , atingindo quase 44  $\mu\text{M}$  de pico durante a indução. A concentração para que os pacientes acordem pós procedimento é de aproximadamente 6  $\mu\text{M}$  ( $1,07 \pm 0,13$   $\mu\text{g/mL}$ ) e com o estado orientado de 5,3  $\mu\text{M}$  ( $0,95 \pm 0,19$   $\mu\text{g/mL}$ ) (Shafer et al., 1988). Estudos com pacientes submetidos a neurocirurgias anestesiados com propofol demonstraram que ocorre um acúmulo no tecido nervoso, atingindo concentrações superiores às detectadas no sangue (Van Hese et al., 2020; Kawata et al., 2024).

Para este trabalho, foi escolhido utilizar 3 concentrações de Propofol: uma dose subclínica abaixo da dose de manutenção e indução de 10  $\mu\text{M}$ , uma concentração próxima à dose de manutenção de 30  $\mu\text{M}$  e uma dose saturante de 100  $\mu\text{M}$ .

Os resultados obtidos com propofol nos canais  $\text{Na}_v\text{s}$  demonstraram ser dose dependentes, com a hiperpolarização da curva de *steady-state inactivation* e promovendo a inibição de corrente em todos os canais testados em concentrações superiores a 10  $\mu\text{M}$  (Tabela 14). Nos canais  $\text{Nav}1.1\text{-Nav}1.3$  e  $\text{Nav}1.5\text{-Nav}1.7$ , o resultado observado concorda com o previamente descrito quanto ao acoplamento da ativação e inativação no mecanismo de ação do propofol sobre os canais  $\text{Na}_v$  de procariotos (Yang et al., 2018). Os canais, na presença de Propofol 10-100  $\mu\text{M}$ , foram fracamente modulados na probabilidade de abertura nos potenciais negativos, chegando ao máximo de -3 mV. Todavia, a curva de inativação (Figura 45) apresentou variações de -6 a -10 mV na concentração próxima de manutenção da anestesia (30  $\mu\text{M}$ ), induzindo a inibição da amplitude da corrente (Figura 42).

O acoplamento da ativação e inativação para  $Na_v$ s de procariotos proposto por Yang et al (2018) consiste na observação experimental da modulação positiva na ativação, com aceleração nas cinéticas de ativação e desativação, que induz o deslocamento da probabilidade de abertura para potenciais mais negativos e isso acelera a entrada no estado inativado (Fineberg et al., 2012) com a demonstração da hiperpolarização das curvas de SSI (Yang et al., 2018).

O canal bacteriano NaChBac demonstrou ser modulado sobre o processo de ativação em concentrações a partir de  $0,3 \mu\text{M}$  e com máxima modulação a  $3 \mu\text{M}$ , em concentrações superiores ocorreu redução na potência de modulação (Xiao et al., 2020). Já quando analisada a disponibilidade de canais inativados foi relatado que a modulação ocorre desde a concentração de  $0,3 \mu\text{M}$  e se estende até a concentração máxima testada de  $30 \mu\text{M}$  (Xiao et al., 2020). A conclusão dos autores sobre esse padrão foi que a modulação na probabilidade de abertura na ativação ocorre preferencialmente em concentrações mais baixas ( $0,3\text{-}10 \mu\text{M}$ ), enquanto a modulação na disponibilidade de canais inativados ocorre em todas as concentrações testadas e de forma dose dependente (Xiao et al., 2020).

O canal  $Na_v1.4$  apresentou um fenômeno diferente em comparação às demais isoformas, na concentração de  $10 \mu\text{M}$  com efeito compreendido como excitatório, apresentando deslocamento na probabilidade de abertura para potenciais mais negativos ( $-3,87 \text{ mV}$ ), ausência de modulação na SSI e um aumento na amplitude de corrente de  $5,16\%$  (Figura 47, Tabela 14).

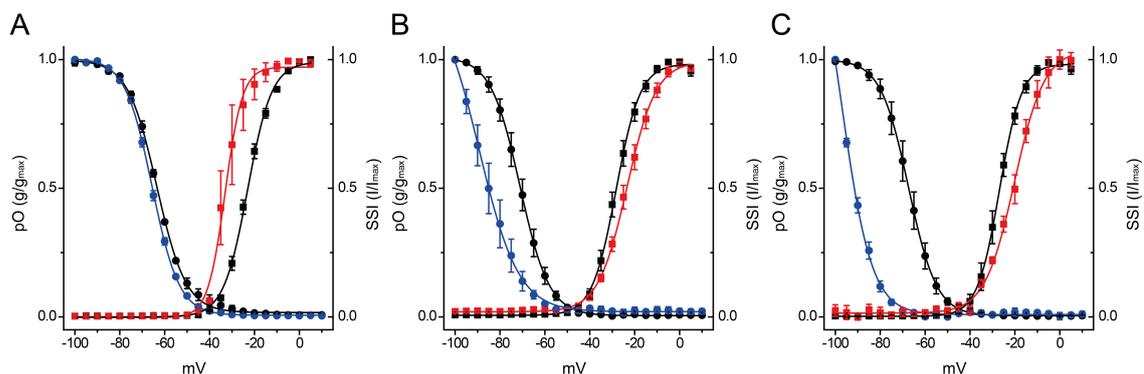


Figura 55 – Probabilidades de abertura ativação e disponibilidade de canais inativados do canal  $Nav1.4$  na presença de Propofol. (A)  $10 \mu\text{M}$ . (B)  $30 \mu\text{M}$ . (C)  $100 \mu\text{M}$ . Círculos representam a curva de disponibilidade de canais durante inativação na condição controle (preto) e na condição Propofol (azul). Quadrados representam a curva da probabilidade de abertura na ativação controle (preto) e na presença de Propofol (Vermelho). Curvas foram ajustadas em função sigmoideal de Boltzmann. Valores demonstrados em média e erro padrão. *Patch clamp Whole Cell*

Nas concentrações maiores, foi registrada a modulação na probabilidade de abertura para potenciais mais positivos, com variações de 4-7 mV, com forte variação na SSI para potenciais mais negativos e inibição de corrente de 60-80%, indicando não seguir o mecanismo proposto para o acoplamento ativação-inativação e promovendo o desacoplamento da ativação e inativação exclusivamente em  $Na_v1.4$  (Figura 47).

Durante anestesia leve, em baixas concentrações de propofol ou outro anestésicos pode ocorrer um fenômeno conhecido como excitação paradoxal, que apresenta clinicamente como movimentação anormal, alucinações e desorientação (Jeong et al., 2011), além da observação de um aumento de ondas do tipo beta ( $\approx 20$  Hz) em eletroencefalograma (McCarthy et al., 2008). O efeito observado em  $Na_v1.4$  a  $10 \mu M$  com o aumento da amplitude de correntes e modulação preferencial da ativação excitatória (Figura 55 A) pode ser um dos agentes associados com os movimentos anormais durante a excitação paradoxal.

O Propofol é um agonista do receptor  $GABA_A$ , sendo essa sua função associada com a capacidade de indução e com os efeitos finais da anestesia (Zhou and Guan, 2021). Neste presente trabalho, todas as isoformas testadas em concentrações próximas à utilizada na clínica,  $30 \mu M$ , apresentaram algum nível de inibição e modulação, demonstrando potencial colaborador nos efeitos finais e adversos da anestesia geral. Os efeitos em  $Na_v1.4$ , por exemplo, podem estar associadas com a imobilização induzida e os efeitos adversos na depressão respiratória por inibição da musculatura esquelética intercostal associada. A modulação do canal  $Na_v1.4$  apresenta algumas características similares às observadas em certas condições de mutações que provocam perda de função - *Loss of function*, como no caso das mutações S246L e 1442E em SCN4A, que apresentam a hiperpolarização da curva SSI, e, nas quais, os pacientes demonstram ataques de paralisia respiratória e apneia (Tsujino et al., 2003).

#### **Caracterização da atividade do sedativo tricloroetanol em canais de sódio e potássio dependentes de voltagem.**

Tricloroetanol a  $5 \text{ mM}$ , nos canais de sódio dependentes de voltagem ( $Na_v1.1$ - $Na_v1.7$ ), inibiu a corrente de todos os canais testados, com o canal  $Na_v1.7$  sendo o mais

afetado com 20% de inibição (Tabela 15). A redução de amplitude dos picos de corrente indica que o efeito está associado diretamente com a alteração na disponibilidade de canais, com observação na modulação da SSI, com variação de -11 mV para Na<sub>v</sub>1.7.

Correntes de canais Na<sub>v</sub> resistentes a TTX (300 nM) registradas em neurônios nociceptivos da raiz do gânglio dorsal (DRG) demonstram sensibilidade a TCE com IC<sub>50</sub> de 18 mM e modulação da SSI, com uma inibição mais potente das correntes persistentes, demonstrado um IC<sub>50</sub> de 3,3mM, sendo essas provavelmente associadas ao canal Na<sub>v</sub>1.8 e ao possível alvo do efeito analgésico do TCE (Kim et al., 2023). O canal Na<sub>v</sub>1.7 é sensível a TTX e não foi registrado no trabalho de Kim et al, todavia também está presente na DRG (Dib-Hajj and Waxman, 2019) e os resultados do presente trabalho também indicam a possível participação no efeito analgésico do TCE (Field et al., 1993; Krauss and Green, 2006) por inibir as correntes devido à modulação na SSI.

Os estudos da interação do TCE com canais de potássio atualmente se limitam aos canais da família K<sub>2p</sub>, com efeito ativador em TREK-1 e TRAAK (Harinath and Sikdar, 2004), e também efeito potencializado no canal mitocondrial mitoKATP (Zaugg et al., 2002).

Para compreender a magnitude dos efeitos em canais da família *Shaker-Related* (Kv1.x) foi inicialmente analisada a capacidade de inibição de corrente no canal Kv1.3 (Figura 50), com a observação de um EC<sub>50</sub> de 26,68 mM. A análise de probabilidade de abertura da ativação a 25 mM não demonstrou modulação, indicando que outros mecanismos são associados com a inibição.

O canal Kv1.2 é amplamente expresso no cérebro, associado com o controle da excitabilidade celular, com a manutenção do potencial de repouso, repolarização e o padrão de disparos (Robbins and Tempel, 2012). Anticorpos anti-Kv1.2 (Alkire et al., 2009) e uma toxina bloqueadora de Kv1.2 (Lioudyno et al., 2013) perfundidas no núcleo medial talâmico durante anestesia por sevoflurano demonstraram reverter momentaneamente a sedação de camundongos, indicando a importância do canal Kv1.2 durante a manutenção da anestesia.

O metabólito ativo TCE a 5 mM reduziu a amplitude de correntes no canal Kv1.2-WT em aproximadamente 9%, caracterizando um efeito inibitório similar ao descrito para Kv1.3 (Figura 51). Já quando avaliado no canal Kv1.2-FRAKT foi observado um efeito

potencializador com aumento da condutância nos potenciais de -40 até 80 mV, com ausência de deslocamento na probabilidade de abertura.

A incapacidade de propofol modular Kv1.2 WT sugere uma interação fraca com o *linker* S4-S5, uma vez que foi demonstrado por *Photolabeling* a interação na região, mas com ausência de modulação (Bu et al., 2018). Os canais Kv1.2-FRAKT (Liang et al., 2015) e o Kv1.2 G329T apresentam efeito potencializador do propofol, diferente do Kv1.2 que é insensível (Bu et al., 2018). Os canais Kv1.2/ Kv1.2-FRAKT apresentaram similaridades no padrão de comportamento na presença de TCE, indicando que o *linker* S4-S5 de Kv1.2 não permite a interação forte de TCE, mas quando substituído para o de K-Shaw2 (Kv1.2-FRAKT) ocorre a interação e potencialização do canal, assim como descrito para o propofol (Bu et al., 2018). Outra molécula similar ao anestésico propofol, AziPm, demonstrou o mesmo padrão que o TCE, com inibição em Kv1.2 e potencialização de Kv1.2-FRAKT, sendo associada a capacidade de inibição com o resíduo L321, indicando a possibilidade que o TCE apresente interação com esse resíduo (Bu et al., 2018). Simulações computacionais com o modelo atômico existente do TCE (Kiametis et al., 2018) e as estruturas de Kv1.2 poderiam fornecer informações adicionais sobre o mecanismo de interação do TCE com o linker S4-S5, além da influência do resíduo L321.

### **Modelo celular SH-SY5Y-RA para avaliação da interação de anestésicos**

O modelo celular SH-SY5Y-RA foi desenvolvido com a ideia de ser uma plataforma para testes de diferentes compostos em uma célula que apresenta características neuronais mínimas, apresentando correntes endógenas associadas à despolarização de membrana e à repolarização, além da capacidade da inserção de novas características de correntes com a transfecção de plasmídeos para expressão de canais iônicos.

O processo de diferenciação celular com ácido retinóico associado com BDNF das células SH-SY5Y induz o fenótipo de neurônios maduros dopaminérgicos, com indução da formação de neuritos, o aumento da expressão dos marcadores de neurônios maduros, como sinaptofisina,  $\beta$ -tubulina III e proteína nuclear neuronal (Pifferi et al., 2024), além do aumento de marcadores associados às características dopaminérgicas, como o

transportador de dopamina DAT, receptores D2 e D3 e da enzima tirosina hidroxilase (Goldie et al., 2014; Ferrari et al., 2020).

O processo de diferenciação celular propiciou uma alteração na probabilidade de abertura das correntes associadas a canais de sódio e potássio, em ambas as probabilidades ocorreu deslocamento para potenciais mais negativos, efeito associado com um aumento na excitabilidade, fazendo com que os canais abram com menores variações de voltagem (Figura 53 D, E). Para uma avaliação completa da diferenciação celular torna-se necessário além da avaliação das correntes iônicas uma futura análise da presença dos marcadores de neurônios maduros dopaminérgicos por metodologias de imuno-histoquímica.

O deslocamento nas probabilidades de abertura após o processo de diferenciação celular possibilitou condições necessárias para registros de potências de ação nestas células (Figura 53 C). É importante ressaltar algumas limitações quanto aos potenciais de ação registrados nessas células. O primeiro fator é a necessidade da injeção de corrente (-70 pA) para obtenção de potenciais de repouso que não inativem os canais. Segundo, as células apresentam um potencial de ação induzido único, independente do tempo de estímulo ou amplitude de corrente, indicando não possuir a maquinaria de canais necessária para total hiperpolarização e retorno ao limiar de ativação, impossibilitando um estudo quanto à frequência dos disparos. Além das limitações relacionadas ao modelo celular, é necessário aprimorar os *scripts* de análise em python utilizados neste presente trabalho, para a obtenção de outros parâmetros fundamentais, como uma melhor detecção do limiar de ativação, duração fase ascendente, duração da fase descendente e o cálculo da largura do potencial de ação na metade da amplitude - *Action potential half-width*.

O valor de MAC – *Minimum Alveolar Concentration* de sevoflurano observado para adultos é de 2,05 % (Scheller et al., 1988) e 2,40% para ratos. Considerando o valor do coeficiente de partição dos anestésicos e as correções da temperatura, foi identificada uma concentração de 0,30 mM para humanos e 0,35 mM para ratos (Crawford et al., 1992) em solução aquosa com os MAC de 2,05% e 2,40%, respectivamente (Franks and Lieb, 1994, 1996). Considerando esses valores, o sevoflurano foi diretamente solubilizado na solução de experimento para a concentração de 0,3 mM, próxima aos valores calculados a partir dos MAC descritos anteriormente.

Sevoflurano a 0,3 mM demonstrou reduzir a amplitude do potencial de ação nas células SH-SY5Y-RA, tal efeito pode estar associado diretamente com a redução de amplitude de correntes dos canais de sódio (Barber et al., 2014), os demais parâmetros calculados não demonstraram variação. Ao observar os efeitos nas células com alta densidade de expressão de  $K_v1.2$ , em SH-SY5Y-RA- $K_v1.2$  foi registrada uma repolarização com valores mais negativa potencial de membrana após repolarização, esse efeito está diretamente associado com o aumento da condutância dos canais  $K_v1.2$  na presença de sevoflurano (Barber et al., 2012; Lioudyno et al., 2013).

Simulações computacionais do sevoflurano em  $K_v1.2$  indicam a interação principalmente nas regiões do *linker* S4-S5 e a hélice S6 com a ocupação desses sítio dependente da concentração (Stock et al., 2017) A interação ocorre preferencialmente no estado aberto do canal, com o aumento da concentração (1-100 mM) é observado o deslocamento da probabilidade de abertura para potenciais mais negativos (-1mV até -30 mV) (Stock et al., 2018) .

O modelo celular SH-SY5Y-RA- $K_v1.2$  foi capaz de refletir o efeito da modulação sevoflurano 0,3 mM sobre  $K_v1.2$  no potencial de ação, indicando ser um modelo interessante para avaliação de como a modulação de alvos específicos adicionados via transfecção pode afetar diretamente a excitabilidade de membrana na presença de anestésicos.

## 2.7 Conclusão

Existe uma seletividade nos alvos que os anestésicos gerais interagem, promovendo a redução de atividade dos alvos relacionados à excitabilidade neuronal como os canais  $Na_v$ ,  $Ca_v$ , NMDA, AMPA e aumento da atividade dos alvos relacionados à hiperpolarização de membrana e à inibição neuronal ( $K_v$ ,  $K2P$ ,  $GABA_A$ ) (Zhou and Guan, 2021). Atuando com uma seletividade a resposta neuronal, mas com inespecificidade molecular.

O anestésico injetável propofol demonstrou ser ativo nos canais  $Na_v$  nas três concentrações testadas e indicando agir sobre acoplamento da ativação-inativação (Yang et al., 2018) para inibição de corrente nos canais  $Na_v1.1-1.3$  e  $Nav1.5-Na_v1.7$ . A isoforma  $Na_v1.4$  apresentou maiores taxa de inibições e modulações nas probabilidades de abertura, entretanto os resultados indicados neste trabalho não demonstram acoplamento da

ativação-inativação, uma vez que foi observado um deslocamento na probabilidade de abertura para potenciais mais positivos.

Tricloroetanol foi capaz de inibir as isoformas de  $Na_v$  devido à modulação da disponibilidade de canais na inativação, com efeito mais potente no canal  $Na_v1.7$ , sendo esse o possível alvo relacionado com o efeito analgésico descrito para esse sedativo. Nos canais  $K_v1.2$  e  $K_v1.2$ -FRAKT, TCE atuou de forma similar ao descrito para o análogo fotoativo de propofol - AziPM, apresentando efeito inibitório no canal em sua condição nativa e capacidade potencializadora na isoforma mutante, sendo possivelmente o efeito inibitório associado ao resíduo L321 (Bu et al., 2018).

O modelo SH-SY5Y-RA tem como finalidade o estudo de como alvos moleculares de anestésicos podem afetar em um modelo mínimo os potenciais de ação. A hiperpolarização observada no potencial de ação após repolarização em células SH-SY5Y-RA- $K_v1.2$  na presença de sevoflurano foi capaz de demonstrar como a potencialização dos canais  $K_v1.2$  afeta os parâmetros da excitabilidade de membrana individualmente.

## **2.8 Perspectivas Futuras**

- Investigação do mecanismo de ação que provoca o deslocamento diferencial da probabilidade de abertura do canal  $Na_v1.4$  na presença de Propofol.
- Aprimoramento na metodologia de análise dos potenciais de ação induzidos em SH-SY5Y-RA.
- Análise dos marcadores moleculares de SH-SY5Y-RA para as características de neurônios maduros dopaminérgicos.
- Utilização dos mutantes  $K_v1.2$ -FRAKT e  $\Delta T1$ - $K_v1.2$ -G329T no modelo celular SH-SY5Y com Sevoflurano, Propofol e TCE.

## Referências Bibliográficas

- Abbott, G. W. (2022). Kv Channel Ancillary Subunits: Where Do We Go from Here? *Physiology* 37, 225–241. doi: 10.1152/physiol.00005.2022
- Acevedo, I. C. C., Silva Jr, P. I., Silva, F. D., Araújo, I., Alves, F. L., Oliveira, C. S., et al. (2019). IsCT-based analogs intending better biological activity. *Journal of Peptide Science* 25, e3219. doi: 10.1002/psc.3219
- Ahern, C. A., Payandeh, J., Bosmans, F., and Chanda, B. (2016). The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *Journal of General Physiology* 147, 1–24. doi: 10.1085/jgp.201511492
- Ahrén, B. (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion - Implications for health and disease. *Diabetologia* 43, 393–410. doi: 10.1007/s001250051322
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., and Rogers, S. W. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 89, 73–120. doi: 10.1152/physrev.00015.2008
- Alexander, S. P. H., Mathie, A. A., Peters, J. A., Veale, E. L., Striessnig, J., Kelly, E., et al. (2023). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2023/24: Ion channels. *British J Pharmacology* 180. doi: 10.1111/bph.16178
- Alkire, M. T., Asher, C. D., Franciscus, A. M., and Hahn, E. L. (2009). Thalamic Microinfusion of Antibody to a Voltage-gated Potassium Channel Restores Consciousness during Anesthesia. *Anesthesiology* 110, 766–773. doi: 10.1097/ALN.0b013e31819c461c
- Alkondon, M., Pereira, E. F. R., and Albuquerque, E. X. (1998).  $\alpha$ -Bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices.
- Almaaytah, A., and Albalas, Q. (2014). Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. *Peptides* 51, 35–45. doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.021
- Antognini, J. F., and Carstens, E. (2002). In vivo characterization of clinical anaesthesia and its components. *British Journal of Anaesthesia* 89, 156–166. doi: 10.1093/bja/aef156
- Ashcroft, F. M. (2005). ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J Clin Invest* 115, 2047–2058. doi: 10.1172/JCI25495
- Ashcroft, F. M., Harrison, D. E., and Ashcroft, S. J. (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312, 446–448. doi: 10.1038/312446a0
- Baltutis, V., O'Leary, P. D., and Martin, L. L. (2022). Self-Assembly of Linear, Natural Antimicrobial Peptides: An Evolutionary Perspective. *ChemPlusChem* 87, e202200240. doi: 10.1002/cplu.202200240
- Banerjee, A., Lee, A., Campbell, E., and MacKinnon, R. (2013). Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *eLife* 2, e00594. doi: 10.7554/eLife.00594
- Barber, A. F., Carnevale, V., Klein, M. L., Eckenhoff, R. G., and Covarrubias, M. (2014). Modulation of a voltage-gated Na<sup>+</sup> channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 6726–6731. doi: 10.1073/pnas.1405768111

- Barber, A. F., Liang, Q., Amaral, C., Treptow, W., and Covarrubias, M. (2011). Molecular mapping of general anesthetic sites in a voltage-gated ion channel. *Biophysical Journal* 101, 1613–1622. doi: 10.1016/j.bpj.2011.08.026
- Barber, A. F., Liang, Q., and Covarrubias, M. (2012). Novel activation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels by sevoflurane. *Journal of Biological Chemistry* 287, 40425–40432. doi: 10.1074/jbc.M112.405787
- Bateman, B. T., and Kesselheim, A. S. (2015). Propofol as a transformative drug in anesthesia: insights from key early investigators. *Drug Discovery Today* 20, 1012–1017. doi: 10.1016/j.drudis.2015.04.007
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3, 728–739. doi: 10.1038/nrn920
- Beneski, D. A., and Catterall, W. A. (1980). Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 639–643. doi: 10.1073/pnas.77.1.639
- Benkert, J., Hess, S., Roy, S., Beccano-Kelly, D., Wiederspohn, N., Duda, J., et al. (2019). Cav2.3 channels contribute to dopaminergic neuron loss in a model of Parkinson's disease. *Nature Communications* 10, 1–11. doi: 10.1038/s41467-019-12834-x
- Bennett, D. L., Clark, A. J., Huang, J., Waxman, S. G., and Dib-Hajj, S. D. (2019). The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiological Reviews* 99, 1079–1151. doi: 10.1152/physrev.00052.2017
- Bezánilla, F. (2002). Voltage sensor movements. *Journal of General Physiology* 120, 465–473. doi: 10.1085/jgp.20028660
- Bezánilla, F. (2018). Gating currents. *Journal of General Physiology* 150, 911–932. doi: 10.1085/jgp.201812090
- Borroni, V., and Barrantes, F. J. (2021). Homomeric and Heteromeric  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in Health and Some Central Nervous System Diseases. *Membranes* 11, 664. doi: 10.3390/membranes11090664
- Bosco, M. D., Drogemüller, C., Zalewski, P., and Coates, P. T. (2014). "Zinc Transporters in the Endocrine Pancreas," in *Islets of Langerhans*, 2. ed., ed. Md. S. Islam (Dordrecht: Springer Netherlands), 1–16. doi: 10.1007/978-94-007-6884-0\_42-2
- Bourinet, E., and Zamponi, G. W. (2017). Block of voltage-gated calcium channels by peptide toxins. *Neuropharmacology* 127, 109–115. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.10.016
- Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Zhang, Q., Karanauskaite, J., Partridge, C., et al. (2008). Voltage-gated ion channels in human pancreatic  $\beta$ -cells: Electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 57, 1618–1628. doi: 10.2337/db07-0991
- Brazil, T., and Porto, T. (2011). *Os escorpíões*. Salvador Ba.
- Brohan, J., and Goudra, B. G. (2017). The Role of GABA Receptor Agonists in Anesthesia and Sedation. *CNS Drugs* 31, 845–856. doi: 10.1007/s40263-017-0463-7
- Brunton, L. L., and Knollmann, B. C. (2023). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.*, 14th Edn.
- Bu, W., Liang, Q., Zhi, L., Maciunas, L., Loll, P. J., Eckenhoff, R. G., et al. (2018). Sites and Functional Consequence of Alkylphenol Anesthetic Binding to Kv1.2 Channels. *Molecular Neurobiology* 55, 1692–1702. doi: 10.1007/s12035-017-0437-2

- Cacheaux, L. P., Topf, N., Tibbs, G. R., Schaefer, U. R., Levi, R., Harrison, N. L., et al. (2005). Impairment of Hyperpolarization-Activated, Cyclic Nucleotide-Gated Channel Function by the Intravenous General Anesthetic Propofol. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 517–525. doi: 10.1124/jpet.105.091801
- Caldwell, J. H., Schaller, K. L., Lasher, R. S., Peles, E., and Levinson, S. R. (2000). Sodium channel Nav1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5616–5620. doi: 10.1073/pnas.090034797
- Camargos, T. S., Restano-Cassulini, R., Possani, L. D., Peigneur, S., Tytgat, J., Schwartz, C. A., et al. (2011). The new kappa-KTx 2.5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides* 32, 1509–1517. doi: 10.1016/j.peptides.2011.05.017
- Camerino, D. C., Tricarico, D., and Desaphy, J.-F. (2007). Ion channel pharmacology. 4.
- Campagna, J. A., and Forman, S. A. (2003). Mechanisms of Actions of Inhaled Anesthetics. *The New England Journal of Medicine*.
- Cao, D.-S., Zhong, L., Hsieh, T., Abooj, M., Bishnoi, M., Hughes, L., et al. (2012). Expression of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) and Its Role in Insulin Release from Rat Pancreatic Beta Cells. *PLoS ONE* 7, e38005. doi: 10.1371/journal.pone.0038005
- Capes, D. L., Goldschen-Ohm, M. P., Arcisio-Miranda, M., Bezanilla, F., and Chanda, B. (2013). Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels. *Journal of General Physiology* 142, 101–112. doi: 10.1085/jgp.201310998
- Cardoso, F. C., and Lewis, R. J. (2019). Structure–Function and Therapeutic Potential of Spider Venom-Derived Cysteine Knot Peptides Targeting Sodium Channels. *Front. Pharmacol.* 10, 366. doi: 10.3389/fphar.2019.00366
- Carmeliet, E. (2019). From Bernstein’s rheotome to Neher-Sakmann’s patch electrode. The action potential. *Physiol Rep* 7, e13861. doi: 10.14814/phy2.13861
- Catterall, W. A. (2023). Voltage gated sodium and calcium channels: Discovery, structure, function, and Pharmacology. *Channels* 17, 2281714. doi: 10.1080/19336950.2023.2281714
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., and Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49, 124–141. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.09.022
- Catterall, W. A., Raman, I. M., Robinson, H. P. C., Sejnowski, T. J., and Paulsen, O. (2012). The hodgkin-huxley heritage: From channels to circuits. *Journal of Neuroscience* 32, 14064–14073. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3403-12.2012
- Catterall, W. A., Wisedchaisri, G., and Zheng, N. (2017). The chemical basis for electrical signaling. *Nature Chemical Biology* 13, 455–463. doi: 10.1038/nchembio.2353
- Chagot, B., Pimentel, C., Dai, L., Pil, J., Tytgat, J., Nakajima, T., et al. (2005). An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical Journal* 388, 263–271. doi: 10.1042/BJ20041705
- Chakrabarti, N., Ing, C., Payandeh, J., Zheng, N., Catterall, W. A., and Pomès, R. (2013). Catalysis of Na<sup>+</sup> permeation in the bacterial sodium channel Na<sub>v</sub>Ab. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 11331–11336. doi: 10.1073/pnas.1309452110

- Chen, Z.-Y., Zeng, D.-Y., Hu, Y.-T., He, Y.-W., Pan, N., Ding, J.-P., et al. (2012). Structural and Functional Diversity of Acidic Scorpion Potassium Channel Toxins. *PLoS ONE* 7, e35154. doi: 10.1371/journal.pone.0035154
- Choquet, D., and Korn, H. (1992). Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *J Gen Physiol* 99, 217–240. doi: 10.1085/jgp.99.2.217
- Clairfeuille, T., Cloake, A., Infield, D. T., Llongueras, J. P., Arthur, C. P., Li, Z. R., et al. (2019). Structural basis of a-scorpion toxin action on Nav channels. *Science* 363, 1–25. doi: 10.1126/science.aav8573
- Colsooul, B., Vennekens, R., and Nilius, B. (2012). Transient receptor potential cation channels in pancreatic  $\beta$  cells. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 161, 87–110. doi: 10.1007/112\_2011\_2
- Crawford, M. W., Lerman, J., Saldivia, V., and Carmichael, F. J. (1992). Hemodynamic and organ blood flow responses to halothane and sevoflurane anesthesia during spontaneous ventilation. *Anesth Analg* 75, 1000–1006. doi: 10.1213/0000539-199212000-00021
- Cregg, R., Momin, A., Rugiero, F., Wood, J. N., and Zhao, J. (2010). Pain channelopathies. *The Journal of Physiology* 588, 1897–1904. doi: 10.1113/jphysiol.2010.187807
- Cremonese, C. M., Maiti, M., Peigneur, S., Cassoli, J. S., Dutra, A. A. A., Waelkens, E., et al. (2016). Structural and functional elucidation of peptide TS11 shows evidence of a novel subfamily of scorpion venom toxins. *Toxins* 8. doi: 10.3390/toxins8100288
- Cull-Candy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 327–335. doi: 10.1016/S0959-4388(00)00215-4
- Da Silva Xavier, G. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. *JCM* 7, 54. doi: 10.3390/jcm7030054
- Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M., and Nakajima, T. (2002). Purification, structure–function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293, 1514–1522. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00423-0
- Dai, L., Yasuda, A., Naoki, H., Corzo, G., Andriantsiferana, M., and Nakajima, T. (2001). IsCT, a Novel Cytotoxic Linear Peptide from Scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286, 820–825. doi: 10.1006/bbrc.2001.5472
- Dajas-Bailador, F., and Wonnacott, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacological Sciences* 25, 317–324. doi: 10.1016/j.tips.2004.04.006
- Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., et al. (1997). On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *J Biol Chem* 272, 4302–4309. doi: 10.1074/jbc.272.7.4302
- Davidson, A. J., and Sun, L. S. (2018). Clinical Evidence for Any Effect of Anesthesia on the Developing Brain. *Anesthesiology* 128, 840–853. doi: 10.1097/ALN.0000000000001972
- De Hert, S., and Moerman, A. (2015). Sevoflurane. *F1000Res* 4, 626. doi: 10.12688/f1000research.6288.1

- Dib-Hajj, S. D., and Waxman, S. G. (2019). Sodium Channels in Human Pain Disorders: Genetics and Pharmacogenomics. *Annual Review of Neuroscience* 42, 87–106. doi: 10.1146/annurev-neuro-070918-050144
- Ding, L., Hao, J., Luo, X., Zhu, W., Wu, Z., Qian, Y., et al. (2018). The Kv1.3 channel-inhibitory toxin BF9 also displays anticoagulant activity via inhibition of factor XIa. *Toxicon* 152, 9–15. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.07.014
- Dolphin, A. C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *British J Pharmacology* 147. doi: 10.1038/sj.bjp.0706442
- Dolphin, A. C. (2020). Functions of Presynaptic Voltage-gated Calcium Channels. *Function* 2, 1–10. doi: 10.1093/function/zqaa027
- Donahue, L. M., Coates, P. W., Lee, V. H., Ippensen, D. C., Arze, S. E., and Poduslo, S. E. (2000). The cardiac sodium channel mRNA is expressed in the developing and adult rat and human brain. *Brain Research* 887, 335–343. doi: 10.1016/S0006-8993(00)03033-X
- Downie, D. L., Hall, A. C., Lieb, W. R., and Franks, N. P. (1996). Effects of inhalational general anaesthetics on native glycine receptors in rat medullary neurones and recombinant glycine receptors in *Xenopus* oocytes. *British J Pharmacology* 118, 493–502. doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15430.x
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., et al. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science* 280, 69–77. doi: 10.1126/science.280.5360.69
- Du Bois-Reymond, E. (1848). Untersuchungen über thierische Elektrizität. *Ann. Phys. Chem.* 151, 463–464. doi: 10.1002/andp.18481511120
- Dutertre, S., Becker, C.-M., and Betz, H. (2012). Inhibitory Glycine Receptors: An Update. *Journal of Biological Chemistry* 287, 40216–40223. doi: 10.1074/jbc.R112.408229
- Eckle, V.-S., Hauser, S., Drexler, B., Antkowiak, B., and Grasshoff, C. (2013). Opposing Actions of Sevoflurane on GABAergic and Glycinergic Synaptic Inhibition in the Spinal Ventral Horn. *PLoS ONE* 8, e60286. doi: 10.1371/journal.pone.0060286
- Eger, E. I., Saidman, L. J., and Brandstater, B. (1965). Minimum Alveolar Anesthetic Concentration: A Standard of Anesthetic Potency. *Anesthesiology* 26, 756–763. doi: 10.1097/00000542-196511000-00010
- Ellinor, P. T., Yang, J., Sather, W. A., Zhang, J.-F., and Tsien, R. W. (1995). Ca<sup>2+</sup> channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca<sup>2+</sup> interactions. *Neuron* 15, 1121–1132. doi: 10.1016/0896-6273(95)90100-0
- Enyedi, P., and Czirják, G. (2010). Molecular Background of Leak K<sup>+</sup> Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiological Reviews* 90, 559–605. doi: 10.1152/physrev.00029.2009
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., et al. (2000). Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron* 25, 533–535. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81057-0
- Facco, E. (2016). Hypnosis and anesthesia: back to the future. *Minerva Anestesiologica* 82.
- Ferrari, E., Cardinale, A., Picconi, B., and Gardoni, F. (2020). From cell lines to pluripotent stem cells for modelling Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience Methods* 340, 108741. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108741

- Field, K. J., White, W. J., and Lang, C. M. (1993). Anaesthetic effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats. *Lab Anim* 27, 258–269. doi: 10.1258/002367793780745471
- Fineberg, J. D., Ritter, D. M., and Covarrubias, M. (2012). Modeling-independent elucidation of inactivation pathways in recombinant and native A-type Kv channels. *Journal of General Physiology* 140, 513–527. doi: 10.1085/jgp.201210869
- Fischer, M. J. M., Leffler, A., Niedermirtl, F., Kistner, K., Eberhardt, M., Reeh, P. W., et al. (2010). The General Anesthetic Propofol Excites Nociceptors by Activating TRPV1 and TRPA1 Rather than GABAA Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 285, 34781–34792. doi: 10.1074/jbc.M110.143958
- Fischer, W., Allgaier, C., and Illes, P. (2000). Inhibition by chloral hydrate and trichloroethanol of AMPA-induced Ca(2+) influx in rat cultured cortical neurones. *Eur J Pharmacol* 394, 41–45. doi: 10.1016/s0014-2999(00)00160-6
- Flood, E., Boiteux, C., and Allen, T. W. (2018). Selective ion permeation involves complexation with carboxylates and lysine in a model human sodium channel. *PLoS Comput Biol* 14, e1006398. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006398
- Fong, C. Y., Lim, W. K., Li, L., and Lai, N. M. (2021). Chloral hydrate as a sedating agent for neurodiagnostic procedures in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2021. doi: 10.1002/14651858.CD011786.pub3
- Franks, N. P. (2008). General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 9, 370–386. doi: 10.1038/nrn2372
- Franks, N. P., and Lieb, W. R. (1984). Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 310, 599–601. doi: 10.1038/310599a0
- Franks, N. P., and Lieb, W. R. (1994). Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367, 607–614. doi: 10.1038/367607a0
- Franks, N. P., and Lieb, W. R. (1996). Temperature dependence of the potency of volatile general anesthetics: implications for in vitro experiments. *Anesthesiology* 84, 716–720. doi: 10.1097/00000542-199603000-00027
- Frosio, A., Micaglio, E., Polsinelli, I., Calamaio, S., Melgari, D., Prevostini, R., et al. (2023). Unravelling Novel SCN5A Mutations Linked to Brugada Syndrome: Functional, Structural, and Genetic Insights. *IJMS* 24, 15089. doi: 10.3390/ijms242015089
- Gamper, N., and Wang, K. eds. (2021). *Pharmacology of Potassium Channels*. Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-030-84052-5
- Gao, B., Harvey, P. J., Craik, D. J., Ronjat, M., De Waard, M., and Zhu, S. (2013). Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold. *Bioscience Reports* 33, e00047. doi: 10.1042/BSR20130052
- García, L. F., Valenzuela-Rojas, J. C., González-Gómez, J. C., Lacava, M., and Van Der Meijden, A. (2022). Pinching or stinging? Comparing prey capture among scorpions with contrasting morphologies. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0037
- Gasparini, S., Danse, J.-M., Lecoq, A., Pinkasfeld, S., Zinn-Justin, S., Young, L. C., et al. (1998). Delineation of the Functional Site of  $\alpha$ -Dendrotoxin. *Journal of Biological Chemistry* 273, 25393–25403. doi: 10.1074/jbc.273.39.25393

- Gausserès, B., Liu, J., Foppen, E., Turrel-Cuzin, C., Sanchez-Archidona, A. R., Delangre, E., et al. (2020). The constitutive lack of  $\alpha 7$  nicotinic receptor leads to metabolic disorders in mouse. *Biomolecules* 10, 1–28. doi: 10.3390/biom10071057
- Gees, M., Owsianik, G., Nilius, B., and Voets, T. (2012). TRP channels. *Compr Physiol* 2, 563–608. doi: 10.1002/cphy.c110026
- Giacalone, M., Abramo, A., Giunta, F., and Forfori, F. (2013). Xenon-related Analgesia: A New Target for Pain Treatment. *The Clinical Journal of Pain* 29, 639. doi: 10.1097/AJP.0b013e31826b12f5
- Gil-Rivera, M., Medina-Gali, R. M., Martínez-Pinna, J., and Soriano, S. (2021). “Physiology of pancreatic  $\beta$ -cells: Ion channels and molecular mechanisms implicated in stimulus-secretion coupling,” in *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier Inc.), 287–323. doi: 10.1016/bs.ircmb.2021.02.006
- Goldie, B. J., Barnett, M. M., and Cairns, M. J. (2014). BDNF and the maturation of posttranscriptional regulatory networks in human SH-SY5Y neuroblast differentiation. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 325. doi: 10.3389/fncel.2014.00325
- Goldschen-Ohm, M. P., Capes, D. L., Oelstrom, K. M., and Chanda, B. (2013). Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. *Nature Communications* 4, 1350. doi: 10.1038/ncomms2356
- Goldschen-Ohm, M. P., and Chanda, B. (2017). SnapShot: Channel Gating Mechanisms. *Cell* 170, 594–594.e1. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.019
- Gonçalves, A. A., Toyama, M. H., Carneiro, E. M., Marangoni, S., Arantes, E. C., Giglio, J. R., et al. (2003). Participation of Na<sup>+</sup> channels in the potentiation by Tityus serrulatus  $\alpha$ -toxin TsTx-V of glucose-induced electrical activity and insulin secretion in rodent islet  $\beta$ -cells. *Toxicon* 41, 1039–1045. doi: 10.1016/S0041-0101(03)00086-2
- Gopalakrishnakone, P., Possani, L. D., F. Schwartz, E., and Rodríguez De La Vega, R. C. eds. (2015). *Scorpion Venoms*. Dordrecht: Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-007-6404-0
- Gottschalk, A., Aken, H. V., Zenz, M., and Standl, T. (2011). Is Anesthesia Dangerous? *Deutsches Ärzteblatt international*. doi: 10.3238/arztebl.2011.0469
- Grando, S. A., Kawashima, K., Kirkpatrick, C. J., Meurs, H., and Wessler, I. (2012). The non-neuronal cholinergic system: Basic science, therapeutic implications and new perspectives. *Life Sciences* 91, 969–972. doi: 10.1016/j.lfs.2012.10.004
- Grémiaux, A., Yokawa, K., Mancuso, S., and Baluška, F. (2014). Plant anesthesia supports similarities between animals and plants: Claude Bernard’s forgotten studies. *Plant Signaling & Behavior* 9, e27886. doi: 10.4161/psb.27886
- Gruss, M., Hempelmann, G., and Scholz, A. (2002). Trichloroethanol alters action potentials in a subgroup of primary sensory neurones. *NeuroReport* 13, 853–856. doi: 10.1097/00001756-200205070-00023
- Guan, B., Chen, X., and Zhang, H. (2013). Two-electrode voltage clamp. *Methods Mol Biol* 998, Methods Mol Biol. doi: 10.1007/978-1-62703-351-0\_6
- Guerra-Duarte, C., Saavedra-Langer, R., Matavel, A., Oliveira-Mendes, B. B. R., Chavez-Olortegui, C., and Paiva, A. L. B. (2023). Scorpion envenomation in Brazil: Current scenario and perspectives for containing an increasing health problem. *PLoS Negl Trop Dis* 17, e0011069. doi: 10.1371/journal.pntd.0011069

- Haeseler, G., Störmer, M., Mohammadi, B., Bufler, J., Dengler, R., Piepenbrock, S., et al. (2001). The anesthetic propofol modulates gating in paramyotonia congenita mutant muscle sodium channels. *Muscle and Nerve* 24, 736–743. doi: 10.1002/mus.1064
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 391, 85–100. doi: 10.1007/BF00656997
- Han, S.-N., Jing, Y., Yang, L.-L., Zhang, Z., and Zhang, L.-R. (2016). Propofol inhibits hERG K<sup>+</sup> channels and enhances the inhibition effects on its mutations in HEK293 cells. *European Journal of Pharmacology* 791, 168–178. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.08.028
- Harinath, S., and Sikdar, S. K. (2004). Trichloroethanol enhances the activity of recombinant human TREK-1 and TRAAK channels. *Neuropharmacology* 46, 750–760. doi: 10.1016/j.neuropharm.2003.11.023
- Harris, T., Shahidullah, M., Ellingson, J. S., and Covarrubias, M. (2000). General Anesthetic Action at an Internal Protein Site Involving the S4-S5 Cytoplasmic Loop of a Neuronal K<sup>+</sup> Channel. *Journal of Biological Chemistry* 275, 4928–4936. doi: 10.1074/jbc.275.7.4928
- Hedrich, R., and Kreuzer, I. (2023). Demystifying the Venus flytrap action potential. *New Phytologist* 239, 2108–2112. doi: 10.1111/nph.19113
- Henquin, J. C., and Meissner, H. P. (1984). Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia* 40, 1043–1052. doi: 10.1007/BF01971450
- Herold, K. F., and Hemmings Jr., H. C. (2012). Sodium Channels as Targets for Volatile Anesthetics. *Front. Pharmacol.* 3. doi: 10.3389/fphar.2012.00050
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., et al. (2004). TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 23, 2684–2695. doi: 10.1038/sj.emboj.7600234
- Hille, B. (1977). Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *The Journal of general physiology* 69, 497–515. doi: 10.1085/jgp.69.4.497
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes, third edition (Sunderland: sinauer associates)*.
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1939). Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature* 144, 710–711. doi: 10.1038/144710a0
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1945). Resting and action potentials in single nerve fibres. *The Journal of Physiology* 104, 176–195. doi: 10.1113/jphysiol.1945.sp004114
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952a). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. 500–544. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004764
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *The Journal of Physiology* 116, 449–472. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004717
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952c). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *The Journal of Physiology* 116, 473–496. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004718
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952d). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *The Journal of Physiology* 116, 497–506. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004719

- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., and Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *The Journal of Physiology* 116, 424–448. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004716
- Hollmann, M. W., Liu, H.-T., Hoenemann, C. W., Liu, W.-H., and Durieux, M. E. (2001). Modulation of NMDA Receptor Function by Ketamine and Magnesium. Part II: Interactions with Volatile Anesthetics. *Anesthesia & Analgesia* 92, 1182–1191. doi: 10.1097/00000539-200105000-00020
- Hopper, A. J., Beswick-Jones, H., and Brown, A. M. (2022). A color-coded graphical guide to the Hodgkin and Huxley papers. *Advances in Physiology Education* 46, 580–592. doi: 10.1152/advan.00178.2022
- Huang, X., and Jan, L. Y. (2014). Targeting potassium channels in cancer. *Journal of Cell Biology* 206, 151–162. doi: 10.1083/jcb.201404136
- Huxley, A. F. (2002). Hodgkin and the action potential 1935–1952. *The Journal of Physiology* 538, 2–2. doi: 10.1113/jphysiol.2001.014118
- Ishizawa, Y. (2007). Mechanisms of anesthetic actions and the brain. *Journal of Anesthesia* 21, 187–199. doi: 10.1007/s00540-006-0482-x
- Islam, M. S. (2011). TRP channels of islets., in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 811–830. doi: 10.1007/978-94-007-0265-3\_42
- Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2012). Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *The Journal of Physiology* 590, 2591–2599. doi: 10.1113/jphysiol.2011.224212
- Jeong, S., Lee, H. G., Kim, W. M., Jeong, C. W., Lee, S. H., Yoon, M. H., et al. (2011). Increase of paradoxical excitement response during propofol-induced sedation in hazardous and harmful alcohol drinkers. *British Journal of Anaesthesia* 107, 930–933. doi: 10.1093/bja/aer275
- Jeyapakash, A., and Hoy, M. A. (2009). First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (subphylum: Chelicerata) inferred from mitochondrial phylogeny. *Exp Appl Acarol* 47, 1–18. doi: 10.1007/s10493-008-9203-5
- Jin, L., Wu, J.-S., Chen, G.-B., and Zhou, L.-F. (2017). Unforgettable Ups and Downs of Acupuncture Anesthesia in China. *World Neurosurgery* 102, 623–631. doi: 10.1016/j.wneu.2017.02.036
- Jing, X., Li, D.-Q., Olofsson, C. S., Salehi, A., Surve, V. V., Caballero, J., et al. (2005). CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *Journal of Clinical Investigation* 115, 146–154. doi: 10.1172/jci22518
- Jurkovicova-Tarabova, B., and Lacinova, L. (2019). Structure, function and regulation of Cav2.2 N-type calcium channels. *General Physiology and Biophysics* 38, 101–110. doi: 10.4149/gpb\_2019004
- Kalstrup, T., and Blunck, R. (2018). S4–S5 linker movement during activation and inactivation in voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115. doi: 10.1073/pnas.1719105115
- Kasheverov, I. E., Oparin, P. B., Zhmak, M. N., Egorova, N. S., Ivanov, I. A., Gigolaev, A. M., et al. (2019). Scorpion toxins interact with nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS Letters* 593, 2779–2789. doi: 10.1002/1873-3468.13530
- Kawata, M., Yonezawa, A., Mineharu, Y., Itohara, K., Mizota, T., Matsui, Y., et al. (2024). Development of extended pharmacokinetic models for propofol based on measured blood and brain concentrations. *Sci Rep* 14, 6326. doi: 10.1038/s41598-024-56863-z

- Kay, B., and Rolly, G. (1977). I.C.I. 35868, a new intravenous induction agent. *Acta Anaesthesiol Belg* 28, 303–316.
- Kelz, M. B., and Mashour, G. A. (2019). The Biology of General Anesthesia from Paramecium to Primate. *Current Biology* 29, R1199–R1210. doi: 10.1016/j.cub.2019.09.071
- Kiametis, A. S., Stock, L., Cirqueira, L., and Treptow, W. (2018). Atomistic Model for Simulations of the Sedative Hypnotic Drug 2,2,2-Trichloroethanol. *ACS Omega* 3, 15916–15923. doi: 10.1021/acsomega.8b02017
- Kim, G., Kim, H., and Jang, I.-S. (2023). Trichloroethanol, an active metabolite of chloral hydrate, modulates tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channels in rat nociceptive neurons. *BMC Anesthesiology* 23, 145. doi: 10.1186/s12871-023-02105-0
- Kim, J. J., and Hibbs, R. E. (2021). Direct Structural Insights into GABAA Receptor Pharmacology. *Trends in Biochemical Sciences* 46, 502–517. doi: 10.1016/j.tibs.2021.01.011
- Kim, J. K., Yoo, H. Y., Kim, S. J., Hwang, Y.-S., Han, J., Kim, J. A., et al. (2007). Effects of sevoflurane on the cAMP-induced short-circuit current in mouse tracheal epithelium and recombinant Cl<sup>-</sup> (CFTR) and K<sup>+</sup> (KCNQ1) channels †. *British Journal of Anaesthesia* 99, 245–251. doi: 10.1093/bja/aem123
- Kim, J.-B. (2014). Channelopathies. *Korean J Pediatr* 57, 1. doi: 10.3345/kjp.2014.57.1.1
- King, G. F., Gentz, M. C., Escoubas, P., and Nicholson, G. M. (2008). A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* 52, 264–276. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.05.020
- Klockgether-Radke, A. P., Schulze, H., Neumann, P., and Hellige, G. (2004). Activation of the K<sup>+</sup> channel BK(Ca) is involved in the relaxing effect of propofol on coronary arteries. *Eur J Anaesthesiol* 21, 226–230. doi: 10.1017/s0265021504003126
- Kojima, A., Ito, Y., Ding, W. G., Kitagawa, H., and Matsuura, H. (2015). Interaction of propofol with voltage-gated human Kv1.5 channel through specific amino acids within the pore region. *European Journal of Pharmacology* 764, 622–632. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.007
- Krasowski, M. D., and Harrison, N. L. (2000). The actions of ether, alcohol and alkane general anaesthetics on GABAA and glycine receptors and the effects of TM2 and TM3 mutations. *British Journal of Pharmacology* 129.
- Krauss, B., and Green, S. M. (2006). Procedural sedation and analgesia in children. *Lancet* 367, 766–780. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68230-5
- Krogman, W. L., Woodard, T., and McKay, R. S. F. (2024). Anesthetic Mechanisms: Synergistic Interactions With Lipid Rafts and Voltage-Gated Sodium Channels. *Anesthesia & Analgesia* 139, 92–106. doi: 10.1213/ANE.0000000000006738
- Krylov, N. A., Tabakmakher, V. M., Yureva, D. A., Vassilevski, A. A., and Kuzmenkov, A. I. (2023). Kalium 3.0 is a comprehensive depository of natural, artificial, and labeled polypeptides acting on potassium channels. *Protein Sci* 32, e4776. doi: 10.1002/pro.4776
- Kuang, Q., Purhonen, P., and Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 3677–3693. doi: 10.1007/s00018-015-1948-5
- Kuzmenkov, A. I., Grishin, E. V., and Vassilevski, A. A. (2015). Diversity of Potassium Channel Ligands: Focus on Scorpion Toxins. *Biochemistry (Moscow)* 80, 1764–1799. doi: 10.1134/S0006297915130118

- Langosch, D., Thomas, L., and Betz, H. (1988). Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7394–7398.
- Lee, A., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2000). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent facilitation and inactivation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Journal of Neuroscience* 20, 6830–6838. doi: 10.1523/jneurosci.20-18-06830.2000
- Lee, K., Shin, S. Y., Kim, K., Lim, S. S., Hahm, K.-S., and Kim, Y. (2004). Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323, 712–719. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.144
- Lenaeus, M. J., Vamvouka, M., Focia, P. J., and Gross, A. (2005). Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel. *Nature Structural and Molecular Biology* 12, 454–459. doi: 10.1038/nsmb929
- Liang, Q., Anderson, W. D., Jones, S. T., Souza, C. S., Hosoume, J. M., Treptow, W., et al. (2015). Positive allosteric modulation of Kv channels by sevoflurane: Insights into the structural basis of inhaled anesthetic action. *PLoS ONE* 10. doi: 10.1371/journal.pone.0143363
- Liebig, J. (1832). Ueber die Zersetzung des Alkohols durch Chlor. *Annalen der Pharmacie* 1, 31–32. doi: 10.1002/jlac.18320010109
- Lim, S. S., Kim, Y., Park, Y., Kim, J. I., Park, I.-S., Hahm, K.-S., et al. (2005). The role of the central I- or d-Pro residue on structure and mode of action of a cell-selective  $\alpha$ -helical IsCT-derived antimicrobial peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 1329–1335. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.029
- Lim, S. S., Yoon, S.-P., Park, Y., Zhu, W. L., Park, I.-S., Hahm, K.-S., et al. (2006). Mechanism of antibacterial action of a synthetic peptide with an Ala-peptoid residue based on the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT. *Biotechnol Lett* 28, 1431–1437. doi: 10.1007/s10529-006-9107-6
- Liman, E. R., Tytgat, J., and Hess, P. (1992). Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9, 861–871. doi: 10.1016/0896-6273(92)90239-A
- Lindy, A. S., Stosser, M. B., Butler, E., Downtain-Pickersgill, C., Shanmugham, A., Retterer, K., et al. (2018). Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia* 59, 1062–1071. doi: 10.1111/epi.14074
- Lioudyno, M. I., Birch, A. M., Tanaka, B. S., Sokolov, Y., Goldin, A. L., Chandy, K. G., et al. (2013). Shaker-related potassium channels in the central medial nucleus of the thalamus are important molecular targets for arousal suppression by volatile general anesthetics. *Journal of Neuroscience* 33, 16310–16322. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0344-13.2013
- Lipkind, G. M., and Fozzard, H. A. (1994). A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na<sup>+</sup> channel. *Biophys J* 66, 1–13.
- Lipscombe, D., Helton, T. D., and Xu, W. (2004). L-type calcium channels: The low down. *Journal of Neurophysiology* 92, 2633–2641. doi: 10.1152/jn.00486.2004
- Liu, C., Liu, W.-H., Yang, W., Chen, L., Xue, Y., and Chen, X.-Y. (2024). GLP-1 modulated the firing activity of nigral dopaminergic neurons in both normal and parkinsonian mice. *Neuropharmacology* 252, 109946. doi: 10.1016/j.neuropharm.2024.109946
- Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005). Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science* 309, 903–908. doi: 10.1126/science.1116270

- Lourenço, W. R., Wilmé, L., and Waeber, P. O. (2018). The genus *Opisthacanthus* Peters, 1861 (Scorpiones: Hormuridae), a remarkable Gondwanian group of scorpions. *Comptes Rendus - Biologies* 341, 131–143. doi: 10.1016/j.crv.2017.12.003
- Lovinger, D. M., and Zhou, Q. (1993). Trichloroethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor-mediated ion current in nodose ganglion neurons from the adult rat. *J Pharmacol Exp Ther* 265, 771–776.
- MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350, 232–235. doi: 10.1038/350232a0
- Malviya, S., Voepel-Lewis, T., and Tait, A. R. (1997). Adverse events and risk factors associated with the sedation of children by nonanesthesiologists. *Anesth Analg* 85, 1207–1213. doi: 10.1097/00000539-199712000-00005
- Mandala, V. S., and MacKinnon, R. (2022). Voltage-sensor movements in the Eag Kv channel under an applied electric field. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2214151119. doi: 10.1073/pnas.2214151119
- Marchi, M., D’Amato, I., Andelic, M., Cartelli, D., Salvi, E., Lombardi, R., et al. (2022). Congenital insensitivity to pain: a novel mutation affecting a U12-type intron causes multiple aberrant splicing of SCN9A. *PAIN* 163, e882. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002535
- Marini, F., Giusti, F., and Brandi, M. L. (2024). Genetic disorders and insulinoma/glucagonoma. *Endocrine-Related Cancer* 31. doi: 10.1530/ERC-23-0245
- McCarthy, M. M., Brown, E. N., and Kopell, N. (2008). Potential Network Mechanisms Mediating Electroencephalographic Beta Rhythm Changes during Propofol-Induced Paradoxical Excitation. *J. Neurosci.* 28, 13488–13504. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3536-08.2008
- McDonough, S. I. (2007). Gating modifier toxins of voltage-gated calcium channels. *Toxicon* 49, 202–212. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.09.018
- McDougall, J. J., and O’Brien, M. S. (2024). Analgesic potential of voltage gated sodium channel modulators for the management of pain. *Current Opinion in Pharmacology* 75, 102433. doi: 10.1016/j.coph.2024.102433
- McGrath, M., Tolia, M., and Raines, D. E. (2020). The effects of a competitive antagonist on GABA-evoked currents in the presence of sedative-hypnotic agents. *Pharmacol. Rep* 72, 260–266. doi: 10.1007/s43440-019-00031-y
- Mendes, L. C., Viana, G. M. M., Nencioni, A. L. A., Pimenta, D. C., and Beraldo-Neto, E. (2023). Scorpion Peptides and Ion Channels: An Insightful Review of Mechanisms and Drug Development. *Toxins* 15, 238. doi: 10.3390/toxins15040238
- Menezes, L. F. S., Sabiá Júnior, E. F., Tibery, D. V., Carneiro, L. dos A., and Schwartz, E. F. (2020). Epilepsy-Related Voltage-Gated Sodium Channelopathies: A Review. *Frontiers in Pharmacology* 11. doi: 10.3389/fphar.2020.01276
- Meyer, H. (1899). Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* volume 42, 109–118. doi: doi.org/10.1007/BF01834479
- Ministério da Saúde (2024). *Boletim epidemiológico: Acidentes escorpiônicos no Brasil em 2022*.
- Ministério da Saúde, S. de V. em S. (2022). Boletim Epidemiológico 48 - Epidemiologia dos acidentes causados por escorpiões no Brasil em 2021.

- Missner, A., and Pohl, P. (2009). 110 Years of the Meyer–Overton Rule: Predicting Membrane Permeability of Gases and Other Small Compounds. *ChemPhysChem* 10, 1405–1414. doi: 10.1002/cphc.200900270
- Monod, L., and Prendini, L. (2015). Evidence for Eurogondwana: the roles of dispersal, extinction and vicariance in the evolution and biogeography of Indo-Pacific Hormuridae (Scorpiones: Scorpionoidea). *Cladistics* 31, 71–111. doi: 10.1111/cla.12067
- Moraga-Cid, G., and Peoples, R. W. (2011). A Single Phenylalanine Residue in the Main Intracellular Loop of  $\alpha 1$   $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A and Glycine Receptors Influences Their Sensitivity to Propofol. *PERIOPERATIVE MEDICINE*.
- Moreels, L., Peigneur, S., Yamaguchi, Y., Vriens, K., Waelkens, E., Zhu, S., et al. (2017). Expanding the pharmacological profile of  $\kappa$ -hefutoxin 1 and analogues: A focus on the inhibitory effect on the oncogenic channel Kv10.1. *Peptides* 98, 43–50. doi: 10.1016/j.peptides.2016.08.008
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799–802. doi: 10.1038/260799a0
- Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X. H., Hopkins, W., et al. (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37, 15353–15362. doi: 10.1021/bi981255g
- Nilius, B. (2003). Pflugers Archiv and the advent of modern electrophysiology. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 447, 267–271. doi: 10.1007/s00424-003-1156-2
- Niu, Y., Yan, J., and Jiang, H. (2022). Anesthesia and developing brain: What have we learned from recent studies. *Front. Mol. Neurosci.* 15, 1017578. doi: 10.3389/fnmol.2022.1017578
- Nobili, L. (1828). Comparaison entre les deux galvanometres les plus sensibles, la et le multiplicateur a deux aiguilles, suivie quelques resultats nouveaux. 38, 225–245.
- Nocite, J. R. (1991). Mortalidade Associada à Anestesia: Estudos Epidemiológicos. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 41.
- Olamendi-Portugal, T., Csoti, A., Jimenez-Vargas, J. M., Gomez-Lagunas, F., Panyi, G., and Possani, L. D. (2017). Pi5 and Pi6, two undescribed peptides from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* and their effects on K<sup>+</sup>-channels. *Toxicon* 133, 136–144. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.05.011
- Ortiz, E., Gurrola, G. B., Schwartz, E. F., and Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon* 93, 125–135. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.11.233
- Overton, E. (1902). Beitrage zur allgemeinen Muskel und Nervenphysiologie. *Pflugers Arch.* 92, 346–386.
- Pak, O. S., Young, Y. N., Marple, G. R., Veerapaneni, S., and Stone, H. A. (2015). Gating of a mechanosensitive channel due to cellular flows. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 9822–9827. doi: 10.1073/pnas.1512152112
- Pal, D., Jones, J. M., Wisidagamage, S., Meisler, M. H., and Mashour, G. A. (2015). Reduced Nav1.6 Sodium Channel Activity in Mice Increases In Vivo Sensitivity to Volatile Anesthetics. *PLOS ONE* 10, e0134960. doi: 10.1371/journal.pone.0134960
- Pardo, M. C. (2018). *Miller's Basics of Anesthesia*. Philadelphia, PA.
- Parent, A. (2004). Giovanni Aldini: From animal electricity to human brain stimulation. *Canadian Journal of Neurological Sciences* 31, 576–584. doi: 10.1017/S0317167100003851

- Payandeh, J., and Minor, D. L. (2015). Bacterial voltage-gated sodium channels (BacNaVs) from the soil, sea, and salt lakes enlighten molecular mechanisms of electrical signaling and pharmacology in the brain and heart. *Journal of Molecular Biology* 427, 3–30. doi: 10.1016/j.jmb.2014.08.010
- Peigneur, S., da Costa Oliveira, C., de Sousa Fonseca, F. C., McMahon, K. L., Mueller, A., Cheneval, O., et al. (2021). Small cyclic sodium channel inhibitors. *Biochem Pharmacol* 183, 114291. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114291
- Peigneur, S., Esaki, N., Yamaguchi, Y., Tytgat, J., and Sato, K. (2016). Effects of deletion and insertion of amino acids on the activity of HelaTx1, a scorpion toxin on potassium channels. *Toxicon* 111, 1–5. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.12.014
- Peigneur, S., Yamaguchi, Y., Goto, H., Srinivasan, K. N., Gopalakrishnakone, P., Tytgat, J., et al. (2013). Synthesis and characterization of amino acid deletion analogs of  $\kappa$ -hefutoxin 1, a scorpion toxin on potassium channels. *Toxicon* 71, 25–30. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.05.010
- Perouansky, M. (2012). The Quest for a Unified Model of Anesthetic Action. *Anesthesiology* 117, 465–474. doi: 10.1097/ALN.0b013e318264492e
- Piccolino, M. (1998). Animal electricity and the birth of electrophysiology: The legacy of Luigi Galvani. *Brain Research Bulletin* 46, 381–407. doi: 10.1016/S0361-9230(98)00026-4
- Piccolino, M., and Bresadola, M. (2002). Drawing a spark from darkness: John Walsh and electric fish.
- Pifferi, A., Chiaino, E., Fernandez-Abascal, J., Bannon, A. C., Davey, G. P., Frosini, M., et al. (2024). Exploring the Regulation of Cytochrome P450 in SH-SY5Y Cells: Implications for the Onset of Neurodegenerative Diseases. *IJMS* 25, 7439. doi: 10.3390/ijms25137439
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47, 1597–1598. doi: 10.1194/jlr.E600002-JLR200
- Pincus, E. (2019). Regional Anesthesia: An Overview. *Regional Anesthesia* 110.
- Pocock, R. I. (1893). LIII.—Notes on the classification of scorpions, followed by some observations upon synonymy, with descriptions of new genera and species. *Annals and Magazine of Natural History* 70, 303–330. doi: 10.1080/00222939308677626
- Poudel, R., Bhusal, Y., Tharu, B., and Kafle, N. (2017). Role of zinc in insulin regulation and diabetes. *Journal of Social Health and Diabetes* 05, 83–87. doi: 10.1055/s-0038-1676241
- Prindle, A., Liu, J., Asally, M., Ly, S., Garcia-Ojalvo, J., and Süel, G. M. (2015). Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature* 527, 59–63. doi: 10.1038/nature15709
- PubChem (2024). Sevoflurane. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5206> (Accessed July 2, 2024).
- Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J. M., Gurrola, G. B., Valdivia, H. H., and Possani, L. D. (2013). Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon* 76, 328–342. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.07.012
- Raghavan, M., Fee, D., and Barkhaus, P. E. (2019). “Generation and propagation of the action potential,” in *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier B.V.), 3–22. doi: 10.1016/B978-0-444-64032-1.00001-1
- Raines, D. E., Korten, S. E., Hill, W. A. G., and Miller, K. W. (1993). Anesthetic Cutoff in Cycloalkanemethanols: A Test of Current Theories. *Anesthesiology* 78, 918–927. doi: 10.1097/00000542-199305000-00017

- Ramu, Y., Xu, Y., and Lu, Z. (2018). A novel high-affinity inhibitor against the human ATP-sensitive Kir6.2 channel. *Journal of General Physiology* 150, 969–976. doi: 10.1085/jgp.201812017
- Ramu, Y., Yamakaze, J., Zhou, Y., Hoshi, T., and Lu, Z. (2022). Blocking Kir6.2 channels with SpTx1 potentiates glucose-stimulated insulin secretion from murine pancreatic  $\beta$  cells and lowers blood glucose in diabetic mice. *eLife* 11, e77026. doi: 10.7554/eLife.77026
- Rehberg, B., Xiao, Y. H., and Duch, D. S. (1996). Central nervous system sodium channels are significantly suppressed at clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesthesiology* 84, 1223–1233. doi: 10.1097/00000542-199605000-00025
- Rein, J. O. (2024a). The Scorpion Files - Hormuridae. Available at: <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/hormuridae.php> (Accessed January 4, 2024).
- Rein, J. O. (2024b). The Scorpion Files - Main Page. Available at: <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/> (Accessed January 4, 2024).
- Remedi, M. S., and Koster, J. C. (2010). KATP channelopathies in the pancreas. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 460, 307–320. doi: 10.1007/s00424-009-0756-x
- Richards, K. S., Swensen, A. M., Lipscombe, D., and Bommert, K. (2007). Novel CaV2.1 clone replicates many properties of Purkinje cell CaV2.1 current. *European Journal of Neuroscience* 26, 2950–2961. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05912.x
- Robbins, C. A., and Tempel, B. L. (2012). Kv1.1 and Kv1.2: Similar channels, different seizure models. *Epilepsia* 53, 134–141. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03484.x
- Robinson, D. H., and Toledo, A. H. (2012). Historical Development of Modern Anesthesia. *Journal of Investigative Surgery* 25, 141–149. doi: 10.3109/08941939.2012.690328
- Rodríguez De La Vega, R. C., Merino, E., Becerril, B., and Possani, L. D. (2003). Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins. *Trends in Pharmacological Sciences* 24, 222–227. doi: 10.1016/S0165-6147(03)00080-4
- Rorsman, P., and Ashcroft, F. M. (2018). Pancreatic  $\beta$ -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiological Reviews* 98, 117–214. doi: 10.1152/physrev.00008.2017
- Rossier, M. F. (2016). T-Type Calcium Channel: A Privileged Gate for Calcium Entry and Control of Adrenal Steroidogenesis. *Front. Endocrinol.* 7. doi: 10.3389/fendo.2016.00043
- Safford, W. E. (1915). AN AZTEC NARCOTIC(Lophophora williamsti): So-called “Sacred Mushroom,” or Teonanacatl, Still in Use by the Indians of Mexico and the United States, Producing Hallucinations of a Remarkable Nature, Is Identified with the Peyotl Zacatecensis, or Devil’s Root of Ancient Mexico, and the “Mescal Button” of Texas1. *Journal of Heredity* 6, 291–311. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a109130
- Sakmann, B., and Neher, E. (1984). Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes. *Annual Review of Physiology* 46, 455–472. doi: 10.1146/annurev.ph.46.030184.002323
- Salkoff, L., and Wyman, R. (1981). Genetic modification of potassium channels in Drosophila Shaker mutants. *Nature* 293, 228–230. doi: 10.1038/293228a0
- Sang, L., Vieira, D. C. O., Yue, D. T., Ben-Johny, M., and Dick, I. E. (2021). The molecular basis of the inhibition of CaV1 calcium-dependent inactivation by the distal carboxy tail. *J Biol Chem* 296, 100502. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100502

- Santos, R. M., Rosario, L. M., Nadal, A., Garcia-Sancho, J., Soria, B., and Valdeolmillos, M. (1991). Widespread synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* 418, 417–422. doi: 10.1007/BF00550880
- Sarmiento, B. E. (2019). Caracterização eletrofisiológica de uma K-KTx obtida da peçonha doescorpião *Opisthacanthus cayaporum*, OcyC9, e de seu análogo OcyC9 MOD. Brasília: Universidade de Brasília. Available at: <http://repositorio2.unb.br/jspui/handle/10482/47425>
- Sarmiento, B. E., Menezes, L. F. S., and Schwartz, E. F. (2019). Insulin release mechanism modulated by toxins isolated from animal venoms: From basic research to drug development prospects. *Molecules* 24, 1–31. doi: 10.3390/molecules24101846
- Saucedo, A. L., Flores-Solis, D., Rodríguez De La Vega, R. C., Ramírez-Cordero, B., Hernández-López, R., Cano-Sánchez, P., et al. (2012). New Tricks of an Old Pattern. *Journal of Biological Chemistry* 287, 12321–12330. doi: 10.1074/jbc.M111.329607
- Scheibler, P., Kronfeld, A., Illes, P., and Allgaier, C. (1999). Trichloroethanol impairs NMDA receptor function in rat mesencephalic and cortical neurones. *Eur J Pharmacol* 366, R1-2. doi: 10.1016/S0014-2999(98)00924-8
- Scheller, M. S., Saidman, L. J., and Partridge, B. L. (1988). MAC of sevoflurane in humans and the New Zealand white rabbit. *Can J Anaesth* 35, 153–156. doi: 10.1007/BF03010656
- Schwartz, E. F., Bartok, A., Schwartz, C. A., Papp, F., Gómez-Lagunas, F., Panyi, G., et al. (2013). OcyKTx2, a new K<sup>+</sup>-channel toxin characterized from the venom of the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides* 46, 40–46. doi: 10.1016/j.peptides.2013.04.021
- Schwartz, E. F., Camargos, T. S., Zamudio, F. Z., Silva, L. P., Bloch, C., Caixeta, F., et al. (2008). Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* 51, 1499–1508. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.03.029
- Schwerin, S., Kopp, C., Pircher, E., Schneider, G., Kreuzer, M., Haseneder, R., et al. (2021). Attenuation of Native Hyperpolarization-Activated, Cyclic Nucleotide-Gated Channel Function by the Volatile Anesthetic Sevoflurane in Mouse Thalamocortical Relay Neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14, 1–16. doi: 10.3389/fncel.2020.606687
- Selvakumar, P., Fernández-Mariño, A. I., Khanra, N., He, C., Paquette, A. J., Wang, B., et al. (2022). Structures of the T cell potassium channel Kv1.3 with immunoglobulin modulators. *Nat Commun* 13, 3854. doi: 10.1038/s41467-022-31285-5
- Shafer, A., Doze, V. A., Shafer, S. L., and White, P. F. (1988). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Propofol Infusions during General Anesthesia. *Anesthesiology* 69, 348–356. doi: 10.1097/00000542-198809000-00011
- Sieghart, W., and Savić, M. M. (2018). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVI: GABA<sub>A</sub> Receptor Subtype- and Function-selective Ligands: Key Issues in Translation to Humans. *Pharmacol Rev* 70, 836–878. doi: 10.1124/pr.117.014449
- Sigworth, F. J., and Neher, E. (1980). Single Na<sup>+</sup> channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature* 287, 447–449. doi: 10.1038/287447a0
- Silva, É. C. N., Camargos, T. S., Maranhão, A. Q., Silva-Pereira, I., Silva, L. P., Possani, L. D., et al. (2009). Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* 54, 252–261. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.04.010

- Simone, Y., and van der Meijden, A. (2021). Armed stem to stinger: a review of the ecological roles of scorpion weapons. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 27, e20210002. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0002
- Srinivasan, K. N., Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, T. K. S., et al. (2002). kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *The Journal of biological chemistry* 277, 30040–30047. doi: 10.1074/jbc.M111258200
- Staruschenko, A., Ma, R., Palygin, O., and Dryer, S. E. (2023). Ion channels and channelopathies in glomeruli. *Physiological Reviews* 103, 787–854. doi: 10.1152/physrev.00013.2022
- Stock, L., Hosoume, J., Cirqueira, L., and Treptow, W. (2018). Binding of the general anesthetic sevoflurane to ion channels. *PLoS Computational Biology* 14. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006605
- Stock, L., Hosoume, J., and Treptow, W. (2017). Concentration-Dependent Binding of Small Ligands to Multiple Saturable Sites in Membrane Proteins. *Sci Rep* 7, 5734. doi: 10.1038/s41598-017-05896-8
- Strang, C., Cushman, S. J., DeRubeis, D., Peterson, D., and Pfaffinger, P. J. (2001). A Central Role for the T1 Domain in Voltage-gated Potassium Channel Formation and Function. *Journal of Biological Chemistry* 276, 28493–28502. doi: 10.1074/jbc.M010540200
- Tang, L., El-Din, T. M. G., Swanson, T. M., Pryde, D. C., Scheuer, T., Zheng, N., et al. (2016). Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel by Ca<sup>2+</sup> antagonist drugs. *Nature* 537, 117–121. doi: 10.1038/nature19102
- Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1987). Sequence of a Probable Potassium Channel Component Encoded at *Shaker* Locus of *Drosophila*. *Science* 237, 770–775. doi: 10.1126/science.2441471
- Tibery, D. V. (2024). Unveiling Tst3, a Multi-Target Gating Modifier Scorpion  $\alpha$  Toxin from *Tityus stigmurus* Venom of Northeast Brazil: Evaluation and Comparison with Well-Studied Ts3 Toxin of *Tityus serrulatus*.
- Tsujino, A., Maertens, C., Ohno, K., Shen, X.-M., Fukuda, T., Harper, C. M., et al. (2003). Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7377–7382. doi: 10.1073/pnas.1230273100
- Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., and Martin-Eauclaire, M.-F. (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms:  $\alpha$ -KTx molecular subfamilies. doi: 10.1016/s0165-6147(99)01398-x
- Vacher, H., Mohapatra, D. P., and Trimmer, J. S. (2008). Localization and Targeting of Voltage-Gated Ion Channels in Mammalian Central Neurons. *Physiol Rev* 88, 1407–1447. doi: 10.1152/physrev.00002.2008
- Vakilian, M., Tahamtani, Y., and Ghaedi, K. (2019). A review on insulin trafficking and exocytosis. *Gene* 706, 52–61. doi: 10.1016/j.gene.2019.04.063
- Van Der Meijden, A., Herrel, A., and Summers, A. (2010). Comparison of chela size and pincer force in scorpions; getting a first grip. *Journal of Zoology* 280, 319–325. doi: 10.1111/j.1469-7998.2009.00628.x
- Van Hese, L., Theys, T., Absalom, A. R., Rex, S., and Cuypers, E. (2020). Comparison of predicted and real propofol and remifentanyl concentrations in plasma and brain tissue during target-

- controlled infusion: a prospective observational study. *Anaesthesia* 75, 1626–1634. doi: 10.1111/anae.15125
- Vandendriessche, T., Kopljar, I., Jenkins, D. P., Diego-Garcia, E., Abdel-Mottaleb, Y., Vermassen, E., et al. (2012). Purification, molecular cloning and functional characterization of HelaTx1 (Heterometrus laoticus): The first member of a new  $\kappa$ -KTX subfamily. *Biochemical Pharmacology* 83, 1307–1317. doi: 10.1016/j.bcp.2012.01.021
- Verkhatsky, A., and Parpura, V. (2014). “History of Electrophysiology and the Patch Clamp,” in *Patch-Clamp Methods and Protocols*, eds. M. Martina and S. Taverna (New York, NY: Springer), 1–19. doi: 10.1007/978-1-4939-1096-0\_1
- Vivekanandam, V., Munot, P., Hanna, M. G., and Matthews, E. (2020). Skeletal Muscle Channelopathies. *Neurologic Clinics* 38, 481–491. doi: 10.1016/j.ncl.2020.04.003
- Vuilleumier, P. H., Fritsche, R., Schliessbach, J., Schmitt, B., Arendt-Nielsen, L., Zeilhofer, H. U., et al. (2018). Mutations affecting glycinergic neurotransmission in hyperekplexia increase pain sensitivity. *Brain* 141, 63–71. doi: 10.1093/brain/awx289
- Wallin, R. F., Regan, B. M., Napoli, M. D., and Stern, I. J. (1975). Sevoflurane: a new inhalational anesthetic agent. *Anesth Analg* 54, 758–766. doi: 10.1213/00000539-197511000-00021
- Wang, J., Ou, S. W., and Wang, Y. J. (2017a). Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system. *Channels* 11, 534–554. doi: 10.1080/19336950.2017.1380758
- Wang, J., Ou, S.-W., Bai, Y.-F., Wang, Y.-J., Xu, Z.-Q. D., and Luan, G.-M. (2017b). Multiple Nav1.5 isoforms are functionally expressed in the brain and present distinct expression patterns compared with cardiac Nav1.5. *Molecular Medicine Reports* 16, 719–729. doi: 10.3892/mmr.2017.6654
- Weiskopf, R. B., Nau, C., and Strichartz, G. R. (2002). Drug chirality in anesthesia. *Anesthesiology* 97, 497–502. doi: 10.1097/00000542-200208000-00029
- Weiss, N., and Zamponi, G. W. (2024). The T-type calcium channelosome. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 476, 163–177. doi: 10.1007/s00424-023-02891-z
- Wessler, I., and Kirkpatrick, C. J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British J Pharmacology* 154, 1558–1571. doi: 10.1038/bjp.2008.185
- Westenbroek, E., Merrick, K., and Catterall, W. A. (1989). Differential Subcellular localization of the RI and RII Na<sup>+</sup> Channel Subtypes in Central Neurons. *Neuron* 3, 695–704. doi: 10.1016/0896-6273(89)90238-9
- Wisedchaisri, G., and Gamal El-Din, T. M. (2022). Druggability of Voltage-Gated Sodium Channels—Exploring Old and New Drug Receptor Sites. *Front. Pharmacol.* 13, 858348. doi: 10.3389/fphar.2022.858348
- Woll, K. A., Peng, W., Liang, Q., Zhi, L., Jacobs, J. A., Maciunas, L., et al. (2017). Photoaffinity Ligand for the Inhalational Anesthetic Sevoflurane Allows Mechanistic Insight into Potassium Channel Modulation. *ACS Chemical Biology* 12, 1353–1362. doi: 10.1021/acscchembio.7b00222
- Woll, K. A., Zhou, X., Bhanu, N. V., Garcia, B. A., Covarrubias, M., Miller, K. W., et al. (2018). Identification of binding sites contributing to volatile anesthetic effects on GABA type A receptors. *FASEB j.* 32, 4172–4189. doi: 10.1096/fj.201701347R

- Xia, Z., He, D., Wu, Y., Kwok, H. F., and Cao, Z. (2023). Scorpion venom peptides: Molecular diversity, structural characteristics, and therapeutic use from channelopathies to viral infections and cancers. *Pharmacological Research* 197, 106978. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106978
- Xiao, J., Chen, Z., and Yu, B. (2020). A Potential Mechanism of Sodium Channel Mediating the General Anesthesia Induced by Propofol. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14, 1–16. doi: 10.3389/fncel.2020.593050
- Yamaji, N., Dai, L., Sugase, K., Andriantsiferana, M., Nakajima, T., and Iwashita, T. (2004). Solution structure of IsTX: A male scorpion toxin from *Opisthacanthus madagascariensis* (Ischnuridae). *European Journal of Biochemistry* 271, 3855–3864. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04322.x
- Yamakura, T., Sakimura, K., Shimoji, K., and Mishina, M. (1995). Effects of propofol on various AMPA-, kainate- and NMDA-selective glutamate receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience Letters* 188, 187–190. doi: 10.1016/0304-3940(95)11431-U
- Yang, E., Bu, W., Suma, A., Carnevale, V., Grasty, K. C., Loll, P. J., et al. (2021). Binding Sites and the Mechanism of Action of Propofol and a Photoreactive Analogue in Prokaryotic Voltage-Gated Sodium Channels. *ACS Chemical Neuroscience* 12, 3898–3914. doi: 10.1021/acscchemneuro.1c00495
- Yang, E., Granata, D., Eckenhoff, R. G., Carnevale, V., and Covarrubias, M. (2018). Propofol inhibits prokaryotic voltage-gated Na<sup>+</sup> channels by promoting activation-coupled inactivation. *Journal of General Physiology* 150, 1299–1316. doi: 10.1085/jgp.201711924
- Yang, S.-N., and Berggren, P.-O. (2005). CaV2.3 channel and PKC $\lambda$ : new players in insulin secretion. *Journal of Clinical Investigation* 115, 16–20. doi: 10.1172/jci23970
- Yang, X.-D., and Yang, Y.-Y. (2024). Clinical Pharmacokinetics of Semaglutide: A Systematic Review. *Drug Des Devel Ther* 18, 2555–2570. doi: 10.2147/DDDT.S470826
- Yao, X., Gao, S., and Yan, N. (2024). Structural biology of voltage-gated calcium channels. *Channels* 18, 2290807. doi: 10.1080/19336950.2023.2290807
- Yokawa, K., Kagenishi, T., and Baluška, F. (2019). Anesthetics, Anesthesia, and Plants. *Trends in Plant Science* 24, 12–14. doi: 10.1016/j.tplants.2018.10.006
- Yokoyama, T., Minami, K., Sudo, Y., Horishita, T., Ogata, J., Yanagita, T., et al. (2011). Effects of sevoflurane on voltage-gated sodium channel Nav1.8, Nav1.7, and Nav1.4 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Anesth* 25, 609–613. doi: 10.1007/s00540-011-1167-7
- Yoshikawa, H., Hellström-Lindhahl, E., and Grill, V. (2005). Evidence for functional nicotinic receptors on pancreatic  $\beta$  cells. *Metabolism* 54, 247–254. doi: 10.1016/j.metabol.2004.08.020
- Zaugg, M., Lucchinetti, E., Spahn, D. R., Pasch, T., Garcia, C., and Schaub, M. C. (2002). Differential effects of anesthetics on mitochondrial KATP channel activity and cardiomyocyte protection. *Anesthesiology* 97, 15–23. doi: 10.1097/00000542-200207000-00004
- Zeng, X.-C., Corzo, G., and Hahin, R. (2005). Scorpion Venom Peptides without Disulfide Bridges. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* 57, 13–21. doi: 10.1080/15216540500058899
- Zhang, Y., Zhang, R., Zeng, X., and Song, C. (2016). The inhibitory effect of propofol on Kv2.1 potassium channel in rat parietal cortical neurons. *Neuroscience Letters* 616, 93–97. doi: 10.1016/j.neulet.2016.01.058
- Zhou, C. (2012). General anesthesia mediated by effects on ion channels. *World Journal of Critical Care Medicine* 1, 80. doi: 10.5492/wjccm.v1.i3.80

- Zhou, Q., Hao, G., Xie, W., Chen, B., Lu, W., Wang, G., et al. (2024). Exenatide reduces atrial fibrillation susceptibility by inhibiting hKv1.5 and hNav1.5 channels. *Journal of Biological Chemistry* 300, 107294. doi: 10.1016/j.jbc.2024.107294
- Zhou, W., and Guan, Z. (2021). Ion Channels in Anesthesia. *Adv Exp Med Biol* 1349, 401–413. doi: 10.1007/978-981-16-4254-8\_19
- Zhu, S., Gao, B., Peigneur, S., and Tytgat, J. (2020). How a Scorpion Toxin Selectively Captures a Prey Sodium Channel: The Molecular and Evolutionary Basis Uncovered. *Molecular Biology and Evolution* 37, 3149–3164. doi: 10.1093/molbev/msaa152
- Zoli, M., Pistillo, F., and Gotti, C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* 96, 302–311. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.11.003
- Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., and Gotti, C. (2018). Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *CN* 16, 338–349. doi: 10.2174/1570159X15666170912110450