

UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais – POSMAT

Carlos Alberto Zanutto Bassetto Junior

**ESTUDO DA ATIVIDADE BLOQUEADORA DE *N*-ALQUILSULFONAMIDAS
EM CANAIS IÔNICOS, COM ÊNFASE EM CANAIS PARA POTÁSSIO**

PRESIDENTE PRUDENTE

2016

Carlos Alberto Zanutto Bassetto Júnior

**ESTUDO DA ATIVIDADE BLOQUEADORA DE *N*-ALQUILSULFONAMIDAS
EM CANAIS IÔNICOS, COM ÊNFASE EM CANAIS PARA POTÁSSIO**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, área de concentração de Biomateriais.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo René Pérez González

PRESIDENTE PRUDENTE

2016

Bassetto Jr, Carlos Alberto Zanutto.

Estudo da atividade bloqueadora de n-alquilsulfonamidas em canais iônicos, com ênfase em canais para potássio / Carlos Alberto Zanutto Bassetto Junior, 2016

118 f. : il.

Orientador: Eduardo René Pérez González

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2016

1. $K_v3.1$. 2. Benzenossulfonamidas. 3. *Patch-Clamp*. 4. Bloqueador de canal aberto. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. II. Título.



ATA DA DEFESA FECHADA DA TESE DE DOUTORADO DE CARLOS ALBERTO ZANUTTO BASSETTO JÚNIOR, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 23 dias do mês de junho do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Fechada, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. EDUARDO RENE PEREZ GONZALEZ - Orientador(a) do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP/Presidente Prudente, Prof. Dr. ALDO R. AQUILES RODRIGUES do(a) Departamento de Bioquímica, Farmacologia e Fisiologia / Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Prof. Dr. RICARDO MAURÍCIO XAVIER LEÃO do(a) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo, Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN do(a) Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara, Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências de Bauru, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição fechada da TESE DE DOUTORADO de CARLOS ALBERTO ZANUTTO BASSETTO JÚNIOR, intitulada ESTUDO DA ATIVIDADE BLOQUEADORA DE NALQUIL-SULFONAMIDAS EM CANAIS IÔNICOS, COM ÊNFASE EM CANAIS PARA POTÁSSIO. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. EDUARDO RENE PEREZ GONZALEZ

Prof. Dr. ALDO R. AQUILES RODRIGUES

Prof. Dr. RICARDO MAURÍCIO XAVIER LEÃO

Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN

Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO

A minha família, pelo exemplo de amor, carinho, compreensão e ajuda.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por mais esta oportunidade de estudo, trabalho e progresso.

A meus pais Rosângela e Carlos, minhas irmãs Jamile e Mariana e não menos importante, a minha esposa, Gethiely, pela compreensão nos momentos difíceis, ajuda nos momentos importantes e ao amor em todos os momentos, principalmente quando a minha ausência foi mais sentida.

Ao meu orientador Professor Dr. Eduardo René Pérez González, pela oportunidade, orientação, confiança, ensinamentos e amizade nesses anos de trabalho.

Ao Professor Dr. Wamberto Antônio Varanda, pela acolhida em seu laboratório, pela amizade e ensinamentos em todos os aspectos.

Aos técnicos Fernando Aguiar e André Dagostin pelo auxílio técnico, amizade e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos e colegas de laboratório Pedro, Júnia, Melina. A amizade compartilhada nestes anos de trabalho tornaram a tarefa mais alegre e divertida.

Aos meus amigos de sempre que me auxiliaram nas mais diversas situações.

À Carina Couto Martins e demais colegas do Laboratório de Química Orgânica Fina de Presidente Prudente e do Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas da UNICAMP, pela síntese e caracterização das moléculas estudadas.

Ao Professor Dr. Alviçlér Magalhães pela robusta caracterização das moléculas por Técnicas uni e bidimensionais de RMN.

À Professora Roseli Bega, minha prima, pelas correções ortográficas.

À FAPESP e ao CNPq pelos equipamentos.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

*A lógica pode levar de um ponto “A” a um ponto “B”.
A imaginação pode levar a qualquer lugar.*

Albert Einstein

BASSETTO JR, C. A. Z. “Estudo da atividade bloqueadora, de *N*-alquilsulfonamidas em canais iônicos, com ênfase em canais para potássio.” 2016. 118f. Tese (Doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais) - UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2016.

RESUMO

Esta tese teve como objetivo estudar as moléculas orgânicas (*N*-alquilbenzenossulfonamidas) como inibidoras de canais para potássio do tipo $K_v3.1$, heterologamente expressos em células L-929. Com o presente estudo constatou-se que as moléculas, *N*-alquilbenzenossulfonamidas, produzem efeitos inibitórios sobre $K_v3.1$. Através da técnica de *whole cell patch clamp*, observou-se que os valores de IC_{50} para as moléculas que bloquearam o canal foram 13,5 μ M, 16,9 μ M, 25,9 μ M, 34,2 μ M, 34,9 μ M e 60 μ M, respectivamente, para 4-cloro-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida (SMD2), 4-cloro-3-nitro-*N*-furfutilbenzenossulfonamida (SMD3), 4-[*N*-(3'aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida (SMD2_APP), 4-[*N*-(3'aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-*N*-furfutilbenzenossulfonamida (SMD3_APP), 4-cloro-*N*-butilbenzenossulfonamida (SMD2_SN) e 4-cloro-*N*-furfutilbenzenossulfonamida (SMD3_SN). O efeito de todas as moléculas mostrou-se reversível quanto à ligação com o canal e todas atuaram como bloqueadores de canal aberto. Em SMD2, molécula que mostrou o menor valor de IC_{50} , observou-se um deslocamento de -8 mV em relação ao controle, nas curvas de condutância *versus* voltagem, nas cinéticas de ativação e na recuperação a partir da inativação em relação à voltagem. O SMD2 não alterou as constantes de tempo de desativação, embora tenha mudado as constantes de ativação e inativação, além de ter induzido o fenômeno de *tail crossover*. Observou-se que para potenciais mais despolarizados, ocorreu o alívio do bloqueio (*Block Relief*). Não foi observado o efeito da dependência do pH para o bloqueio e SMD2 não mudou a seletividade do canal. Constatou-se que pulsos despolarizantes de curta duração induzem efeitos menos intensos, ao passo que pulsos despolarizantes mais longos, produzem efeitos mais intensos de SMD2 sobre o canal. Além disso, foi observado que, quanto mais o canal é usado, ou seja, aberto, mais ele é bloqueado por SMD2. Todos esses dados sugerem que SMD2 não interage com o estado fechado e nem com o estado inativado do canal, mas sim com seu estado aberto, apresentando também um efeito dependente de uso. De um ponto de vista farmacológico, isso indica que SMD2 pode ser uma molécula importante na modulação da atividade dos canais $K_v3.1$, presentes em células com altas frequências de disparos de potencial de ação, podendo constituir uma nova classe de moduladores farmacológicos desses canais.

Palavras-chaves: $K_v3.1$, Benzenossulfonamidas, *Patch-Clamp*, Bloqueador de canal aberto.

ABSTRACT

This thesis had the aim of studying the organic molecules (*N*-alkylbenzenesulfonamides) that block K_v3.1 potassium channel heterologously expressed in L-929 cells. It was found that *N*-alkylbenzenesulfonamides have restrained effects on K_v3.1. Through the whole cell patch clamp technique, it was observed that the values of IC₅₀, for molecules that block the channel, were 13,5 μM, 16,9 μM, 25,9 μM, 34,2 μM, 34,9 μM and 60 μM, respectively 4-Chloro-3-nitro-*N*-butylbenzenesulfonamide (SMD2), 4-Chloro-3-nitro-*N*-furfurylbenzenesulfonamide (SMD3), 4-[*N*-(3'-Aminopropyl)-2-pyrrolidone]-3-nitro-*N*-butylbenzenesulfonamide (SMD2_APP), 4-[*N*-(3'-Aminopropyl)-2-pyrrolidone]-3-nitro-*N*-furfurylbenzenesulfonamide (SMD3_APP), 4-Chloro-*N*-butylbenzenesulfonamide (SMD2_SN) e 4-Chloro-*N*-furfurylbenzenesulfonamide(SMD3_SN). The effect of all molecules was reversible regards to the linking with the channel and all act as open channel blocker. In SMD2, molecule which showed the smallest value of IC₅₀, it was observed a displacement of -8 mV compared to control, for conductance curves *versus* voltage, for the kinetics of activation and for the recovery from inactivation in relation to voltage. SMD2 did not change the deactivation of time constants, although it changed the activation and inactivation constants, and more, SMD2 have induced tail crossover phenomenon. It was observed that, for more depolarized potentials, there was a block relief. It was not observed the effect of pH dependence for the block and SMD2 did not change the channel selectivity. It was observed that, short duration depolarizing pulses prompt less intense effects, whereas long duration depolarizing pulses prompt more intense effects of SMD2 on the channels. Furthermore, it was observed that the more the channel is used, in an open state, the more it is blocked by SMD2. All of these data suggest that SMD2 does not interact neither with the closed state nor the inactivated state of channel, but with its open state presenting an use-dependent manner, also showing a use-dependent effect. In a pharmacological point of view, this indicates that SMD2 may be an important molecule in the modulation of the activity in the K_v3.1 channels, presents in cells with high frequency of firing of action potential and may constitute a new class of pharmacological modulators.

Keywords: K_v3.1; Benzenesulfonamides, Patch-Clamp, Open-Channel Blockers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modulação da frequência de PA pelos K _{Vs} . (WULFF; CASTLE; PARDO, 2009).....	17
Figura 2: Representação esquemática da topologia na membrana de um canal para potássio dependente de voltagem (DOYLE <i>et al.</i> , 1998; AIYAR <i>et al.</i> , 1994, BEZANILLA, 2008)...	22
Figura 3: Relação filogenética para alguns K _{Vs} (YU; CATTERALL, 2004).....	25
Figura 4: Topologia dos K _{V3} e a sequência de aminoácidos do link S3-S4. (LABRO <i>et al.</i> (2015).....	26
Figura 5: Mecanismos de bloqueio de canais para potássio (RUTA <i>et al.</i> , 2003).....	28
Figura 6: Estrutura das moléculas Prontosil®, <i>para</i> -aminobenzenossulfonamida, <i>para</i> -acetamidabenzenossulfonamida e do ácido <i>para</i> -aminobenzóico (BRUICE, 2006a, PETRI, 2005).....	31
Figura 7: Bloqueadores não seletivos e bloqueadores de K _{V3.1} (WULFF <i>et al.</i> , 2000; CHOI <i>et al.</i> 2001; SCHMITZ <i>et al.</i> , 2005; KIM <i>et al.</i> 2007; WULFF; ZHOROV, 2008; SUNG <i>et al.</i> 2008; SUNG; HAHN; CHOI, 2009; KOPLJAR <i>et al.</i> 2009).....	32
Figura 8: Base para protótipos de bloqueadores de K _{V3.1} , através de derivados do PABA e também de benzenossulfonamidas.....	33
Figura 9: Estrutura de TEA, 4-AP, Butilamina e Furfurilamina (GRISSMER <i>et al.</i> , 1994).....	34
Figura 10: Estrutura das aminolactâmas incorporadas (GONÇALVES <i>et al.</i> , 2011).....	35
Figura 11: Moléculas estudadas nesse trabalho.....	36
Figura 12. Esquema da síntese das moléculas Amostra 7, Amostra 8, Sar_APP e Sar_APA (GONÇALVES <i>et al.</i> 2011).....	42
Figura 13. Reação de substituição nucleofílica aromática das sulfonamidas SMD2, SMD2_SN, SMD3 e SMD3_SN (MARTINS <i>et al.</i> 2016).....	43
Figura 14. Reação de substituição nucleofílica aromática das sulfonamidas SMD2, SMD3 em SMD2_APP e SMD3_APP (MARTINS <i>et al.</i> 2016).....	44

Figura 15: Moléculas que não apresentaram efeitos inibitórios sobre Kv3.1.....	47
Figura 16: Efeitos inibitórios e reversibilidade das moléculas SMD2, SMD2_APP e SMD2_SN sobre os Kv3.1.....	48
Figura 17: Efeitos inibitórios e reversibilidade das moléculas SMD3, SMD3_APP e SMD3_SN sobre os Kv3.1.....	49
Figura 18: Traçados representativos de corrente dos Kv3.1 na presença de várias concentrações das moléculas que promoveram efeitos inibitórios sobre o canal.....	51
Figura 19: Curvas dose-resposta para a carga e para a corrente no final do pulso para as moléculas SMD2, SMD3, SMD2_APP, SMD3_APP, SMD2_SN e SMD3_SN.....	52
Figura 20: Estruturas moleculares de Amostra7, SMD2_APP, Amostra 8, Sar_APP, SMD3_APP, Sar_APA	55
Figura 21: Semelhanças estruturais entre as moléculas SMD2_SN, SMD2, SMD2_APP, SMD3_SN, SMD3 e SMD3_APP.....	57
Figura 22: Resposta de corrente em relação à voltagem aplicada sobre o canal Kv3.1.....	60
Figura 23: Dependência de voltagem do efeito de SMD2 em Kv3.1.....	64
Figura 24: Fração de bloqueio e concentração de potássio extracelular.....	66
Figura 25: Seletividade dos Kv3.1 não se altera na presença de SMD2.....	68
Figura 26: SMD2 muda a cinética de ativação de Kv3.1.....	70
Figura 27: SMD2 não muda a constante de tempo de desativação de Kv3.1.....	73
Figura 28: Efeito de SMD2 sobre o decurso temporal da inativação Tipo-U de Kv3.1.....	75
Figura 29: Efeito de SMD2 na dependência de voltagem da inativação em Kv3.1.....	77
Figura 30: Recuperação da cinética de inativação de Kv3.1.....	80
Figura 31: Efeito de SMD2 na dependência do uso do canal Kv3.1.....	82
Figura 32: Duração do pulso despolarizado em Kv3.1 aumenta o bloqueio por SMD2.	83

Figura 33: Traçados representativos do efeito de SMD2 para várias frequências de estimulação de K _v 3.1.....	85
Figura 34: Efeito da frequência de estimulação sobre a eficácia do bloqueio induzido por SMD2 em K _v 3.1.....	87
Figura 35: pH não promove efeito sobre o bloqueio de SMD2 em K _v 3.1.....	89
Figura 36: Representação da ligação de SMD2, utilizando o poro do canal KcsA como exemplo.....	94
Figura 37: Diagrama de estados para o bloqueio do canal na presença de SMD2.....	98
Figura 38: Diagrama de estado para o bloqueio do K _v 3.1 por SMD2.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Canais iônicos K_v , expressão e possibilidades terapêuticas.....	21
Tabela 2: Inibidores de canais iônicos e seus valores de IC_{50}	29
Tabela 3: Nomenclatura oficial e solubilidade das sulfonamidas.....	45
Tabela 4: Valores de IC_{50} e número de Hill, medidos pela carga e pela corrente.....	53
Tabela 5: Efeito inibitório das moléculas em $K_v3.1$	54

LISTAS DE ABREVIATURAS

Amostra 7 - Ácido 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitrobenzóico.

Amostra 8 - Ácido 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzóico.

APP - *N*-(3-aminopropil)-2-pirrolidona.

APA - *N*-(3-aminopropil)-2-azepanona.

CTX - Caribdotoxina.

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DTX - Dendrotoxina.

EGTA - Ethylene Glycol-bis(β -aminoethyl ether)-*N*, *N*, *N'*, *N'*-Tetraacetic Acid.

HEPES - *N*-(2-Hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid).

IC₅₀ - Concentração onde a carga transferida ou a corrente é 50% bloqueada.

K_{Ca} - Canais para potássio ativados por cálcio.

Kd(0) - Constante aparente de dissociação para a voltagem de 0 mV.

K_{IR} - Canais para potássio retificadores de entrada.

KTX - Kaliotoxina.

K_v - Canais para Potássio dependentes de voltagem.

K_{2P} - Canais para potássio de dois poros.

N - Coeficiente de Hill.

NTX - Noxiustoxina.

PABA - Ácido para-Aminobenzóico.

PDB - Protein Data Bank.

Sar_APP - ácido 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitrobenzenossulfônico.

Sar_APA - ácido 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzenossulfônico.

SMD2 - 4-cloro-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida.

SMD2_APP - 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida.

SMD2_SN - 4-cloro-*N*-butilbenzenossulfonamida.

SMD3 - 4-cloro-3-nitro-*N*-furfurilbenzenossulfonamida.

SMD3_APP - 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-*N*-furfurilbenzenossulfonamida.

SMD3_SN - 4-cloro-*N*-furfurilbenzenossulfonamida.

STM - Segmentos transmembrânicos.

TEA - Tetraetilamônio.

VSD - Domínio sensor de voltagem.

VST-Tx - Voltage sensor toxin – toxina da tarântula *Rammostola spatulata*.

TsTX-Kα - Tityustoxina-kapa-alfa.

δ - Fração de campo elétrico onde a molécula se liga ao canal.

4-AP - 4-Aminopiridina.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Canais para potássio.....	18
1.1.1.	Canais para potássio retificadores de entrada (<i>inward rectifiers-K_{IR}</i>).....	19
1.1.2.	Canais para potássio modulados por Ca ²⁺	19
1.1.3.	Canais para potássio com dois poros.....	20
1.1.4.	Canais para potássio dependentes de potencial.....	20
1.2.	Estrutura e funcionamento de canais para potássio.....	22
1.3.	Moléculas que inibem canais iônicos.....	27
1.4.	Benzenossulfonamidas.....	29
1.4.1.	Estratégia para a elaboração de protótipos de moléculas que possam atuar sobre canais K _V 3.1.....	31
1.4.2.	Grupamento amino.....	34
1.4.3.	Grupamento aminolactâmas.....	35
2.	OBJETIVOS.....	37
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1.	Medidas eletrofisiológicas.....	38
3.2.	Síntese das moléculas.....	41
4.	RESULTADOS.....	46
4.1.	Moléculas que promoveram efeito em canal K _V 3.1.....	46
4.1.1.	Curvas dose-resposta.....	50
4.1.2.	Relação estrutura-atividade de algumas moléculas analisadas.....	54
4.2.	Mecanismo de ação de SMD2 sobre o canal para potássio K _V 3.1.....	59
4.3.	O efeito de SMD2 no canal K _V 3.1 é dependente de voltagem.....	61
4.3.1.	Fração de bloqueio e as curvas de condutância.....	61
4.4.	Seletividade.....	67
4.5.	Efeito de SMD2 sobre as cinéticas de ativação, desativação e inativação do K _V 3.1.....	69
4.5.1.	Efeitos do SMD2 sobre a ativação dos canais K _V 3.1.....	69
4.5.2.	Efeitos sobre a desativação do canal K _V 3.1.....	71
4.5.2.	Efeitos sobre a inativação do canal K _V 3.1.....	73
4.5.3.1.	Efeito de SMD2 sobre decurso temporal da inativação.....	74
4.5.3.2.	Efeito de SMD2 sobre a dependência de voltagem da inativação do K _V 3.1.....	76
4.6.	Efeitos da molécula SMD2 na recuperação da inativação do canal K _V 3.1.....	78
4.6.1.	SMD2 altera a cinética de recuperação dos K _V 3.1.....	78
4.6.2.	SMD2 altera a dependência do uso do K _V 3.1 (<i>use-dependence</i>).....	81
4.6.3.	SMD2 modifica a resposta em relação a frequências de pulsos despolarizantes aplicados em K _V 3.1.....	84
4.7.	Dependência do pH no bloqueio de SMD2 em K _V 3.1.....	88
5.	DISCUSSÃO.....	90
6.	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS.....	103

APÊNDICE A – DESENVOLVIMENTO DA EQUAÇÃO DE HILL PARA A CARGA TRANSFERIDA.....	111
ANEXO I – CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DAS MOLÉCULAS UTILIZADAS NESSE TRABALHO.....	112
ANEXO II- DESENVOLVIMENTO DA EQUAÇÃO DE WOODHULL.....	116

1 INTRODUÇÃO

Prévio à introdução, é necessário mencionar que o presente trabalho é o fruto de uma colaboração entre o Laboratório de Química Orgânica Fina da Faculdade de Ciências e Tecnologia na Universidade Estadual Paulista, campus de Presidente Prudente, liderado pelo orientador Prof. Dr. Eduardo René Pérez González; o Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas da Unicamp sob direção do Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin e o Laboratório de Biofísica de Membranas do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, sob a supervisão do Prof. Dr. Wamberto Antonio Varanda.

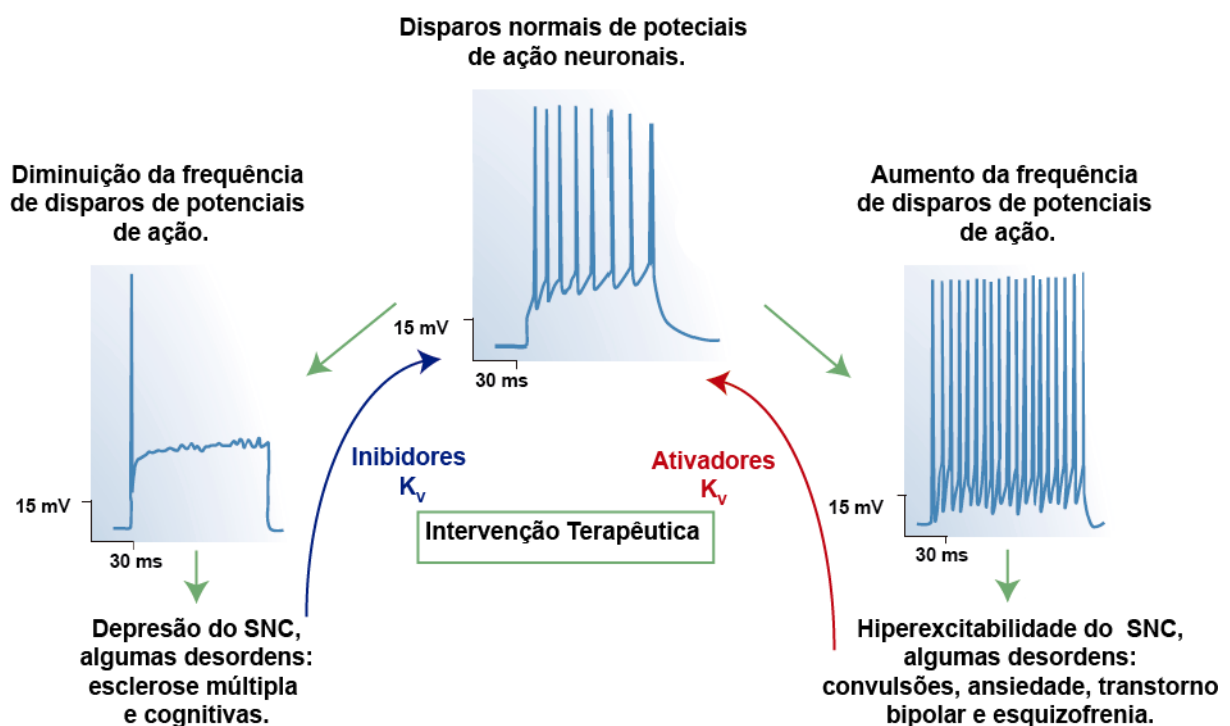
Organismos complexos necessitam de rápida e precisa transmissão de informação entre células e tecidos para estreita coordenação de inúmeras funções fisiológicas (YU e CATTERALL, 2004). Em biologia, desde bactérias até humanos, observa-se que a transmissão de informação pode envolver sinais elétricos e estes dependem da rápida e sensível resposta de canais iônicos dependentes de voltagem (*voltage-gated ion channel*) a pequenas variações no potencial de membrana (CATTERALL, 2012).

O processo de transmissão de informação se dá através da codificação, pela frequência de disparos de potenciais de ação (PA) nas fibras nervosas (WULFF; CASTLE; PARDO, 2009). Em células excitáveis, o início de um potencial de ação é comumente induzido pelo influxo de íons sódio ou cálcio, carregados por proteínas transmembrânicas específicas (canais para sódio e canais para cálcio), que promovem a despolarização da membrana celular. Desse processo decorre o aumento da probabilidade de abertura de canais para potássio dependentes de voltagem (K_{VS}), promovendo o início do mecanismo de repolarização da membrana (retorno da membrana ao potencial de repouso), terminando, assim, o decurso temporal do PA (HODGKIN; HUXLEY, 1952). Dessa forma, os canais para potássio atuam na gênese e na

regulação dos potenciais de membrana, responsabilizando-se por mecanismos de repolarização e manutenção do potencial de repouso.

Se não houverem mudanças nas propriedades cinéticas das correntes carreadas pelos canais para sódio e cálcio, pode-se presumir que os K_V s modulam a frequência de disparos e a forma de onda dos PAs. Assim, defeitos em K_V s expressos em células excitáveis neuronais, podem estar relacionados a certas patologias e, portanto, podem se constituir em alvos terapêuticos na tentativa de se recuperar a normalidade funcional. A figura 1 apresenta um esquema geral mostrando como a frequência de disparos de PA pode ser modificada pelos K_V s.

Figura 1: Modulação da frequência de disparos de PA pelos K_V s.



Em células excitáveis que tiveram sua frequência de PA reduzidas, levando a desordens cognitivas, podem ter seu quadro revertido para disparos normais, bloqueando os K_V s. Isto decorre do fato de que, em se bloqueando os K_V s, a membrana celular ficará mais despolarizada, aumentando a probabilidade de abertura de canais para sódio que induz o aumento da frequência de PAs. Por outro lado, em uma célula excitável, que está disparando em altas frequências, consegue-se reverter o quadro de desordens pelo uso de ativadores de K_V s, que farão com que a membrana fique mais hiperpolarizada, diminuindo a probabilidade de abertura de canais para sódio e diminuindo a frequência dos PAs. **Fonte:** Adaptado de (WULFF; CASTLE; PARDO, 2009).

Moléculas derivadas e análogas a benzenossulfonamidas são descritas na literatura com grande atividade biológica, desde bloqueadores de $K_v1.5$ (GROSS *et al.*, 2009), e Kir6.2 (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2000) a antimicrobianos, como as primeiras sulfonamidas testadas com atividade bacteriostática (BRUICE(a), 2006).

Nesta tese, foi encontrado que bioisósteros de *N*-Alquil-benzenossulfonamidas atuam como bloqueadores de canais $K_v3.1$. Dentre as moléculas estudadas, a 4-cloro-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida (denominada nesse trabalho como SMD2) foi a que apresentou o menor IC_{50} quando testada em $K_v3.1$. Sendo assim, aprofundou-se os testes com esta molécula com a finalidade de entender os mecanismos pelos quais atua sobre o $K_v3.1$. Esses canais são expressos em células que disparam PAs em altas frequências e possuem grande interesse farmacológico. Por exemplo, CHOI *et al.* (2001) propõe esses canais como alvo para agentes anticonvulsivantes, justificando-se a necessidade de desenvolvimento e do entendimento da atividade bloqueadora de novas moléculas nestes canais.

1.1 Canais para potássio

A diversidade de canais para potássio nas células serve a codificação de sinais, seja na determinação de salvas de disparos de potenciais de ação ou na determinação da atividade rítmica. São divididos em 4 grandes classes, de acordo com suas propriedades cinéticas de ativação, desativação e inativação, pelas propriedades farmacológicas e pela sua arquitetura. São divididos da seguinte forma: canais para potássio retificadores de entrada (K_{IR}), canais de dois poros (K_{2P}), canais ativados por cálcio (K_{Ca}); e canais para potássio dependentes de voltagem (HILLE, 2001). Nas próximas seções, serão abordadas brevemente as diferentes classes desses canais.

1.1.1. Canais para potássio retificadores de entrada (*inward rectifiers*- K_{IR})

Os canais para potássio retificadores de entrada (K_{IR}) (*inward rectifiers*) possuem entre suas variadas funções controlar o potencial de repouso da membrana, regular a atividade elétrica cardíaca e neuronal, manter o equilíbrio de eletrólitos e influenciar a secreção de insulina para manter o nível de glicose no sangue (LU, 2004). Eles foram primeiramente chamados de retificadores anômalos (*anomalous rectification*), por Katz em 1949, que observou um comportamento distinto daqueles apresentados pelos canais K_V retificadores tardios (*delayed rectifier*) (LU, 2004, TAO *et al.*, 2010). Esses canais apresentam uma condutância unitária maior em potenciais hiperpolarizados (LU, 2004, TAO *et al.*, 2010). Atualmente, sabe-se que há sete subfamílias distintas desses canais em vertebrados, sendo denominados Kir 1.x - Kir 7.x, onde x é o membro da subfamília (KUANG; PURHONEN; HEBERT, 2015).

1.1.2. Canais para potássio modulados por Ca^{2+}

Há canais para potássio que são modulados pelo aumento de Ca^{2+} livre no citoplasma. Dentro dessa subfamília, há três subtipos: BK (*big conductance* - K_{Ca}), com alta condutância (100pS-250pS), IK (*intermediate* K_{Ca}) com condutância intermediária (20-80pS) e SK (*Small* K_{Ca}) com baixa condutância (4-20pS). Evidentemente, essas não são as únicas características que definem esses canais. Eles também são caracterizados pela sensibilidade a bloqueadores, por propriedades biofísicas (dependência ou não de voltagem), tecidos em que são expressos e o quanto são sensíveis a Ca^{2+} . Por exemplo, os canais SK e IK não apresentam dependência de voltagem, enquanto que canais BK apresentam (HILLE, 2001). Ambos os canais IK e SK tem participação importante em processos que envolvem sinalização dependente de Ca^{2+} em

células excitáveis e não excitáveis (ALDRICH *et al.*, 2015.). Os canais BK exibem uma grande variedade de regiões onde são expressos e possuem importantes funções em células endoteliais, na excitabilidade celular, secreção e contração muscular (YANG; CUI, 2015).

1.1.3. Canais para potássio com dois poros

Esses canais possuem duas subunidades com duas alças reentrantes (*loops P*), ou seja, possuem dois poros. Esses canais, não apresentam dependência de voltagem e são responsáveis pela manutenção do potencial de repouso em várias células excitáveis (BRUNER *et al.*, 2014). Esses canais podem abrir e fechar com vários estímulos, por exemplo, anestésicos voláteis, mudanças de pH, neurotransmissores, além de terem funções de ajustar o potencial de membrana e regular a excitabilidade celular (PLANT; GOLDSTEIN, 2015).

1.1.4. Canais para potássio dependentes de potencial

Dentro da família de canais para potássio dependentes da diferença de potencial através da membrana, ou comumente chamados de dependentes de voltagem (Canais K_V), existem 12 subfamílias divididas de acordo com o local onde o canal é encontrado e com sua forma de expressão. A tabela 1 mostra o local de expressão e a possível importância terapêutica de alguns K_V .

Os canais para potássio dependentes de voltagem compreendem uma família de canais iônicos que desempenham papéis fundamentais na regulação da excitabilidade celular. Esses têm papel fundamental, determinando o decurso temporal e a forma de potenciais de ação, com impactos sobre as atividades de marca-passo de neurônios, modulando padrões de

disparos rítmicos e regulando a liberação de neurotransmissores (HILLE, 2001, RODRIGUES *et al.*, 2003).

Tabela 1: Canais iônicos K_V, expressão e possibilidades terapêuticas.

Canal K _V (Símbolo Genético)	Expressão	Possibilidades terapêuticas
K _V 1.1 (KCNA1)	Sistema Nervoso Central (SNC), nódulo de Ranvier e Rins	Inibidores de K _V 1.1 são sugeridos para epilepsia (WULFF; CASTLE; PARDO, 2009).
K _V 1.2 (KCNA2)	SNC	Ativadores ou inibidores de K _V 1.2 podem ser úteis para distúrbios convulsivos (WULFF; CASTLE; PARDO, 2009).
K _V 1.3 (KCNA3)	Células T e B, macrófagos, osteoclastos, SNC	Tratamento de esclerose múltipla, diabetes tipo 1 e artrite reumatóide (BEETON <i>et al.</i> , 2006; AZAM <i>et al.</i> , 2007).
K _V 1.5 (KCNA5)	Miócitos Cardíacos, SNC, micróglia, macrófagos.	Bloqueadores do canal K _V 1.5 podem funcionar como antiarrítmicos e desfibrilantes atriais (FORD; MILNES, 2008).
K _V 2.1 (KCNB1)	SNC, células β pancreáticas.	Bloqueio de K _V 2.1 sugerido como agente hiperglicêmico para diabetes tipo 2 (WULFF; CASTLE; PARDO, 2009).
K _V 3.1 (KCNC1)	SNC, Células β pancreáticas. Núcleo mediano dos neurônios do corpo trapezoidal.	Síndrome de QT longa (MEREDITH, 2015). Bloqueador de K _V 3.1 pode diminuir os disparos de potencial de ação e assim, agentes anticonvulsivantes. (CHOI <i>et al.</i> , 2001).
K _V 3.4 (KCNC4)	SNC e músculo esquelético	Bloqueadores de K _V 3.4 são sugeridos para tratamento da doença de Alzheimer (ANGULO <i>et al.</i> , 2004, PANNACCIONE <i>et al.</i> , 2007).
K _V 4.3 (KCND3)	SNC, miócitos ventricular e atrial, músculo liso.	Bloqueadores de K _V 4.3 podem ser úteis para em tratamento de arritmias (DIXON <i>et al.</i> , 1996).
K _V 10.1 (KCNH1)	SNC	Expressos abundantemente em células cancerígenas, dessa forma a inibição do canal K _V 10.1 pode ser útil para tratamento de câncer (PARDO <i>et al.</i> , 1999, HAEMMERLEIN <i>et al.</i> , 2006).

Fonte: Adaptado de (WULFF; CASTLE; PARDO, 2009).

Os segmentos transmembrânicos são arranjados simetricamente em torno do poro condutor central que possui quatro sensores de voltagem circundando-o. (BEZANILLA, 2008). Acredita-se que o segmento S4 atue como o principal componente do domínio sensor de voltagem, devido ao arranjo de resíduos de aminoácidos básicos (Arginina e Lisina) localizados nesse segmento. Tais resíduos são carregados positivamente atravessando completamente o campo elétrico da membrana. A carga efetiva desse segmento é denominada de carga de *gating*. Além disso, acredita-se que há um movimento ordenado entre os segmentos S1-S4 que catalisa o processo de abertura dos K_Vs (LACROIX *et al.*, 2014). A disposição estrutural dos segmentos S1-S4 constitui o domínio sensor de voltagem (*voltage sensor domain* - VSD). Cada subunidade que compõe o VSD move-se do estado de repouso para o estado ativado e quando as quatro subunidades alcançam o seu estado ativado não condutor ocorre um mecanismo orquestrado que acopla os eventos elétrico e mecânico que leva a condução iônica (KOPLJAR *et al.*, 2009).

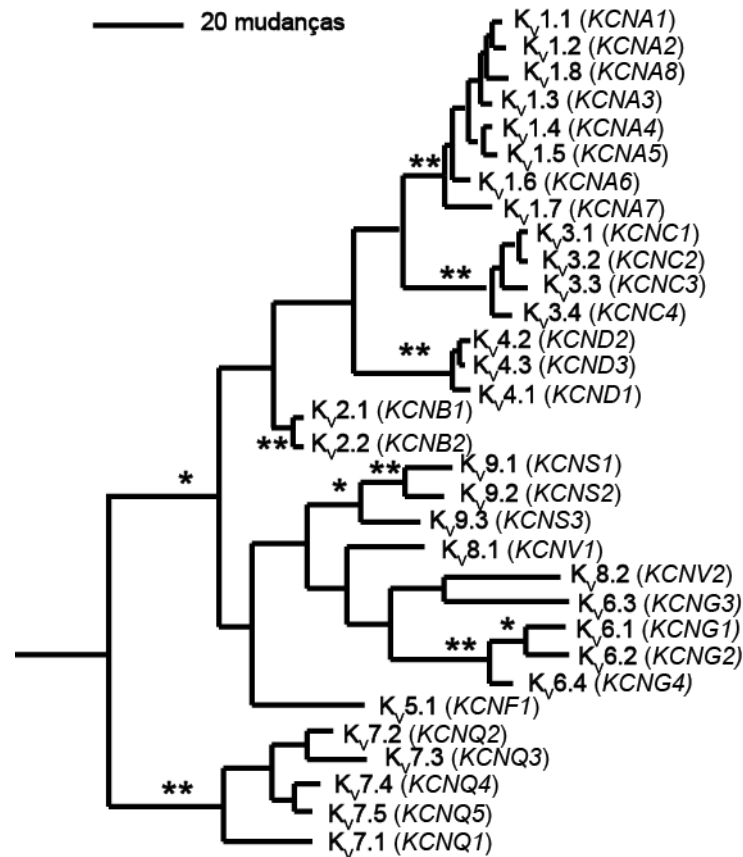
Os segmentos S5-S6, juntamente com a alça P, reentrante, formam o poro condutor do canal (*pore domain*, PD), que possui a sequência de amino ácidos TVGYG (Treonina (T), Valina (V), Glicina (G), Tirosina (Y)). Essa região constitui o filtro de seletividade e é considerada como *signature sequence*, numa tradução livre, sequência de assinatura dos K_Vs (DOYLE *et al.*, 1998; MORAIS-CABRAL, ZHOU, MACKINNON, 2001; LONG *et al.*, 2007). Essa sequência de aminoácidos é conservada dentro do poro da maioria dos canais para potássio conhecidos e as mutações nela, fazem com que os canais percam a habilidade de discriminarem entre os íons sódio e potássio (DOYLE *et al.*, 1998; LONG *et al.*, 2007). A ligação dos íons potássio com o oxigênio das carbonilas da sequência TVGYG, no interior do poro condutor, mimetizam as ligações de moléculas de água com os íons potássio, favorecendo energeticamente o processo de condução iônica.

Múltiplos estudos evidenciam a relação entre o dobramento do segmento S6 e a abertura do feixe helicoidal em sua extremidade intracelular como o mecanismo de abertura do poro para os K_{Vs} (CATTERALL, 2012). Em canais K_v , a sequência de aminoácidos sequencialmente ligados: prolina, valina e prolina (P-V-P) localizados no interior do segmento S6 são altamente conservados e parecem ser a região onde ocorre o dobramento e a subsequente abertura dos K_{Vs} . Sendo assim, essa região, em conjunto com os outros 3 segmentos S6, das outras subunidades ligadas, formam o *gate* principal de ativação do canal.

O mecanismo de abertura dos K_{Vs} pode ser sumarizado da seguinte forma: após a despolarização da membrana celular, os resíduos carregados em S4 (VSD) sentem a mudança do campo elétrico que promove a rotação desse segmento e passa a se deslocar para o lado extracelular da membrana (embora haja outra teoria, a teoria de *padle*, é a mais aceita, a teoria envolvendo a rotação do segmento S4). O deslocamento de S4 é transmitido para o segmento intracelular de S6 através da conexão intracelular entre os segmentos S4-S5 (*link* S4-S5). Assim, o *link* S4-S5 exerce trabalho em S6 que promove o dobramento na ligação dos resíduos P-V-P e como consequência disso, os 4 segmentos S6, de cada subunidade, se distanciam permitindo ao poro a condução do íon K^+ (BEZANILLA, 2008; CATTERALL, 2012).

Os diversos canais K_{Vs} possuem topologias semelhantes, principalmente na região que compreende o poro condutor, diferenciam-se nas sequências de aminoácidos que lhes conferem diferentes características e propriedades cinéticas para as diferentes subfamílias. A figura 3 mostra uma árvore filogenética, onde são evidenciadas as semelhanças dos K_{Vs} . Dessa forma, é razoável considerar que o funcionamento molecular dos $K_{V3.1}$ sejam semelhantes ao descrito para os K_{Vs} em geral. Com isso, e para finalizar essa seção, serão descritas algumas propriedades funcionais dos $K_{V3.1}$.

Figura 3: Relação filogenética para alguns K_Vs.



Os valores iniciais para o grau de identidade são reportados como: de 50 a 74% são representados por *, para valores de 75 a 100% por ** e aqueles que não têm apresentados nenhum símbolo possuem valores <49 %. A escala em barra corresponde ao número de mudanças necessário para explicar a diferença na sequência de aminoácidos das proteínas. A escala vertical não é precisa. **Fonte:** Adaptado de YU; CATTERALL, 2004.

Os canais para potássio retificadores tardios do tipo *Shaw*, são expressos em neurônios que disparam em altas frequências (GRISSMER *et al.*, 1992). Um desses canais, o K_V3.1, apresenta cinéticas de ativação e desativação muito rápidas e um elevado limiar de ativação (~10 mV) (GRISSMER *et al.*, 1992). Estas propriedades são cruciais para células que disparam potenciais de ação em alta frequência (LABRO *et al.*, 2015), tais como interneurônios neocorticais (GAN; KACZMAREK, 1998, LIEN; JONAS, 2003), neurônios do hipocampo (MCCROSSAN *et al.*, 2003), e neurônios auditivos (LI; KACZMAREK; PERNEY *et al.*, 2001).

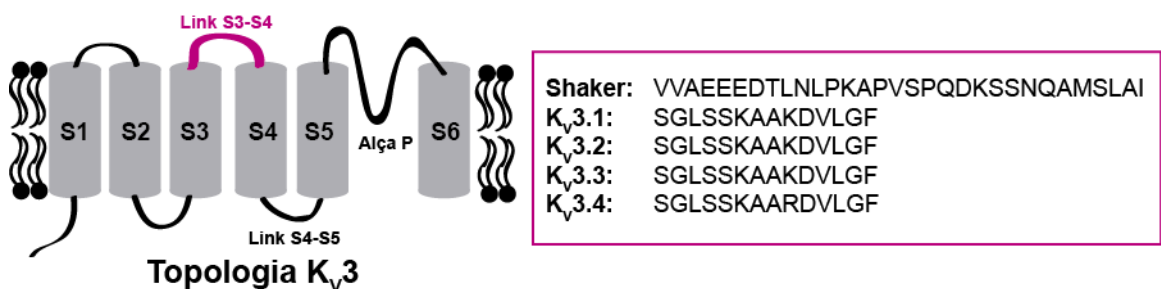
Ao contrário do que ocorre com PA codificados por outras famílias de K_V (figura 1), o bloqueio das correntes de K⁺ carregadas por K_V3.1 levam a diminuição dos disparos de

potências de ação como mostrado por WANG *et al.* (1998). Essa diminuição está relacionada com a ativação dos $K_v3.1$ que é iniciada na fase de queda do PA, após atingir-se o pico, portanto, o bloqueio desses canais aumenta o tempo do PA e a frequência poderá ser diminuída (RUDY; MCBAIN, 2001).

O alto limiar de ativação e a rápida velocidade de fechamento dos $K_v3.1$ sugerem que, quando presentes em quantidades suficientes nas células excitáveis, os $K_v3.1$ podem facilitar a repolarização e regulam a duração do PA. Porém não compromete o limiar do disparo do PA, não aumenta o tempo ou a magnitude do PA e, o mais importante, não contribui com correntes que poderiam aumentar a duração do período refratário. Isto contrasta com outras cinéticas encontradas em outras famílias de K_v s, que se ativam para potenciais mais negativos e desativam mais vagarosamente (RUDY; MCBAIN, 2001).

Recentemente, LABRO *et al.* (2015) propuseram um mecanismo molecular que explicaria a alta velocidade de fechamento dos canais da família K_v3 . Esses autores propuseram que as sequências de aminoácidos localizados entre os segmentos S3 e S4, denominada link S3-S4 (em magenta na figura 4), são os responsáveis pelas propriedades cinéticas intrínsecas dos K_v3 . Essa sequência é altamente conservada em todos os canais dessa família e são muito diferentes de outras famílias de K_v , incluindo àqueles da família *Shaker*. A figura 4 mostra a topologia e a sequência desses aminoácidos.

Figura 4: Topologia dos K_v3 e a sequência de aminoácidos do link S3-S4.



Representação topológica dos segmentos S1-S6 para os K_v3 . As sequências de aminoácidos do link S3-S4 estão mostrados no quadrado colorido em magenta. **Fonte:** Adaptado de LABRO *et al.* (2015).

Dessa forma, devido à importância e às múltiplas regiões de expressão desse canal, depreende-se que os mesmos têm grande apelo farmacológico. Por exemplo, CHOI *et al.* (2001) propõem que as moléculas fluoxetina e norfluoxetina podem inibir convulsões ao bloquear os canais $K_v3.1$. Portanto, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que atuem sobre os $K_v3.1$ apresenta grande interesse farmacológico e médico.

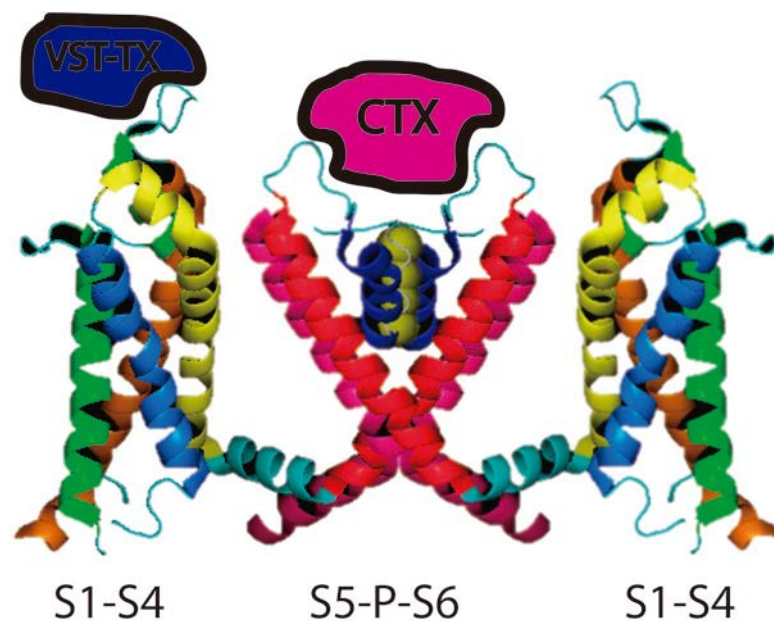
1.3. Moléculas que inibem canais iônicos

Do ponto de vista farmacológico, canais para K^+ podem ser modulados de três maneiras diferentes (WULFF; CASTLE; PARDO, 2009): por pequenas moléculas orgânicas (SCHMITZ *et al.*, 2005), por peptídeos de veneno/toxinas (RODRIGUES *et al.*, 2003) e por íons metálicos (ADELMAN; FRENCH, 1978). Além disso, pode ocorrer a inibição por duas formas distintas: por mecanismos alostéricos e bloqueio (HILLE, 2001). O primeiro processo está relacionado com a ligação da molécula a uma região que estabiliza o canal no estado fechado, por exemplo no domínio sensor de voltagem. O segundo processo está relacionado com a oclusão do poro pela ligação do bloqueador no vestíbulo do canal. Moléculas que bloqueiam os canais em seu estado aberto são denominadas de bloqueadores de canal aberto (do inglês - *open channel blocker- OCB*).

O desenvolvimento da ideia de bloqueadores de canal aberto vem dos trabalhos de Armstrong (ARMSTRONG, 1969) que estudou o efeito de Tetraetilamônio (TEA) em canais para potássio em axônio gigante de lula. WOODHULL (1973) introduziu um modelo físico para OCB através do estudo do bloqueio de canais para Sódio (Na^+) por prótons (H^+). Embora o modelo do Woodhull tenha sido desenvolvido para canais para sódio, muitos autores aplicaram suas ideias no estudo de canais para potássio (SNYDERS *et al.*, 1992, SUNG *et al.*, 2008). Algumas moléculas que atuam como bloqueadores de canais abertos são: TEA em

neurônios gigante de lula (ARMSTRONG, 1969), em $K_V2.1$ (ANDALIB *et al.*, 2003) e em $K_V1.1$, $K_V1.2$, $K_V1.3$, $K_V1.5$ e $K_V3.1$ (GRISSMER *et al.* 1994); quinidina em $K_V1.5$ (SNYDERS *et al.*, 1992); norfluoxetina (CHOI *et al.*, 2001), sibutramina (KIM *et al.*, 2007.) e fluoxetina em $K_V3.1$ (SUNG *et al.*, 2008). A figura 5 mostra uma representação da maneira como diferentes moléculas podem atuar em canais para potássio.

Figura 5: Mecanismos de bloqueio de canais de potássio.



Representação esquemática de um canal para potássio dependente de voltagem. Sua estrutura foi desenhada a partir do código PDB-2R9R. Representando os mecanismos alostéricos (em roxo) a toxina VST-Tx (Voltage Sensor Toxin – Toxina da Tarântula chilena rosa (*Grammostola spatulata*)) que se liga ao domínio sensor de voltagem. Em magenta é apresentada a toxina CTX (Caribdotoxina - Toxina do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus*) representando o mecanismo de bloqueio de canal aberto. Os segmentos S1, S2, S3, S4, link S4-S5, S6, loop-P estão representados pelas cores laranja, verde, azul, amarelo, ciano, vermelho e magenta, respectivamente. **Fonte:** Adaptado de RUTA *et al.*, 2003).

A tabela 2 apresenta algumas substâncias bloqueadoras de canais $K_V1.3$ e $K_V3.1$ e seus respectivos valores de IC_{50} . Como se pode observar, algumas moléculas possuem valores elevados de IC_{50} para alguns canais, indicando pouco efeito inibitório, e para outros, possuem valores de IC_{50} muito pequenos, indicando que a inibição ocorre de forma mais eficiente.

Tabela 2: Inibidores de Canais Iônicos e seus valores de IC₅₀.

Molécula	K_v1.3(μM)	K_v3.1 (μM)
4-AP	195	29*
Capsaicina	26	158
Resiniferatoxina	3*	46
D-Solatol	>1000	>1000
Flecainida	53	108
Nifedipina	5	131
Ditiazema	27	97
Cromakalima	>3000	237
DTX	0,25	>1
CTX	0,0026	>1
NTX	0,001	>0,025
KTX	0,000065	>1
Sibutramina	3,7	32,7
Fluoxetina		13,4
Norfluoxetina		0,19
TEA	10000	200

*Moléculas que se ligam irreversivelmente.

Fonte: Adaptado de GRISSMER et al. (1994); CHOI et al. (2001); KIM et al. (2007).

1.4. Benzenossulfonamidas

A importância e a descoberta de novos fármacos são motivos de estudos e de investimentos para a indústria e para a sociedade em geral. As sulfonamidas, também conhecidas como sulfas, constituem-se em uma classe de moléculas que são utilizadas e

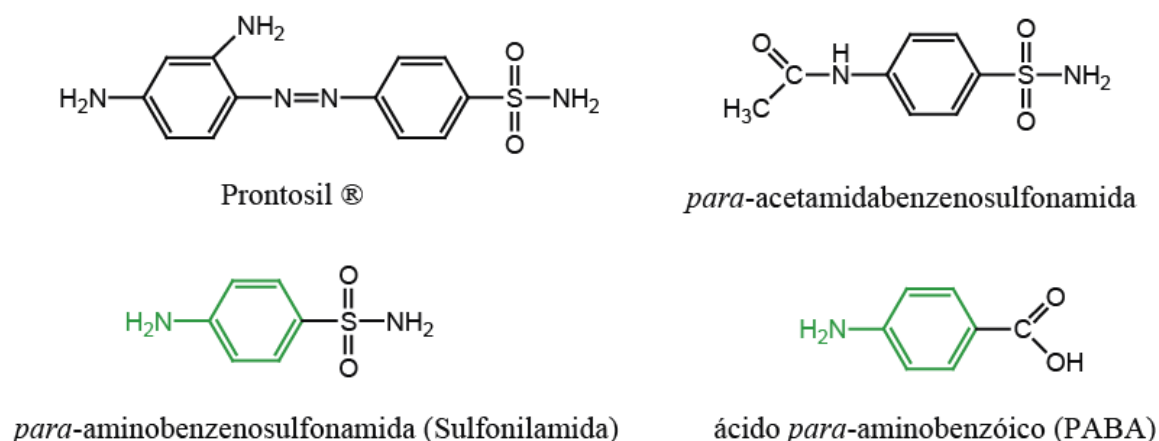
reconhecidamente na literatura como moléculas que possuem atividade biológica. Elas foram as primeiras moléculas usadas efetivamente contra micro-organismos, ajudando a combater infecções bacterianas que, até então, não tinham tratamentos adequados e eficazes.

De acordo com COTTON (2016), o desenvolvimento das sulfonamidas ocorreu graças a Gerhard Domagk que encontrou em testes de laboratórios *in vivo* que o corante vermelho, Prontosil® rubro, funcionou muito bem no combate a infecções estreptocócicas em camundongos. A partir de testes realizados em humanos o fármaco foi patenteado em 1934 e passou a ser comercializado em 1935. Daniel Bovet, em 1935, no Instituto Pasteur, em Paris, França, encontrou que um composto incolor chamado de sulfanilamida, funcionava tão bem quanto o Prontosil®. Bovet e sua equipe encontrou que a sulfanilamida apresentava efeitos em testes *in vitro*, que a molécula Prontosil® deveria ser quebrada e que a sulfanilamida era um subproduto da molécula Prontosil®. Na época, a molécula sulfanilamida apresentou duas vantagens em relação ao Prontosil®, era mais barata e incolor. Em 1940, Donald Woods descreveu como as sulfanilamidas funcionavam, mostrando que o ácido *para*-aminobenzóico (PABA) interrompia a ação das sulfanilamidas no combate a infecções. A partir da similaridade entre o PABA e a sulfanilamida, Woods deduziu que a sulfanilamida se liga ao sítio ativo de uma das enzimas envolvidas na síntese do ácido di-hidrofílico nas bactérias. Dessa forma a enzima é inibida e a bactéria não consegue crescer. As sulfas tiveram grande importância e salvaram muitas vidas na segunda guerra mundial. Ao final da segunda guerra, houve o advento da penicilina e outros antibióticos, que acabaram substituindo as sulfas no combate a infecções. A figura 6 apresenta as estruturas das moléculas discutidas acima (PETRI, 2005, BRUICE, 2006b).

A relativa facilidade e a eficiência na síntese destas moléculas, são fatores atrativos para utilizá-las no desenvolvimento de fármacos utilizando moléculas derivadas do PABA e do ácido sufonílico (GONÇALVES *et al.*, 2011). Além disso, há inúmeros trabalhos na

literatura mostrando o efeito de sulfonamidas como antiparasitários (BHATTACHARYA *et al.*, 2004), antitumorais (OZAWA *et al.*, 2001), antivirais (BETZ *et al.*, 2002), analgésicos e anti-inflamatórios (WALTER *et al.*, 2004), além de ser inibidor de canais para potássio dependentes de voltagem, do tipo $K_v1.5$ (GROSS *et al.*, 2007, LLOYD *et al.*, 2007, GROSS *et al.*, 2009; OLSSON *et al.*, 2014) e de canais para potássio ativados por ATP em células β no combate a diabetes tipo II (Glibencamida (WANG, 2015)). Dessa forma, delinear-se-á a estratégia de desenvolvimento de moléculas inibitórias utilizando como base a estrutura das benzenossulfonamidas, moléculas análogas ao ácido benzenossulfônico e de moléculas derivadas do PABA.

Figura 6: Estrutura das moléculas Prontosil®, *para*-aminobenzenossulfonamida, *para*-acetamidabenzenossulfonamida e do ácido *para*-aminobenzóico.



Em verde são apresentados os grupamentos que são semelhantes entre o PABA e a Benzenossulfonamida.

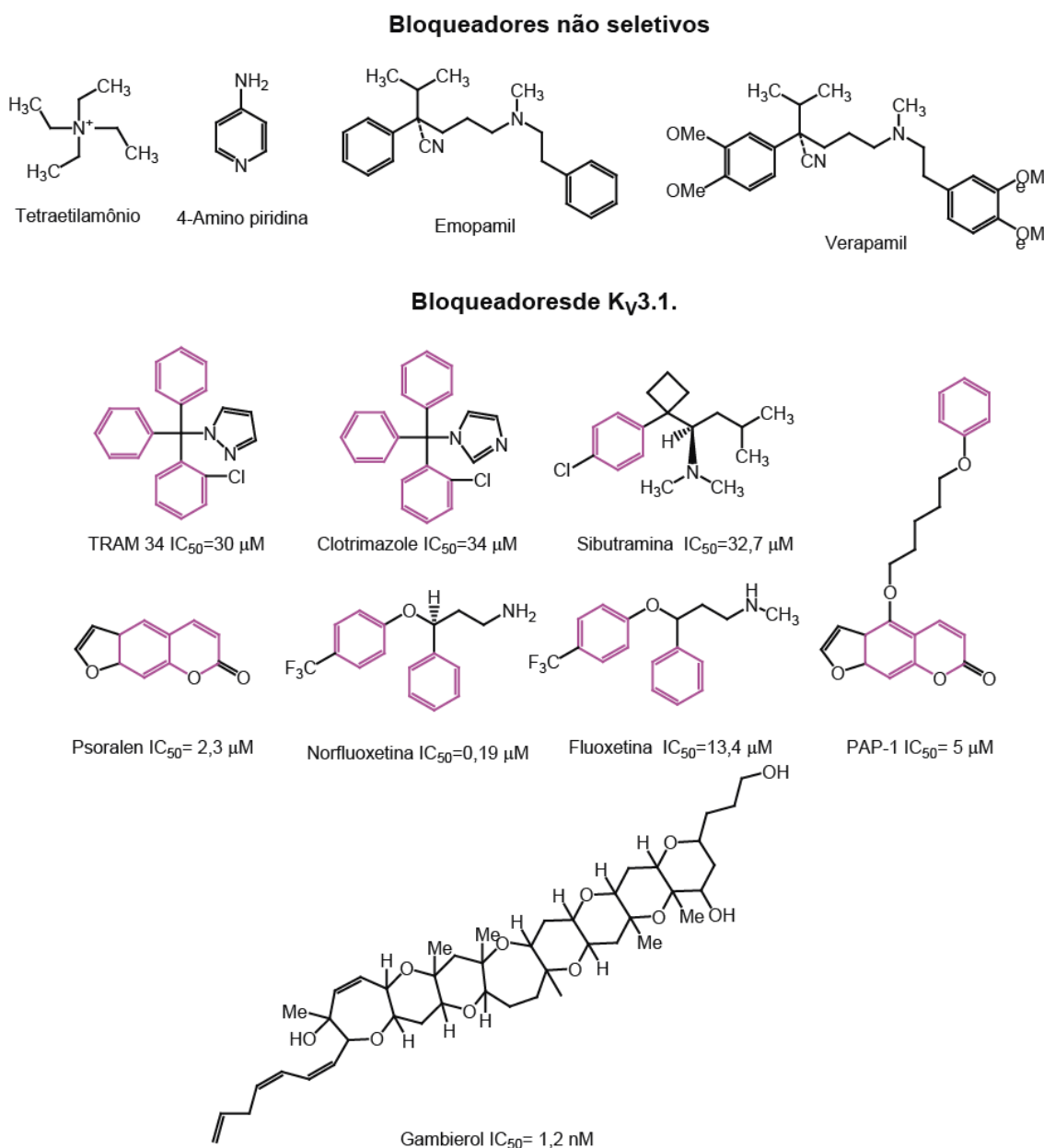
Fonte: Adaptado de BRUICE, 2006a, PETRI, 2005.

1.4.1. Estratégia para a elaboração de protótipos de moléculas que possam atuar sobre canais $K_v3.1$

A literatura apresenta vários relatos sobre grupamentos químicos presentes em moléculas bloqueadoras de canais para potássio (WULFF *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2001;

PARK *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2007; CATTERALL *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2008; SUNG *et al.*, 2008; WULFF; ZHOROV, 2008; GROSS *et al.*, 2009; SUNG; HAHN; CHOI, 2009; WULFF; CASTLE; PARDO, 2009; JEONG, CHOI; HAHN, 2011; CHAE; CHOI; HAHN, 2013; YU *et al.*, 2015).

Figura 7: Bloqueadores não seletivos e bloqueadores de K_v3.1.

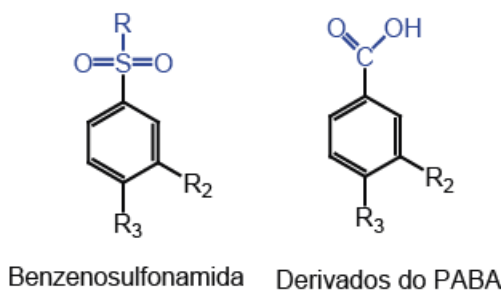


Várias moléculas inibidoras de K_v3.1, possuem em sua estrutura química o anel aromático. Os anéis aromáticos estão apresentados na cor magenta. As moléculas que compõem o grupo de bloqueadores não seletivos foram adaptadas de WULFF; ZHOROV (2008). As moléculas bloqueadoras de K_v3.1 estão apresentadas com o seu nome e a referência de onde foram adaptadas, que se segue: Fluoxetine (SUNG *et al.*, 2008), Norfluoxetine (CHOI *et al.*, 2001), Sibutramina (KIM *et al.*, 2007), Psoraleno (SUNG; HAHN; CHOI, 2009), Clotrimazole e TRAM 34 (WULFF *et al.*, 2000), PAP-1 (SCHMITZ *et al.*, 2005) e Gambierol (KOPLJAR *et al.*, 2009).

O grupamento mais encontrado e que provavelmente se constitui num bom ponto de partida para a elaboração de um protótipo de molécula que possa atuar em canais de potássio $K_v3.1$ é o grupamento benzênico. A figura 7 apresenta algumas moléculas que possuem atividade biológica e que possuem o anel benzênico em sua estrutura química. Tais moléculas são bloqueadores de canais do tipo $K_v3.1$. Embora há várias diferenças de tamanho e de massas entre essas moléculas, o ponto de partida e alicerce na elaboração de novos protótipos inibidores foram moléculas que contém o anel benzênico.

Com o exposto, a figura 8 mostra, de maneira representativa, a molécula que foi utilizada como ponto de partida. Além de se utilizar o anel aromático como base, houve-se a intenção de incorporar grupos químicos diferentes, em porções específicas ao redor do anel benzênico, a fim de avaliar o efeito desses grupos. A estratégia foi desenvolver bioisósteros de benzenossulfonamidas, moléculas análogas ao PABA e análogas ao ácido sulfônico. Todas essas moléculas apresentam em sua estrutura um anel benzênico. A presença desse grupo justifica a procura de moléculas que possuam alguma característica estrutural semelhante a outros bloqueadores de $K_v3.1$.

Figura 8: Base para protótipos de bloqueadores de $K_v3.1$, através de derivados do PABA e também de benzenossulfonamidas.



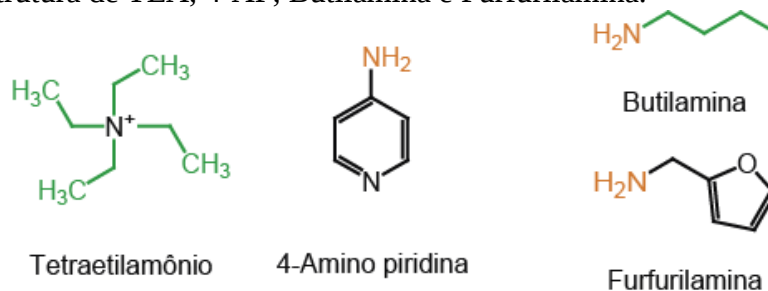
Em azul, há o destaque para evidenciar quais grupamentos foram diferentes na elaboração do modelo de moléculas inibidoras de $K_v3.1$. R2 e R3 foram as posições onde se inseriu diversos grupamentos orgânicos.
Fonte: próprio autor.

As semelhanças entre o PABA e as benzenossulfonamidas são interessantes do ponto de vista farmacológico: O PABA é uma molécula comumente utilizada como base para o desenvolvimento de muitos outros fármacos. KLUCZYK *et al.* (2002), apresentam ao menos 259 compostos contendo a estrutura do PABA distribuídos em 84 diferentes grupos com atividades farmacológicas. Além disso, moléculas derivadas do PABA são descritas na literatura como anestésicos locais. Por exemplo, a benzocaína que é um inibidor de canais para sódio (BUTTERWORTH; STRICHARTZ, 1990). A figura 8, em azul, mostra as semelhanças estruturais entre as moléculas adotadas como base estrutural no desenvolvimento de novos bloqueadores de K_v3.1.

1.4.2. Grupamento amino

Foi inserido um grupo *N*-alquilamino com cadeias lineares e também cíclicas, tais como a butilamina e furfurilamina (Figura 9), pois a literatura já comprovou que moléculas com esses grupamentos e com o grupo amônio possuem efeitos inibitórios em canais para potássio do tipo K_v3.1. Por exemplo, a molécula 4-Aminopiridina (4-AP), que possui atividade bloqueadora sobre K_v3.1, tem em sua estrutura química o grupamento amino e, moléculas derivadas de íons quaternários de amônia (Tetraetilamônio - TEA), possuem atividade sobre os K_v3.1 (GRISSMER *et al.*, 1994).

Figura 9: Estrutura de TEA, 4-AP, Butilamina e Furfurilamina.

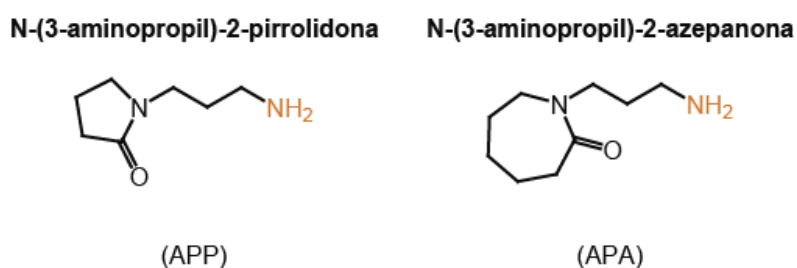


Os grupamentos de cadeias de hidrocarbonetos estão representados em verde e em laranja são mostrados os grupamentos amino. Os valores de IC₅₀ para TEA e 4-AP são, respectivamente 29 e 200 µM. **Fonte:** Adaptado de (GRISSMER *et al.*, 1994).

1.4.3. Grupamento aminolactâmas

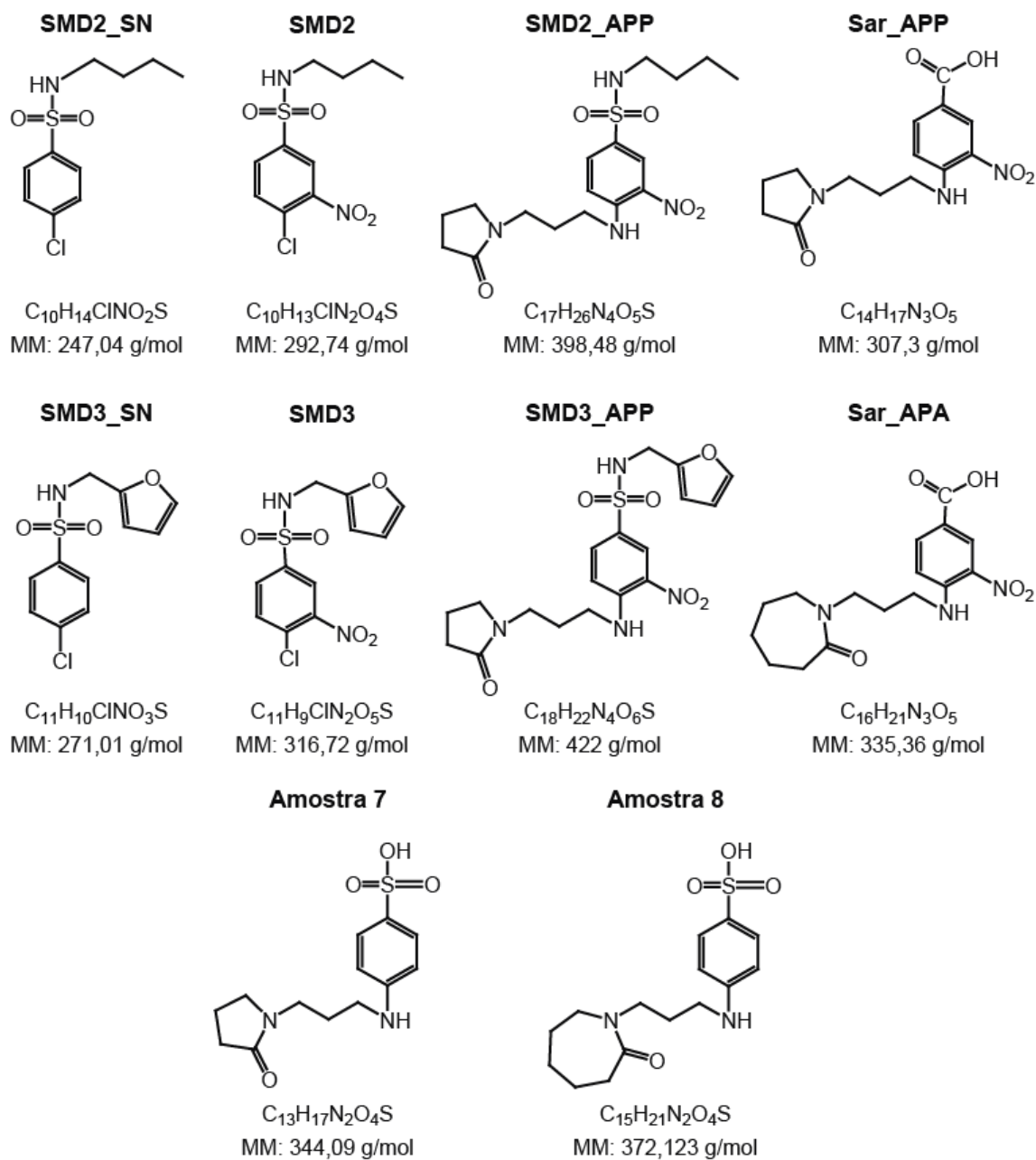
A fim de se saber se a inserção de outros grupamentos potencializaria o efeito de moléculas inibidoras, optou-se em utilizar aminolactâmas cíclicas de cinco e sete membros nas moléculas que apresentaram efeito. O propósito de se adicionar as aminolactâmas foi investigar a sua influência no efeito inibitório associado com a natureza eletrônica dos grupos aminolactâmicos e também, do efeito estérico devido ao aumento do volume das moléculas. Além disso, moléculas derivadas de benzenossulfonamidas e que possuem aminolactâmas em sua estrutura são bloqueadores de $K_v1.5$ (OLSSON *et al.*, 2014), o que também justificaria tal inserção. Dessa forma, introduziram-se as moléculas, *N*-(3-aminopropil)-2-pirrolidona (APP) e *N*-(3-aminopropil)-2-azepanona (APA) nos estudos para avaliar se a presença desses grupamentos pode promover ou aumentar o efeito das moléculas sobre os $K_v3.1$. Essas moléculas foram inseridas na posição R_3 e são mostrados na figura 10. Como consequência da estratégia desenvolvida, o resultado estrutural das moléculas estudadas estão mostradas na figura 11.

Figura 10: Estrutura das aminolactâmas incorporadas.



Em laranja é destacado o grupamento amino. **Fonte:** Adaptado de (GONÇALVES *et al.*, 2011).

Figura 11: Moléculas estudadas neste trabalho.



Fonte: próprio autor.

2. OBJETIVOS

Este trabalho testou a hipótese do efeito bloqueador de moléculas orgânicas (N-Alquil-benzenossulfonamidas) sobre canais iônicos para potássio dependentes da voltagem, mais especificamente sobre o canal $K_v3.1$, devido ao interesse farmacológico desse canal. O objetivo principal foi investigar e testar bioisósteros de moléculas, estruturalmente relacionadas, que poderiam ter efeito inibitório nesses canais e assim propor um protótipo de moléculas que podem atuar nesse canal. Concomitantemente, procurou-se entender os mecanismos da interação entre a molécula com o menor valor de IC_{50} e os $K_v3.1$ em seus aspectos cinéticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Medidas eletrofisiológicas

As linhagens de células L929, oriundas de fibroblastos, que expressam heterologamente os canais $K_v3.1$, foram obtidas conforme GRISMER *et. al.* (1994) e gentilmente fornecidas pelo Dr. George Chandy (Departamento de Fisiologia Molecular da Escola de Medicina Lee Kong Chian da Universidade Tecnológica de Nanyang, Singapura) para o Professor Dr. Wamberto Antônio Varanda. A escolha de tal linhagem decorre da baixa ou nenhuma expressão aparente de canais para potássio dependentes de voltagem. As células foram mantidas em DMEM– *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - (alta glicose) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil), antibiótico de seleção gentamicina G-418-sulfato (0,25 mg/ml), 100 U/ml de penicilina-G sódica e 100 mg/ml de sulfato de estreptomicina.

As células foram cultivadas em garrafas de cultura de células, 25 cm², em uma estufa umidificada (*Revco Elite II, Kendro Laboratory Products, Asheville, NC, E.U.A.*) com 5 % de CO₂ e mantidas a temperatura de 37 °C. Para a utilização foi feito o descolamento das células através de tratamento com tripsina-EDTA (10x) diluída em uma solução de Hank sem Ca²⁺ e Mg²⁺, com diluição final de 1:10. Para o descolamento das células, procedeu-se da seguinte maneira: o meio de cultura foi retirado das garrafinhas e descartado. As garrafas foram lavadas com 1 ml de solução de tripsina, a fim de retirar qualquer resquício de meio de cultura, adicionando novamente 2-3 ml de solução de tripsina e deixando agir por aproximadamente 1 minuto a 37°C. Passado esse tempo, essa solução, contendo agora as células descoladas, foi colocada em um tubo *falcon* de 15 ml. Foi adicionado meio de cultura suplementado, em volume 3 vezes maior que aquele da solução de tripsina, para neutralizar a ação da enzima. Esse tubo foi centrifugado a 1000 r.p.m. (206BL, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) durante 10 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 ml de

meio de cultura ao tubo *falcon* de 15 ml para eliminar resquícios da tripsina. Esse 1 ml foi então descartado e foi adicionado 4 ml de meio de cultura.

As células foram ressuspensas com o auxílio de um pipetador automático T (*SwifPe, HTL-Lab Solutions*, Varsóvia, Polônia). Após esse procedimento, as células foram plaqueadas em lamínulas de vidro para microscopia (espessura 0,13-0,16 mm - *Glasscyto*), previamente cortadas para as dimensões 0,6 x 0,6 cm, esterilizadas e acondicionadas em placas de *petri* de 35x11mm. As células ficaram 2 horas em descanso na estufa antes do início dos procedimentos experimentais. Elas foram utilizadas de 2-8 h após esse procedimento.

Todos os procedimentos de eletrofisiologia foram realizados no laboratório de Biofísica de Membranas, Departamento de Fisiologia Da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP-Ribeirão Preto e orientados pelo Professor Dr. Wamberto Antonio Varanda. Os experimentos foram realizados conforme HAMIL *et. al.* (1981), no modo *Whole-cell*, que permitiu medir correntes macroscópicas através das membranas celulares. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente, 23°-25°C. As lamínulas de vidro, contendo as células aderidas, foram colocadas numa câmara de perfusão montada sobre a platina de um microscópio invertido NIKON C-C *Phase* (*Nikon Inc, Melville, NY, E.U.A.*). As correntes iônicas, em resposta a pulsos de voltagem, foram medidas com um amplificador AxoPatch 200B (*Molecular Devices, Union City, CA, U.S.A.*), e filtradas em 5 KHz (8 *pole Bessel* – passa baixo). Os sinais provenientes do amplificador foram amostrados através de um conversor AD/DA (*ITC-16 Computer Interface – Instrutech. Corp., Greatneck, NY, EUA*) e gravados no disco rígido de um computador pessoal, controlado pelo software WinWCP (versão 4.5, *Strathclyde Electrophysiology Software*, ©John Dempster, *University of Strathclyde, Glasgow, Escócia*) ou Clampex (*pClamp10, Molecular Devices, Union City, CA, E.U.A.*) e a taxa de amostragem utilizada em cada experimento está inserida nas legendas das figuras correspondentes.

As células foram acopladas ao sistema de medida através de micropipetas de vidro borossilicato (BF-150-86-15, *Sutter Instrument, Novato, CA, E.U.A.*) confeccionadas num estirador horizontal Sutter P-97 (*Sutter instruments Co.*) e tinham resistências entre 2 e 4 M Ω quando preenchidas com solução intracelular. A resistência em série variou de 4 a 10 M Ω (resistência de pipeta somada a resistência de acesso) foi compensada eletronicamente em 80% quando a corrente excedeu 2 nA e a queda de voltagem decorrente da resistência em série, não excedeu em mais de 5 % de erro na voltagem total aplicada.

A compensação da resistência em série é um parâmetro importante e deve ser fiscalizado ao longo do tempo em que é feito o experimento. O critério a ser adotado como valor de corte, deve ser criterioso para evitar erros posteriores. Por exemplo, para uma corrente de 4 nA observada através de um potencial total despolarizante de 120mV e uma resistência em série de 6 M Ω , a queda de voltagem através da resistência em série será 24 mV. Isso representa 20% de erro da voltagem total aplicada sobre a membrana. Dessa forma, se a resistência em série for compensada eletronicamente em 80%, a resistência em série agora seria de 1,2 M Ω levando a uma queda de voltagem de apenas 4,8 mV, sendo esse valor igual a 4% de erro em relação à voltagem total que é aplicada sobre a membrana celular.

Os dados foram analisados com auxílio do *software Origin 8.0 (Origin Lab Corp., Northampton, MA, E.U.A.)* e *Clampfit 10.6 (pClamp, Molecular Devices)*. O potencial de *holding* das células foi mantido em -88 mV em todos os experimentos. O potencial de junção entre as soluções de banho e de pipeta foi medido experimentalmente e também calculado usando o programa *Clampex 10.6 (pClamp, Molecular devices)* resultando, respectivamente, em -8 mV e -8,4 mV e foram corrigidos *off-line* em todos os experimentos. Dessa forma, todos os resultados apresentados neste trabalho, foram corrigidos pelo potencial de junção líquido. Para determinar se os resultados foram estatisticamente diferentes foram utilizados testes *t* pareados adotando o valor de significância $p < 0,05$.

A solução externa ou de banho continha (em mM): 155 NaCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 5 HEPES e 4,5 KCl, pH 7,4 ajustado com NaOH e osmolalidade de 300-310 mosm/Kg H₂O. A solução interna continha (em mM): 140 KF, 5 EGTA, 10 HEPES, 2 MgCl₂ e 1 CaCl₂, pH 7,2 ajustado com KOH e osmolalidade de 290-300 mosm/Kg H₂O (RODRIGUES *et al.*, 2003). Após o ajuste do pH, a concentração interna de K⁺ resultante pôde ser calculada e foi de 159 mM. As moléculas foram diluídas em NaOH, conforme mostrado na tabela 3, da seção 3.2. A osmolalidade da solução final contendo diferentes concentrações das moléculas variaram de 306 a 313 mosm/Kg H₂O. As soluções controle (banho) e contendo as moléculas diluídas em solução de banho foram aplicadas sobre as células através de um aplicador de drogas RSC-160 (*Bio-logic Science Instruments SAS, Calix, França*), acoplado a um controlador digital de válvulas EVH-9 (*Bio-logic Science Instruments SAS*) e a um controlador de pressão PR-10 (*ALA Scientific Instruments, New York, NY, EUA*). Com o controlador de pressão foi possível manter um fluxo constante de aproximadamente 1 ml a cada 3 minutos diretamente sobre a célula em estudo.

Todas as soluções foram feitas utilizando água Milli-Q (Modelo *Simplicity*, *Merck Millipore Corporation, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha*). As soluções foram filtradas com uma membrana de éster de celulose não estéreis de 0,22 µm de poro e 47 mm de diâmetro (*GSWP04700, Merck*). Para medidas da osmolalidade foi utilizado um Osmômetro Modelo 3250 (*Advanced Instruments, Inc, Norwood, MA, EUA*). Os compostos químicos usados para estudos eletrofisiológicos foram da marca *Sigma®* (*Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, E.U.A.*) e os insumos utilizados nas culturas de células foram da marca TPP (*Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça*).

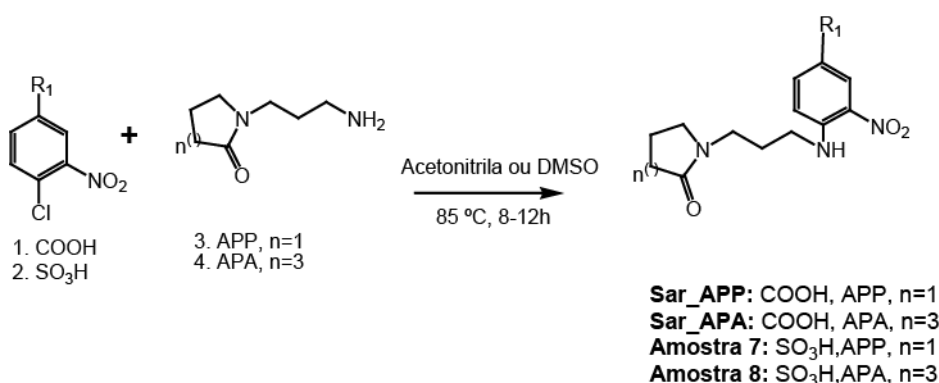
3.2. Síntese das moléculas

Este trabalho utilizou moléculas cujas sínteses foram originariamente descritas na dissertação de mestrado de Carina Couto Martins, na época aluna do programa de pós-

graduação de Ciência e Tecnologia de Materiais orientada pelo Prof. Dr. Eduardo González e defendida em setembro de 2015. Dessa forma, suas sínteses serão apresentadas brevemente nessa seção. Para maiores informações acerca da síntese das moléculas, bem como sua caracterização estrutural e sobre os resultados de espectroscopia, consulte a dissertação de mestrado de Carina, citada acima, ou o artigo publicado com resultados dessas sínteses (MARTINS *et al.*, 2016).

Todas as moléculas foram sintetizadas seguindo a metodologia aplicada e desenvolvida por GONÇALVES *et al.* (2011) e MARTINS *et al.* (2016). Elas estão esquematizadas nas figuras 12, 13 e 14. A tabela 3 mostra a nomenclatura oficial, o nome adotado nessa tese e a solubilidade das sulfonamidas em hidróxido de sódio (NaOH). A molécula SMD2_APP foi solubilizada em DMSO, já que ela não foi solúvel em NaOH. Como resultado dessa diluição, a concentração final de DMSO na solução foi inferior a 0,5%. A figura apresenta o esquema da síntese das moléculas: Amostra 7, Amostra 8, Sar_APP e Sar_APA.

Figura 12. Esquema da síntese das moléculas Amostra 7, Amostra 8, Sar_APP e Sar_APA.



Fonte: Adaptado de (GONÇALVES *et al.*, 2011).

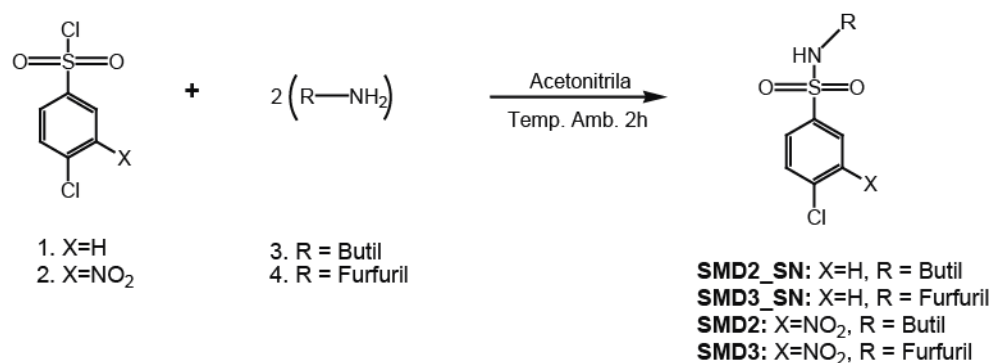
As moléculas, análogas ao PABA, **Amostra 7** (ácido 4-[N-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitrobenzóico) e **Amostra 8** (ácido 4-[N-(3'-aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzóico), foram sintetizadas pela reação de substituição nucleofílica aromática do ácido 4-cloro-3-nitrobenzóico (Figura 12, composto 1) com aminolactâmas cíclicas de cinco e sete

membros, respectivamente, *N*-(3-aminopropil)-2-pirrolidona (**APP**, Figura 12, composto 3) e *N*-(3-aminopropil)-2-azepanona (**APA**, figura 12, composto 4).

Através da reação de substituição nucleofílica aromática, foram sintetizados o ácido 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitrobenzenossulfônico (**Sar_APP**) e o ácido 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzenossulfônico (**Sar_APA**). Esses produtos foram obtidos pela reação do ácido 4-cloro-3-nitrobenzenossulfônico (Figura 12, composto 2) com aminolactâmas cíclicas de cinco e sete membros, respectivamente, *N*-(3-aminopropil)-2-pirrolidona (**APP**, Figura 12, composto 3) e *N*-(3-aminopropil)-2-azepanona (**APA**, figura 12, composto 4).

A figura 13 apresenta um esquema da síntese das sulfonamidas **SMD2**, **SMD2_SN**, **SMD3** e **SMD3_SN**. As moléculas cloreto de 4-clorobenzenossulfônico (figura 13, composto 1) e cloreto de 4-cloro-3-nitrobenzenossulfônico (apresentado como 2, Figura 13) reagem com butilamina e furfurilamina produzindo as moléculas: **SMD2_SN** (4-cloro-*N*-butilbenzenossulfonamida), **SMD3_SN** (4-cloro-*N*-furfurilbenzenossulfonamida), **SMD2** (4-cloro-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida) e **SMD3** (4-cloro-3-nitro-*N*-furfurilbenzenossulfonamida).

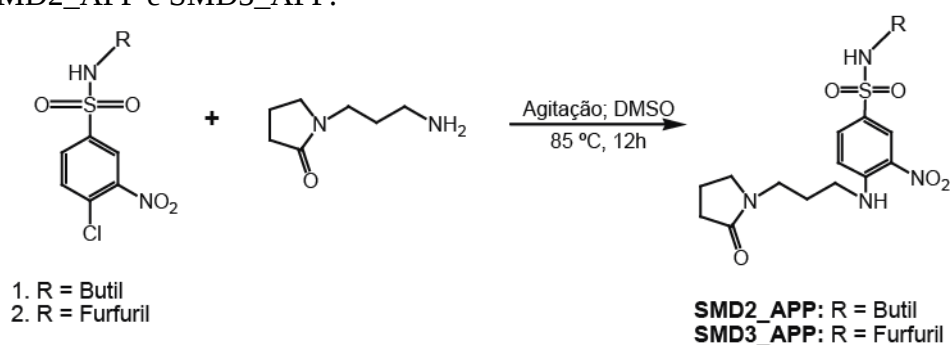
Figura 13: Reação de substituição nucleofílica aromática das sulfonamidas **SMD2**, **SMD2_SN**, **SMD3** e **SMD3_SN**.



Fonte: Adaptado de (MARTINS *et al.*, 2016).

As moléculas **SMD2_APP** (4-[N-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida) e **SMD3_APP** (4-[N-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-*N*-furfurilbenzenossulfonamida) foram sintetizadas pela reação de substituição nucleofílica aromática, das moléculas 4-cloro-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida (**SMD2**) e 4-cloro-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida (**SMD3**) com aminolactâmas cíclicas de cinco membros, *N*-(3-aminopropil)-2-pirrolidona (**APP**). Conforme esquema mostrado na figura 14. No anexo I é apresentado a caracterização de todas as moléculas analisadas.

Figura 14. Reação de substituição nucleofílica aromática das sulfonamidas SMD2, SMD3 em SMD2_APP e SMD3_APP.



Fonte: Adaptado de (MARTINS *et al.*, 2016).

Tabela 3: Nomenclatura oficial e solubilidade das sulfonamidas.

Nomenclatura Oficial	Nome adotado na Tese	Solubilidade
Ácido 4-[<i>N</i> -(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitrobenzóico	Amostra 7	10 mg /mL H ₂ O
Ácido 4-[<i>N</i> -(3'-aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzóico	Amostra 8	10 mg /mLH ₂ O
4-cloro-3-nitro- <i>N</i> -butilbenzenossulfonamida	SMD2	2,9 mg/mL NaOH (0,5 Molar).
4-cloro-3-nitro- <i>N</i> -furfurilbenzenossulfonamida	SMD3	3,2 mg/mL NaOH (0,5 Molar)
4-[<i>N</i> -(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro- <i>N</i> -butilbenzenossulfonamida	SMD2_APP	54 mg/1mL (DMSO)
4-[<i>N</i> -(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro- <i>N</i> -furfurilbenzenossulfonamida	SMD3_APP	3,1 mg/ mL NaOH (0,2 Molar)
4-cloro- <i>N</i> -butilbenzenossulfonamida	SMD2_SN	2,5 mg/ mL NaOH (0,7 Molar).
4-cloro- <i>N</i> -furfurilbenzenossulfonamida	SMD3_SN	2,7 mg/mL NaOH (0,5 Molar).
Ácido 4-[<i>N</i> -(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitrobenzenossulfônico	Sar_APP	3,1 mg/mL NaOH (0,05 Molar).
Ácido 4-[<i>N</i> -(3'-aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzenossulfônico	Sar_APA	3,3 mg/mL NaOH (0,1 Molar)

Fonte: próprio autor.

4. RESULTADOS

Nesta seção, serão apresentados os resultados obtidos através de registros de correntes macroscópicas carregadas pelos canais $K_V3.1$. Na primeira parte desta seção apresentar-se-á a determinação e o mecanismo de ação de várias moléculas sintetizadas e testadas sobre os $K_V3.1$. Na segunda parte, mostrar-se-ão estudos aprofundados sobre o efeito da molécula SMD2 sobre os $K_V3.1$, procurando explicitar os mecanismos de bloqueio. Essa molécula foi escolhida por apresentar o menor valor de IC_{50} dentre as estudadas. Cada experimento foi idealizado para se obter informações acerca de uma característica específica do bloqueio. Para tanto, protocolos de pulsos quadrados de voltagem específicos foram aplicados em cada caso e serão descritos juntamente com os resultados particulares.

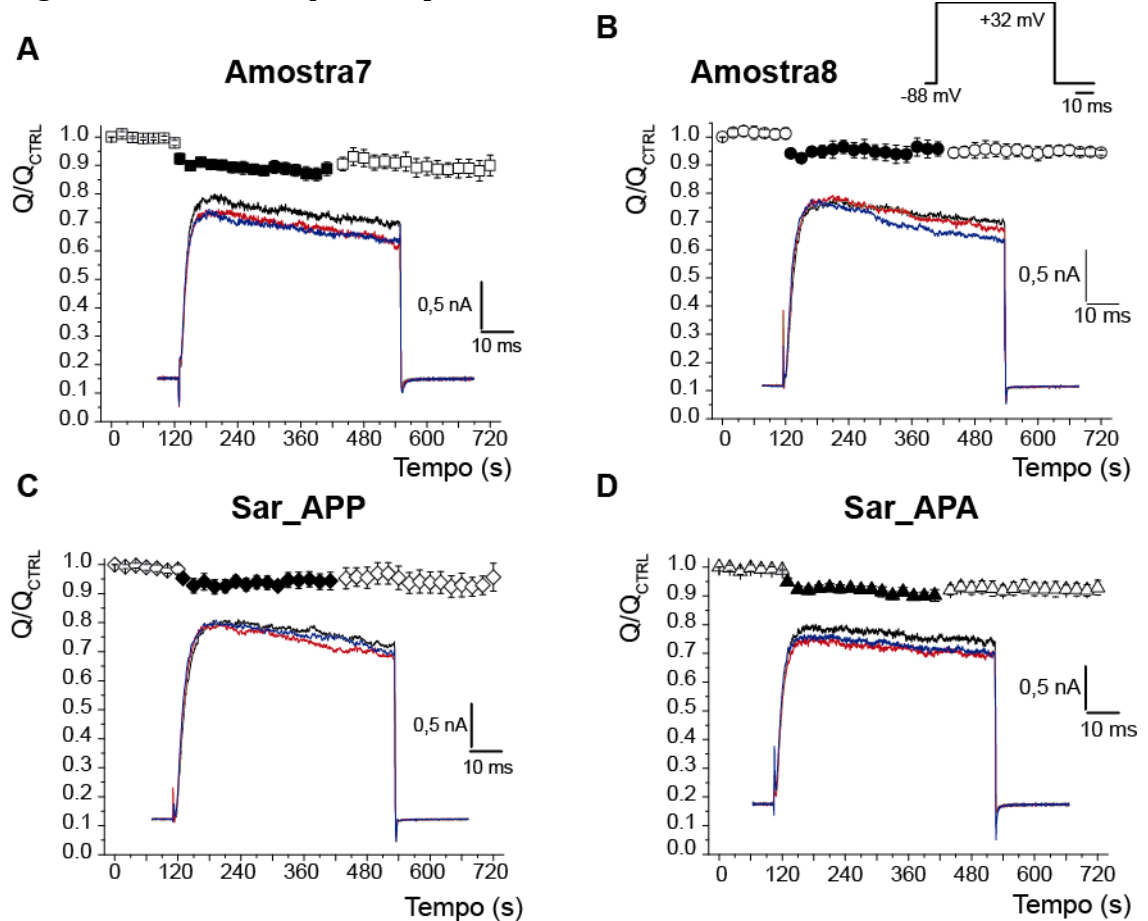
4.1. Moléculas que promoveram efeito em canal $K_V3.1$

A fim de avaliar o efeito de moléculas sobre um determinado canal iônico, o procedimento mais adequado para tal é vislumbrar o efeito temporal das moléculas a serem testadas sobre o mesmo. Para tanto, o mais adequado é a aplicação de vários pulsos despolarizantes de voltagem, fazendo com que o canal se abra para três condições: 1) situação controle; 2) na presença da molécula a ser estudada; e por fim 3) a possível lavagem e recuperação das propriedades intrínsecas do canal.

Para testar as condições acima mencionadas, foi desenvolvido um protocolo para a observação das correntes de potássio carregadas pelos canais $K_V3.1$. Onde, pulsos despolarizantes de voltagem com duração de 70 ms, variando de -88 a +32 mV, foram aplicados a cada 10 s. Os pulsos foram aplicados sequencialmente por 12 minutos: os dois primeiros minutos em situação controle, depois cinco minutos de superfusão com solução

contendo uma dada molécula a ser testada na concentração de 100 μM , e por fim, mais cinco minutos para se avaliar a reversibilidade da ligação da molécula com o canal, por superfusão da célula com solução controle. O número total de pulsos aplicados foi de 73, sendo 13 na primeira situação, e 30 nas situações subsequentes. Os resultados para as dez moléculas testadas neste trabalho estão divididos em dois grupos: os que apresentaram efeitos inibitórios sobre os $K_V3.1$ e os que não apresentaram efeitos para a concentração de 100 μM . A figura 15 apresenta os resultados para as moléculas que não apresentaram efeitos inibitórios.

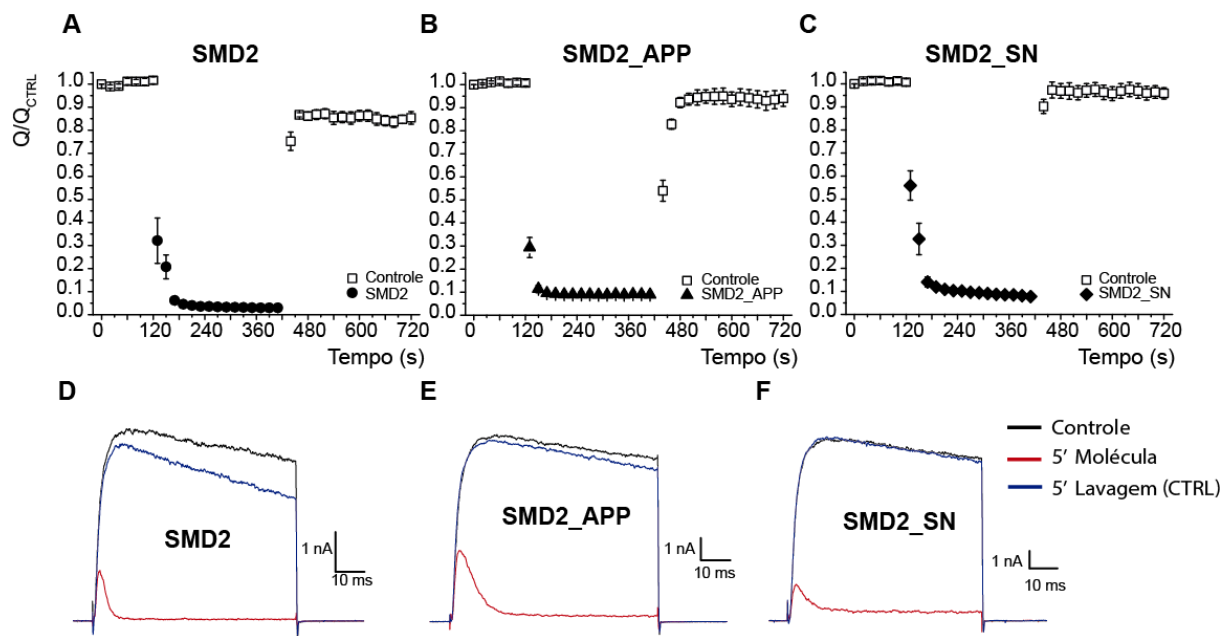
Figura 15: Moléculas que não apresentaram efeitos inibitórios sobre $K_V3.1$.



Em **A**, apresenta-se a carga transferida pelo canal normalizados pela carga transferida (vide texto) do primeiro pulso de voltagem aplicado. Em quadrados abertos tem-se a resposta na presença da solução controle e em quadrados sólidos a carga normalizada na presença de 100 μM de amostra 7. Os traçados de correntes, insertos na figura são: em preto controle (eliciados pelo primeiro pulso de voltagem), em vermelho (após cinco minutos na presença de Amostra 7) e em azul após cinco minutos de lavagem com solução controle. Em **B**) os mesmos resultados na presença da Amostra 8 (representado em círculos). Em **C**) para os mesmos resultados na presença da molécula Sar_APP (representado por losango). **D**) são os resultados na presença da molécula Sar_APA (representado como triângulo). Para fins de clareza na visualização, somente um para cada dois pontos experimentais são mostrados. Inserido em **B** está o protocolo de pulso despolarizante, variando de -88 a +32mV, com duração de 70 ms e aplicado a cada 10s durante 12 minutos. N= 5 células para todas as moléculas. **Fonte:** próprio autor.

Observa-se na figura 15, que a carga transferida, em resposta aos pulsos despolarizantes não variaram no tempo, ou seja, na presença destas moléculas (Amostra7, Amostra8, Sar_APP e Sar_APA) a resposta não se altera indicando que não há efeitos inibitórios significativos sobre $K_V3.1$. A carga transferida foi calculada pela integral da corrente no tempo em que o pulso despolarizante foi aplicado: $Q_{transf} = \int_{t_i}^{t_f} i \cdot dt$, onde Q_{transf} , i , t_i e t_f são, respectivamente, a carga transferida pelo canal, a corrente num determinado instante, o início e o fim do pulso despolarizante aplicado.

Figura 16: Efeitos inibitórios e reversibilidade dos efeitos das moléculas SMD2, SMD2_APP e SMD2_SN sobre os $K_V3.1$.

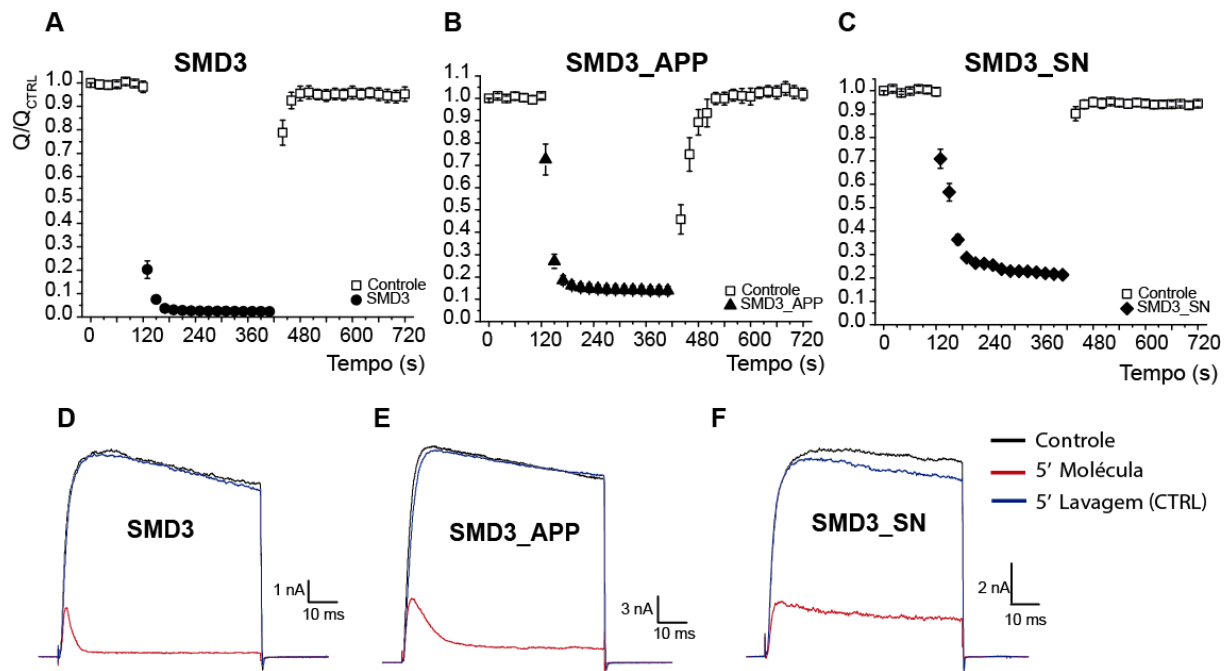


Em **A)**, **B)** e **C)** apresentam-se a carga normalizada pela carga do primeiro pulso de voltagem aplicado, para as moléculas SMD2, SMD2_APP e SMD2_SN, respectivamente. Os quadrados abertos representam o controle enquanto que os círculos sólidos referem-se a presença de SMD2; os triângulos sólidos na presença de SMD2_APP e os losangos na presença de SMD2_SN. Para fins de clareza somente um a cada dois pontos estão sendo mostrados. **D)**, **E)** e **F)** são os traçados representativos de corrente para as moléculas SMD2, SMD2_APP e SMD2_SN, respectivamente. Os traçados de correntes em preto representam o controle (eliciados pelo primeiro pulso de voltagem), em vermelho após cinco minutos na presença da molécula e em azul após cinco minutos de lavagem com solução controle. Para fins de clareza na visualização, somente um para cada dois pontos experimentais são mostrados. Inserido em **15B** está o protocolo de pulso despolarizante aplicado. N= 5 células para todas as moléculas. **Fonte:** próprio autor.

Já para as moléculas SMD2, SMD3, SMD2_APP, SMD3_APP, SMD2_SN, SMD3_SN, a carga normalizada em função do tempo variou substancialmente em resposta aos pulsos de

voltagem, indicando que há efeitos inibitórios dessas moléculas sobre os Kv3.1. A figura 16 apresenta os resultados do efeito inibitório das moléculas SMD2, SMD2_APP e SMD2_SN e a figura 17 apresenta os resultados para as moléculas SMD3, SMD3_APP e SMD3_SN.

Figura 17: Efeitos inibitórios e reversibilidade do efeito das moléculas SMD3, SMD3_APP e SMD3_SN sobre os Kv3.1.



Em **A**), **B**) e **C**) apresentam-se a carga normalizada pela carga do primeiro pulso de voltagem aplicado para as moléculas SMD3, SMD3_APP e SMD3_SN, respectivamente. Os quadrados abertos representam o controle enquanto que os círculos sólidos representam a carga na presença de SMD3; os triângulos sólidos representam a carga na presença de SMD3_APP e os losangos representam a carga na presença de SMD3_SN. Para fins de clareza um a cada dois pontos estão sendo mostrados. **D**), **E**) e **F**) são os traçados representativos de corrente para as moléculas SMD3, SMD3_APP e SMD3_SN, respectivamente. Os traçados de correntes em preto representam o controle (eliciados pelo primeiro pulso de voltagem), em vermelho após cinco minutos na presença da molécula e em azul após cinco minutos de lavagem com solução controle. Para fins de clareza na visualização, somente um para cada dois pontos experimentais são mostrados. Inserido em **15B** está o protocolo de pulso despolarizante aplicado. N= 5 células para todas as moléculas. **Fonte:** próprio autor.

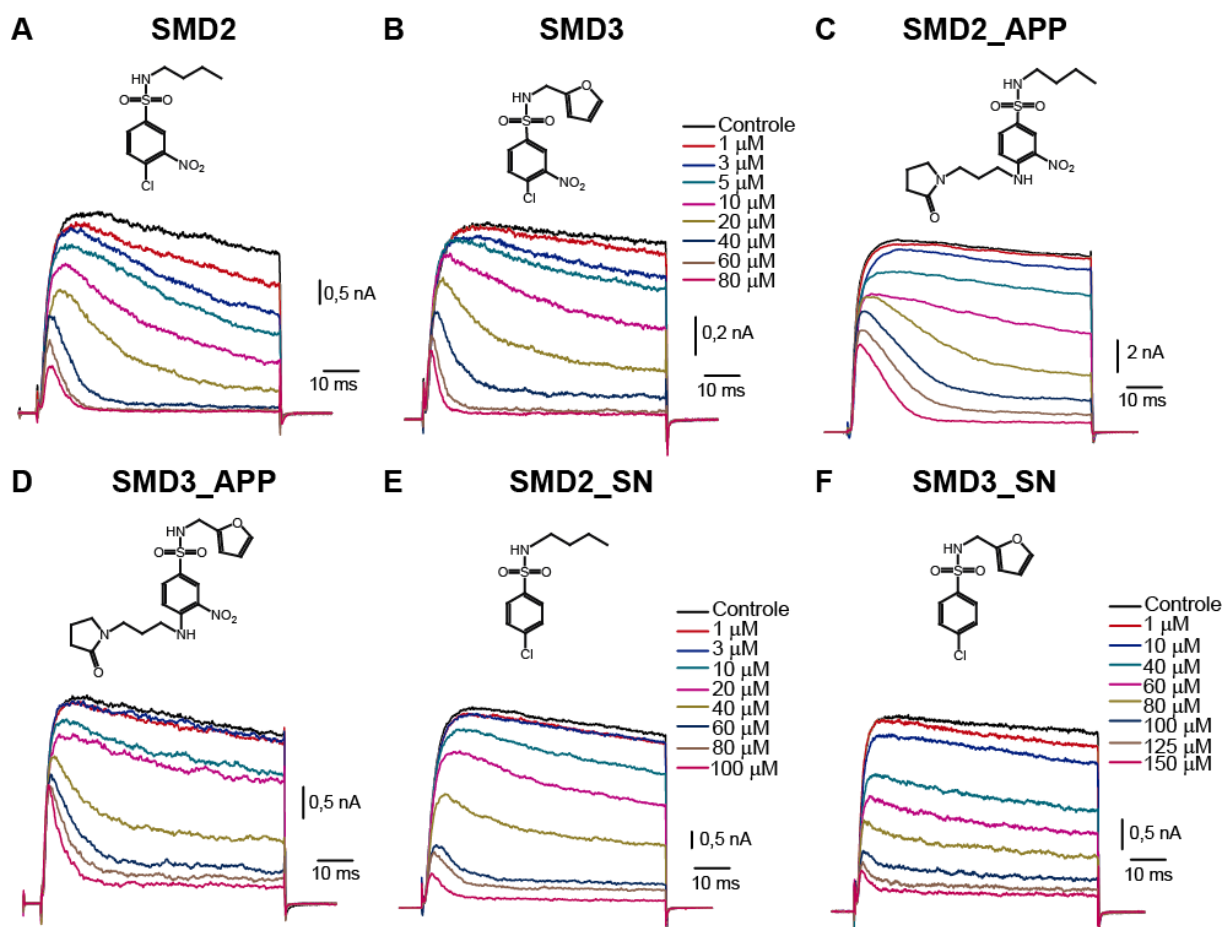
Nota-se nas figuras 16 e 17 que o efeito das moléculas sobre os Kv3.1 se instalam rapidamente, uma vez que após 20 segundos de aplicação da molécula, há um declínio abrupto da carga normalizada. Após esse período, há uma estabilização do efeito próximo de 40 a 60 s para as moléculas SMD2, SMD2_APP, SMD3 e SMD3_APP. Já para as moléculas SMD2_SN e SMD3_SN, o efeito máximo observado é menor na concentração utilizada.

Outro aspecto interessante a se destacar é a reversibilidade do efeito após lavagem da molécula. Para todas as moléculas testadas, pôde-se observar que o canal recupera suas propriedades intrínsecas. Além disso, observa-se também que o processo de lavagem é rápido, necessitando apenas de um a dois minutos para voltar a patamares comparáveis à situação controle.

4.1.1. Curvas dose-resposta

Nessa seção abordar-se-ão as curvas dose-resposta para todas as moléculas que exerceram efeitos inibitórios sobre os $K_{V3.1}$, além da proposição do mecanismo de efeito sobre o canal. A figura 18 mostra os traçados representativos de correntes para as moléculas que exerceram efeitos inibitórios sobre os $K_{V3.1}$ em função de suas concentrações. Conforme mostrado na figura 18, a corrente em resposta a pulsos despolarizantes de voltagem (-88 a +32 mV) atinge um valor máximo (pico) e em seguida, inativa-se lentamente, decaindo até um novo valor estacionário, corroborando observações de (KLEMIC; KIRSCH; JONES, 2001). Com o aumento das concentrações das moléculas, constata-se que a velocidade de decaimento das correntes aumenta. Esse comportamento é típico de bloqueadores de canais que atuam no estado aberto (ARMSTRONG, 1969; SNYDERS *et al.*, 1992; CHOI *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2007; SUNG *et al.*, 2008). Para todas as moléculas SMD2, SMD3, SMD2_APP e SMD3_APP o efeito do aumento da velocidade de decaimento da corrente aparenta ser maior e mais evidente do que para as moléculas SMD2_SN e SMD3_SN. Além disso, para as últimas duas moléculas mencionadas, percebe-se que o efeito sobre o pico é mais intenso, com um decaimento quase imperceptível. Para a análise da relação dose-resposta, utilizou-se tanto a corrente no final do pulso aplicado quanto a carga total transferida pelo canal.

Figura 18: Traçados representativos de corrente dos $K_v3.1$ na presença de várias concentrações das moléculas que promoveram efeitos inibitórios sobre o canal.

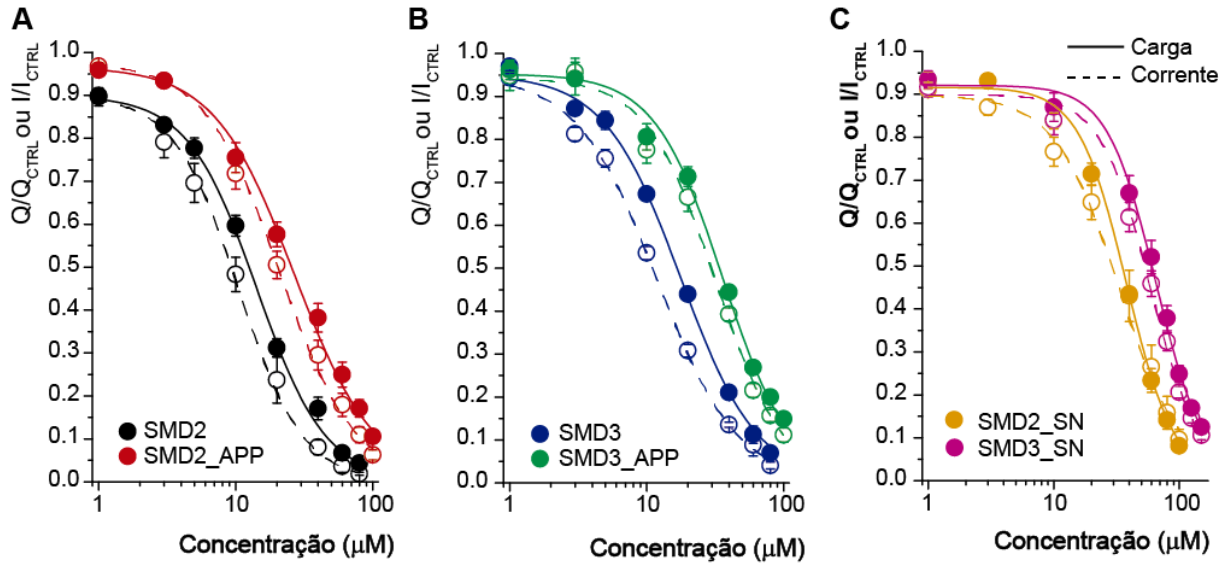


Em **A**, **B**, **C**, **D**, **E** e **F**, são, respectivamente, os traçados de correntes na ausência (em linhas pretas) e na presença de varias concentrações das moléculas SMD2, SMD3, SMD2_APP, SMD3_APP, SMD2_SN e SMD3_SN. Acima de cada traçado é apresentada a estrutura química de cada molécula. A direita de **B** está a legenda para as concentrações correspondentes aos traçados de correntes na presença das moléculas SMD2 e SMD3. À direita de **E** está a legenda para as concentrações correspondentes aos traçados de correntes na presença das molécula SMD2_APP, SMD3_APP, SMD2_SN. A direita de **F** está a legenda para as concentrações correspondentes aos traçados de correntes na presença da molécula SMD3_SN. O pulso de voltagem está inserido na figura 15B. A taxa de aquisição de dados foi de 20 KHz. **Fonte:** próprio autor.

A análise de ambas as grandezas é interessante pois, como pode ser observado na figura 19, os traçados representativos de corrente na presença das moléculas mostram que o efeito é mais pronunciado no final do pulso aplicado. Assim, a análise pela carga total transferida, tem o propósito de mensurar todo o efeito das moléculas sobre o transporte total dos íons pelo canal, já que a carga é a integral da corrente para todo o tempo de aplicação do pulso despolarizante. Enquanto que a análise pela corrente mensura o transporte iônico em um dado

instante do processo. A figura 19 apresenta os valores experimentais tomados a partir da corrente no final do pulso aplicado e também da integral sobre o traçado de corrente em função da concentração da molécula aplicada sobre os K_V3.1.

Figura 19: Curvas dose-resposta para a carga e para a corrente no final do pulso para as moléculas SMD2, SMD3, SMD2_APP, SMD3_APP, SMD2_SN e SMD3_SN.



Em **A**, **B** e **C** são apresentados os gráficos para a carga (círculos sólidos) e para a corrente no final do pulso aplicado (círculos abertos) para várias concentrações das moléculas: SMD2 e SMD2_APP em **A**, SMD3 e SMD3_APP em **B** e SMD2_SN e SMD3_SN em **C**. As linhas tracejadas são os ajustes de Hill (equação 1) para a corrente e, em linhas sólidas, os ajustes de Hill para a carga (equação 2). Os valores de IC₅₀, número de Hill e também do R² estão apresentados na tabela 4, tanto para o ajuste feito pela corrente quanto pela carga. Os dados são apresentados como média ± EPM. O número de células foram: SMD2 9 células e para as demais moléculas 5 células cada. **Fonte:** próprio autor.

As equações de Hill para a corrente e para carga (para o desenvolvimento dessa equação, vide APÊNDICE A) foram (RODRIGUES *et al.*, 2003):

$$\frac{I}{I_{CTRL}} = \frac{IC_{50}^N}{IC_{50}^N + ([D])^N} \quad (1)$$

$$\frac{Q}{Q_{CTRL}} = \frac{IC_{50}^N}{IC_{50}^N + ([D])^N} \quad (2)$$

Onde I é a corrente tomada no final do pulso aplicado para as várias concentrações utilizadas; I_{CTRL} é a corrente na ausência das moléculas; Q (carga transferida) é a integral dos traçados de corrente durante o tempo em que o pulso de voltagem foi aplicado, para cada

concentração utilizada; Q_{CTRL} é a carga transferida na ausência das moléculas; IC_{50} é concentração, da molécula estudada, que reduz a corrente no final do pulso ou carga transferida pela metade e o coeficiente de Hill (N) é número de sítios de ligação da molécula com o canal. Os resultados dos ajustes de IC_{50} e N estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Valores de IC_{50} e número de Hill, medidos pela carga e pela corrente.

Molécula	IC_{50} (μM)		número de Hill (N)		R^2	
	Corrente	Carga	Corrente	Carga	Corrente	Carga
SMD2	$9,3 \pm 0,6$	$13,5 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	0.99881	0.99922
SMD3	$11,3 \pm 0,7$	$16,9 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	0.99798	0.99754
SMD2_APP	$20,5 \pm 1$	$25,9 \pm 1,5$	$1,6 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	0.99915	0.99849
SMD3_APP	$29,9 \pm 1,9$	$34,2 \pm 1,8$	$1,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	0.99347	0.99277
SMD2_SN	$29,7 \pm 2,3$	$34,9 \pm 0,7$	$1,7 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	0.99497	0.9971
SMD3_SN	$53,1 \pm 2,2$	$60 \pm 2,2$	$2,2 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	0.99669	0.99749

Fonte: próprio autor.

Realizou-se um teste t pareado para os valores de IC_{50} para a corrente no estado estacionário em relação ao IC_{50} para carga transferida com a finalidade de mensurar se esses valores eram estatisticamente diferentes. O que se observou é que os respectivos valores de IC_{50} são significativamente diferentes para todas as moléculas testadas. Além disso, analisando-se os valores apresentados na tabela 4, nota-se que os valores de IC_{50} , para a corrente no final do pulso, é ligeiramente menor quando comparados aos valores de IC_{50} , obtidos a partir da carga total transferida pelo canal. A discrepância entre os valores de IC_{50} sugerem a interpretação de que o bloqueio por essas moléculas é um efeito dependente de estado e que essas moléculas são bloqueadores de canal aberto, pois se o bloqueio dos $K_v3.1$ pelas sulfonamidas fossem apenas no estado fechado, a redução da corrente no estado estacionário, como a carga transferida seriam proporcionais e semelhantes, assim o valor de IC_{50} não teriam diferenças estatísticas. Dessa forma, a discrepância entre os valores de IC_{50} sugerem que, o bloqueio por essas moléculas, é um efeito dependente de estado e neste caso, estas moléculas bloqueiam o canal no seu estado aberto, devido à assimetria do efeito no decurso temporal da corrente, sendo mais pronunciado no final do pulso e menos no pico.

Para o índice de Hill, os valores para a corrente, como pela carga são próximos. Há apenas uma exceção para a molécula SMD2_SN em que o valor foi bastante diferente, sendo 1,7 para a corrente e 2,3 para a carga, sendo este estatisticamente diferente (teste *t* pareado).

Desta forma, adotar-se-ão neste trabalho os valores de IC₅₀ calculados a partir da análise da carga transferida, uma vez que esta análise baseia-se no comportamento total das correntes passando pelos canais após bloqueio.

4.1.2. Relação estrutura-atividade de algumas moléculas analisadas

Nesta seção serão analisados a importância relativa de grupamentos ligados ao anel benzênico que são importantes para o efeito bloqueador sobre os canais K_V3.1. Para tanto, iniciar-se-á esta análise comparando as estruturas químicas das moléculas SMD2_APP, SMD3_APP, Amostra 7, Amostra 8, Sar_APA e Sar_APP, mostradas na figura 20. A tabela 5 mostra os valores de IC₅₀ dessas moléculas, como auxílio na interpretação dos resultados.

Tabela 5: Efeito inibitório das moléculas sobre K_V3.1.

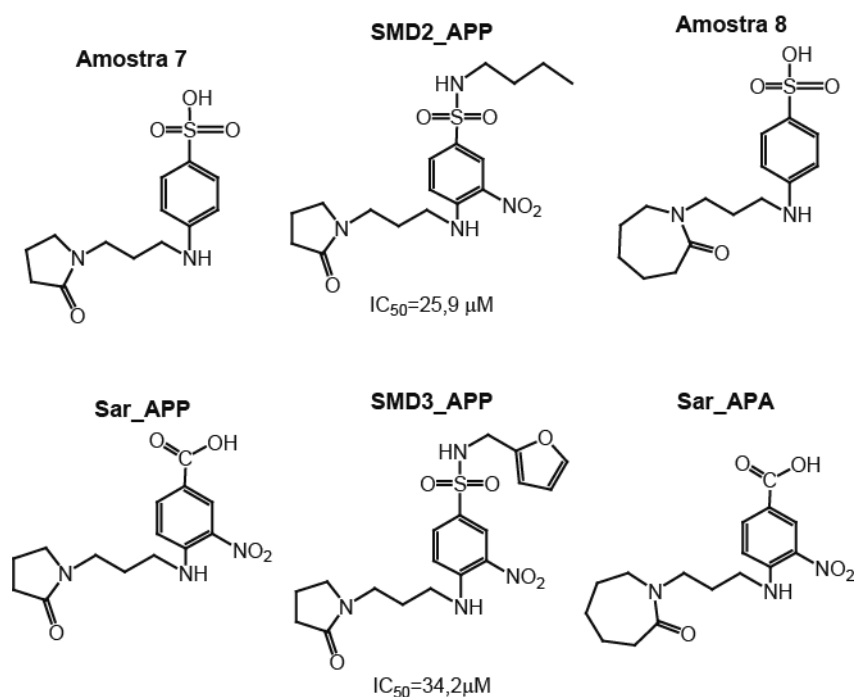
Molécula	IC ₅₀	Número de Células
Amostra 7	Sem efeito até 100 µM	5
Amostra 8	Sem efeito até 100 µM	5
SMD2	13,5 ± 0,6 µM	9
SMD3	16,9 ± 0,6 µM	5
SMD2_APP	25,9 ± 1,5	5
SMD3_APP	34,3 ± 0,9 µM	5
SMD2_SN	34,9 ± 0,7	5
SMD3_SN	60 ± 2,2	5
Sar_APP	Sem efeito até 100 µM	5
Sar_APA	Sem efeito até 100 µM	5

Fonte: próprio autor.

Há como característica comum entre essas moléculas, a presença de aminolactâmas de cadeias cíclicas de cinco (Amostra7, SMD2_APP, Amostra 8, SMD3_APP) ou sete membros

(Sar_APP e Sar_APA) junto ao anel benzênico. O grupo NO₂, na posição *orto* está presente somente nas benzenossulfonamidas SMD2_APP, SMD3_APP, Sar_APA e na SAR_APP. As moléculas SMD2_APP, SMD3_APP e Sar_APP diferenciam-se pela presença dos grupamentos butila e furfurila ligados ao grupamento sulfônico em SMD2_APP e SMD3_APP, respectivamente, enquanto que a molécula Sar_APP apresenta um grupo carboxílico ligado diretamente ao anel benzênico. Desses dados pode-se perceber que a presença do grupamento APP não define, por si só, o caráter bloqueador das moléculas sobre os canais K_v3.1.

Figura 20: Estruturas moleculares de Amostra7, SMD2_APP, Amostra 8, Sar_APP, SMD3_APP, Sar_APA .



Fonte: próprio autor.

Além disso, a presença do grupo nitro na posição *orto* do anel aromático, para as moléculas que não tiveram efeitos, também não parece ser relevante para o efeito inibitório sobre os K_v3.1, uma vez que ele está presente tanto em SMD2_APP, SMD3_APP quanto em Sar_APP e Sar_APA. Destas, somente SMD2_APP e SMD3_APP apresentaram efeitos

bloqueadores. Deduz-se então, que se esses grupamentos fossem essenciais para a atividade bloqueadora, as moléculas Sar_APP e Sar_APA também deveriam apresentar efeitos bloqueadores sobre o canal.

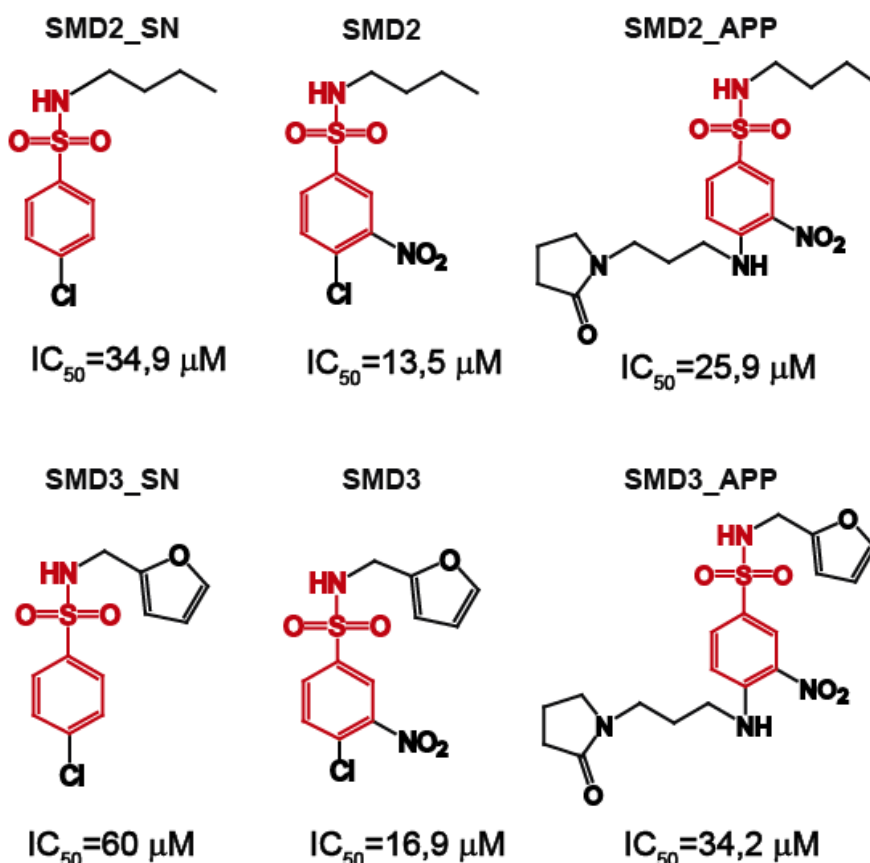
A comparação entre todas as moléculas que não apresentaram efeitos (Amostra 7, Amostra 8, Sar_APP e Sar_APA – figura 20) sobre o canal serve de base para a hipótese de que os grupamentos aminolactâmas também não são determinantes para a atividade bloqueadora. As moléculas Amostra 7 e Amostra 8 são semelhantes entre si, com uma hidroxila ligada ao grupo sulfônico, possuindo grupamentos aminolactâmas de cadeias cíclicas ligadas ao nitrogênio anilínico. A única diferença consiste na quantidade de membros que compõem o grupamento cíclico: a Amostra 7 possui cinco membros (*N*-(3-aminopropil)-2-pirrolidona; APP), enquanto a Amostra 8 possui sete membros (*N*-(3-aminopropil)-2-azepanona; APA). Já as moléculas Sar_APP e Sar_APA são moléculas derivadas do ácido *p*-aminobenzoico, que diferem entre si pelas cadeias cíclicas das aminolactâmas ligadas ao nitrogênio anilínico: a Sar_APP possui cinco membros (*N*-(3-aminopropil)-2-pirrolidona; APP), enquanto a Sar_APA possui sete membros (*N*-(3-aminopropil)-2-azepanona; APA).

Portanto, apesar dessas moléculas apresentarem estruturas semelhantes à SMD2_APP e SMD3_APP, nenhuma delas foi eficaz em promover atividade bloqueadora sobre o canal em concentrações de até 100 μ M. Isto evidencia que o ácido carboxílico diretamente ligado ao anel benzênico, a hidroxila ligada ao grupamento sulfônico e os grupamentos aminolactâmas, não são determinantes para o efeito dessas moléculas em K_V3.1.

Com o exposto acima e a análise da figura 20 pode-se inferir que moléculas análogas ao PABA (Sar_APA e Sar_APP) e análogas ao ácido benzenossulfônico (Amostra 7 e Amostra 8) não promoveram atividade bloqueadora sobre o canal. Já as benzenossufonamidas (SMD2_APP e SMD3_APP) mostraram ser eficazes no bloqueio do canal.

Comparar-se-ão os bioisósteros SMD2, SMD2_APP, SMD2_SN, SMD3, SMD3_APP e SMD3_SN, que bloquearam os $K_v3.1$, analisando as semelhanças estruturais presentes nos elementos ligados ao grupo sulfônico. Como pode ser observado na figura 21, as moléculas SMD2, SMD2_APP e SMD2_SN assemelham-se pela presença de uma cadeia *N*-butílica ligada ao grupo sulfônico. A diferença entre as moléculas SMD2 e SMD2_SN é a ausência do grupo nitro em SMD2_SN, sendo que a diferença para a molécula SMD2_APP é a presença de uma *N*-alquil-lactâma ligada ao nitrogênio de anilina.

Figura 21: Semelhanças estruturais entre as moléculas SMD2_SN, SMD2, SMD2_APP, SMD3_SN, SMD3 e SMD3_APP.



Colorido em vermelho é a porção estrutural, considerada nesse trabalho como responsável por fornecer o caráter inibitório para as moléculas. **Fonte:** próprio Autor.

As diferenças entre as moléculas SMD2 e SMD3 é o grupamento ligado ao grupo sulfônico: *N*-butila em SMD2 e de *N*-furfurila em SMD3. A diferença entre as moléculas

SMD3 e SMD3_SN é a ausência do grupo nitro em SMD3_SN, sendo que as diferenças para a molécula SMD3_APP é a presença de uma *N*-alquil-lactâma ligada ao nitrogênio anilínico.

Tomando-se essas considerações em conjunto, infere-se que, para que as benzenossulfonamidas estudadas neste trabalho apresentarem atividades inibitórias, elas devem conter em sua estrutura química um grupamento amino ligado ao grupamento sulfônico (-SO₂NH-). Isso pode constituir-se de base para o desenvolvimento e elaboração de novas moléculas que atuem em canais para potássio dependentes de voltagem. Em vermelho na figura 21, é apresentado a estrutura proposta como essencial na atividade bloqueadoras dos K_v3.1.

As moléculas Sar_APP e Sar_APA apresentam em sua estrutura o grupo nitro na posição *orto* do anel benzênico, e anteriormente foi mencionado que este grupo não parece ser relevante para o bloqueio. Porém quando este grupo está na posição *orto* do anel benzênico das benzenossulfonamidas, este grupo parece ser relevante para a atividade bloqueadora. Pois a diferença entre os bioisómeros SMD2 e SMD2_SN é exatamente a ausência do grupo nitro em SMD2_SN. O valor de IC₅₀ para SMD2 (13,5 µM) é 2,58 vezes menor que para SMD2_SN (34,9 µM). Para os bioisómeros SMD3 e SMD3_SN, o valor de IC₅₀ para SMD3 (16,9 µM) é 3,55 vezes menor que para SMD3_SN (60 µM).

A molécula SMD2 é mais eficaz no bloqueio, pois o valor de IC₅₀ para SMD2 (13,5 µM) é 1,25 vezes menor que para SMD3 (16,9 µM); o valor de IC₅₀ para SMD2_SN (34,9 µM) é 1,71 vezes menor que para SMD3_SN (60 µM) e o valor de IC₅₀ para SMD2_APP (25,9 µM) é 1,32 vezes menor que para SMD3_APP (34,2 µM). Disso decorre que grupos mais volumosos presentes no nitrogênio ligado ao grupo sulfônico diminuem a eficácia do bloqueio. Além disso, grupos volumosos ligados ao nitrogênio anilínico também influenciam para que haja a diminuição do bloqueio, pois o valor de IC₅₀ para SMD2 (13,5 µM) é 1,91

vezes menor que para SMD2_APP (25,9 μM) e o valor de IC_{50} para SMD3 (16,9 μM) é 2,02 vezes menor que para SMD3_APP (34,2 μM).

Diante disso, seria necessário o estudo de outros bioisómeros de benzenossulfonamidas, através da análise dos valores de IC_{50} obtidos por técnicas de eletrofisiologia para fornecer maiores informações sobre a estrutura-atividade. A partir destes resultados e utilizando técnicas computacionais, tais como: QSAR (*Quantitative Structure–Activity Relationship*) e *docking* poderia encontrar uma padronização dos resultados e, aliados aos resultados experimentais, obter uma melhor compreensão desses grupos químicos à respeito da ligação das moléculas com o canal $\text{K}_v3.1$.

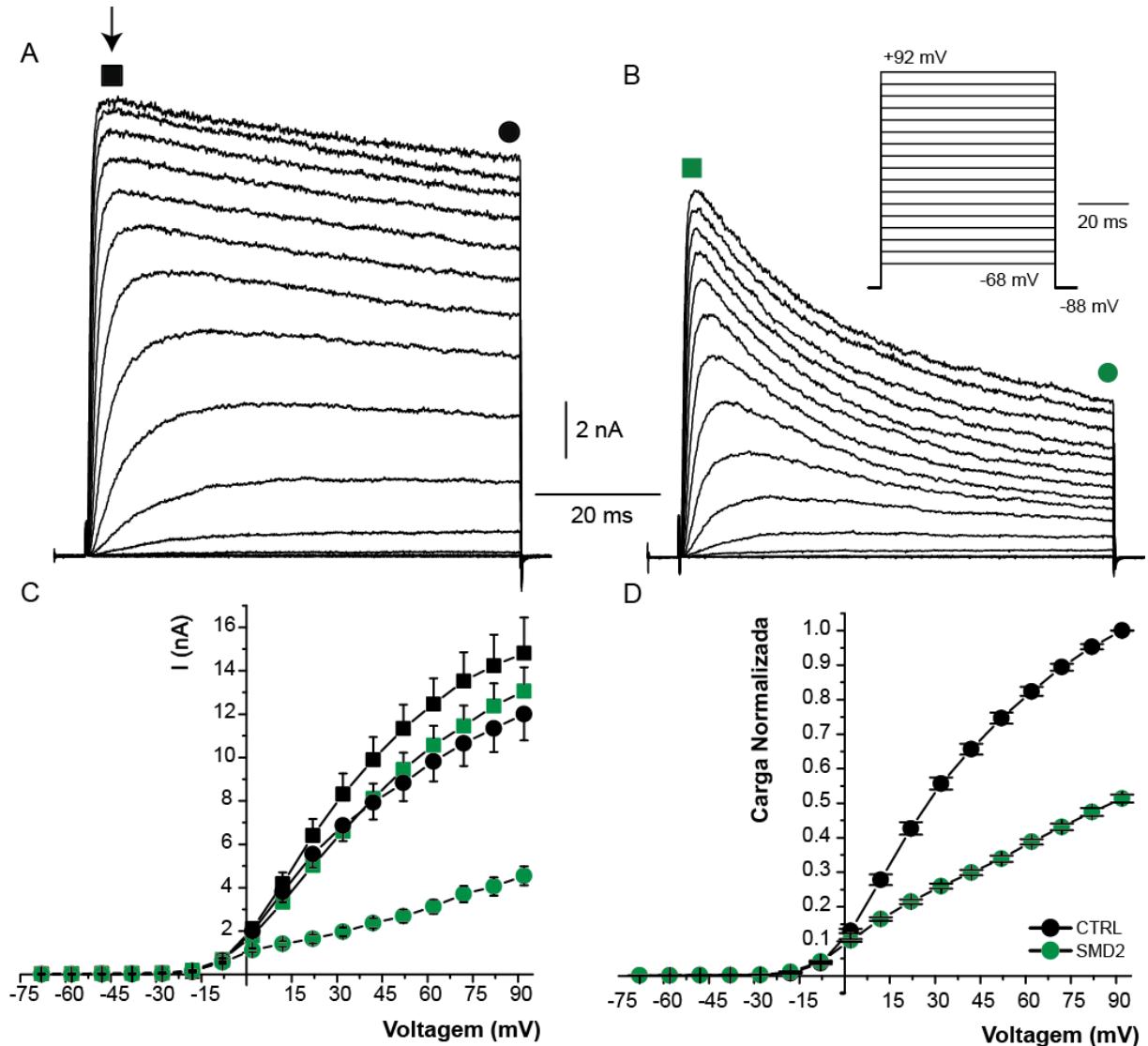
4.2. Mecanismo de ação de SMD2 sobre o canal para potássio $\text{K}_v3.1$

A partir da tabela 4 e da figura 19, nota-se que a molécula que mostrou melhor eficácia no bloqueio foi a molécula SMD2. Foi assumido 13,5 μM como valor de IC_{50} . Este valor de IC_{50} se refere a carga transferida pelo canal e foi adotado como a concentração padrão para os experimentos mostrando os efeitos de SMD2 sobre os $\text{K}_v3.1$ em termos cinéticos, de dependência do uso do canal e sobre a influência do pH para o bloqueio. Assim, consegue-se informações a respeito dos mecanismos de ação dessa molécula.

A maneira elementar de se caracterizar biofísicamente um canal iônico é analisar o decurso temporal da corrente em resposta a diferentes pulsos de voltagem aplicados através da membrana celular. A figura 22 apresenta traçados de corrente em resposta a voltagens para o canal $\text{K}_v3.1$ na presença e na ausência da molécula SMD2. O protocolo utilizado (figura 22B) é constituído de pulsos de voltagem despolarizantes entre -68 mV e +92 mV, com duração de 70ms, em passos de 10 mV com o potencial entre pulsos mantido em -88 mV. Os pulsos foram aplicados em intervalos de 10 s. Como se pode notar, as correntes possuem cinética de

ativação muito rápida, atingindo o pico em aproximadamente 5 ms a partir da aplicação do pulso despolarizante (seta na figura 22A).

Figura 22: Resposta de corrente em relação à voltagem aplicada sobre o canal $K_V3.1$.



A) Traçados representativos de corrente, em resposta a voltagem, para a situação controle. A seta indica o tempo onde a corrente atinge seu máximo. **B)** Traçados representativos de corrente, em resposta a voltagem, na presença de SMD2. Inserido em B é mostrado o protocolo de pulsos de voltagens, partindo de -68 a +92 mV, em passos de 10 mV, com duração de 70 ms e com potencial entre pulsos mantido em -88 mV. Os pulsos foram aplicados em intervalos de 10 s. O quadrado e o círculo em **C**, mostram as regiões onde as correntes foram analisadas. O quadrado representa o pico de corrente e o círculo, a corrente no final do pulso de voltagem mostrados em A e B, o controle em preto e em verde, SMD2 13,5 μ M. **D)** Carga transferida em relação a voltagem, tanto na presença como na ausência de SMD2 e normalizadas pela carga controle no potencial de +92 mV. A taxa de aquisição do sinal foi de 20 KHz. No gráfico estão expostos as médias $\pm$ EPM. (N=5 células). **Fonte:** próprio Autor.

Após a corrente atingir seu pico, começa o processo de inativação do canal, fazendo com que ocorra a diminuição gradual da corrente, mesmo com o pulso despolarizante

permanecendo aplicado ao canal. Quanto mais acentuada a queda da corrente no tempo, mais rápida é a cinética de inativação. Neste caso, a inativação para o canal $K_v3.1$ é tida como lenta, já que seu decaimento total pode levar vários segundos (KLEMIC; KIRSCH; JONES, 2001), corroborando observações de outros autores (GRISSMER *et al.*, 1992; AIYAR *et al.*, 1994; GRISSMER *et al.*, 1994; CHOI *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2007; SUNG *et al.*, 2008; KOPLJAR *et al.*, 2009 e TASKIN *et al.*, 2015).

Na figura 22B, pode-se observar que os efeitos inibitórios de 13,5 μ M de SMD2 sobre as correntes eliciadas por pulsos despolarizantes, são mais eficazes no final do pulso que no pico de corrente. Isto fica mais evidente, analisando-se as médias das correntes, como exposto na figura 22C.

Na figura 22D tem-se a média normalizada da carga transferida pelo canal na presença e na ausência da molécula SMD2. Esses dados mostram, novamente, que o efeito é dependente de voltagem, uma vez que houve diferenças da razão da corrente no pico e no final do pulso aplicado para diversas voltagens aplicadas. Na próxima seção, será explorado o efeito sobre a dependência de voltagem do bloqueio.

4.3. O efeito de SMD2 no canal $K_v3.1$ é dependente de voltagem

4.3.1. Fração de bloqueio e as curvas de condutância

A fração de bloqueio é a relação de quanto a molécula consegue bloquear a passagem de íons através do canal, em relação a situação controle, para as várias voltagens aplicadas. Essa análise é útil para se entender o processo de bloqueio e também pode fornecer informações acerca da fração do campo elétrico do sítio de ligação da molécula no canal. A equação é obtida através da seguinte relação:

$$f = \frac{I_{CTRL} - I_{SMD2}}{I_{CTRL}}. \quad (3)$$

Onde I_{CTRL} e I_{SMD2} são as correntes tomadas no final do pulso aplicado, na ausência e na presença de SMD2, respectivamente. A equação derivada originariamente por WOODHULL (1973), vide ANEXO II, para analisar a relação entre fração de bloqueio e a dependência de voltagem sobre o canal, deve descrever o fenômeno, ou seja:

$$f = \frac{[SMD2]}{[SMD2] + Kd(0) \exp\left(-\frac{z\delta V}{RT}\right)}. \quad (4)$$

Onde $[SMD2]$ é a concentração de SMD2 utilizada, $Kd(0)$ é a constante aparente de dissociação para a voltagem de 0 mV, δ é a fração de campo elétrico através da membrana, onde se localiza o sítio de ligação da molécula ao canal, tendo como referência a face interna da membrana, V é o potencial de membrana, z é a valência do íon, F é a constante de Faraday, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura em K.

A relação entre a condutância do canal e a voltagem foi obtida através de medidas de correntes no final do pulso aplicado, a partir da lei de Ohm:

$$G = \frac{i}{(V - E_R)}. \quad (5)$$

Onde G é a condutância do canal para uma determinada voltagem de membrana (V), E_R é o potencial de reversão da corrente e i é a corrente no final do pulso aplicado. Como G não é constante, mas varia com voltagem, os pontos experimentais podem ser descritos por uma relação de Boltzmann, como abaixo (RODRIGUES *et al.*, 2003):

$$G_{(V)} = \frac{g_{min} - g_{max}}{1 - \exp\left(\frac{V - V_{1/2}}{K}\right)} + g_{max}. \quad (6)$$

Onde $G_{(V)}$ é a condutância em uma dada voltagem, g_{min} é a condutância mínima observada, g_{max} é a condutância máxima observada, K é uma constante que descreve a dependência de voltagem do canal e $V_{1/2}$ é a voltagem onde metade dos canais encontram-se

no estado aberto. Na presença de SMD2, os pontos experimentais só foram adequadamente descritos por uma função dupla de Boltzmann, como segue:

$$G_{(V)SMD2} = \frac{g_{min1} - g_{max1}}{1 - \exp\left(\frac{V - V_1}{K_1}\right)} + g_{max1} + \frac{g_{min2} - g_{max2}}{1 - \exp\left(\frac{V - V_2}{K_2}\right)} + g_{max2} \cdot \quad (7)$$

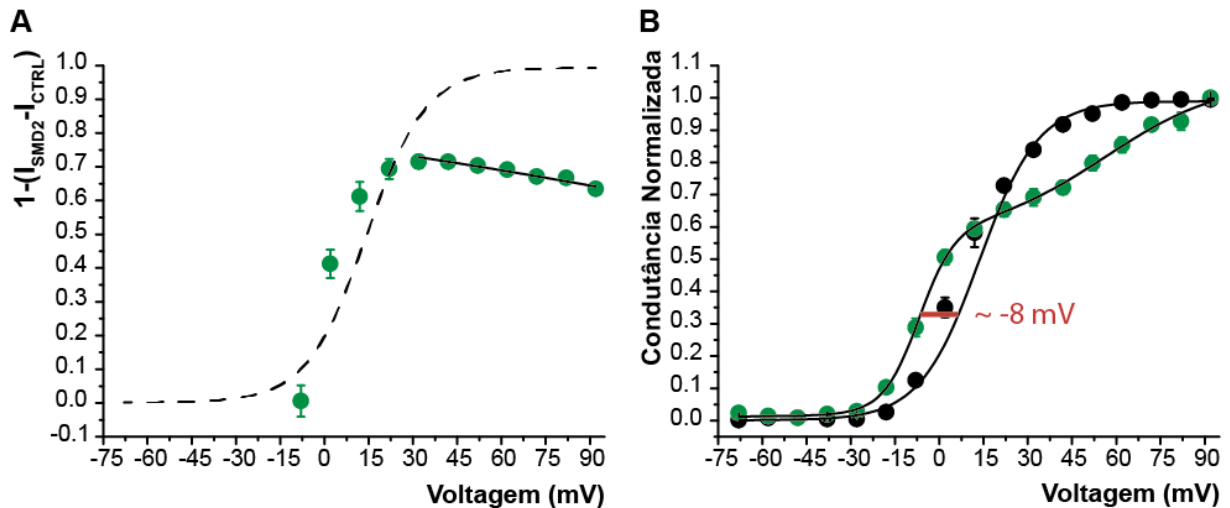
Onde g_{min1} , g_{max1} , g_{min2} , g_{max2} , V_1 , K_1 , V_2 , K_2 são respectivamente, as condutâncias mínima, máxima, para potenciais menores que +12 mV, mínima e máxima para valores maiores que +12 mV; voltagem que atinge metade do valor da condutância e K constante de resposta à voltagem, para voltagens menores que +12 mV e para voltagens maiores que +12 mV, respectivamente. Os resultados são mostrados na figura 23A.

Podem-se observar na figura 23A, dois efeitos distintos sobre a fração de bloqueio. Percebe-se que o valor da fração de bloqueio aumenta gradativamente para valores de voltagem entre -8 mV a +32 mV, indicando assim, que nessa faixa de voltagem o bloqueio começa a aparecer em voltagens onde os canais começam a se abrir, aumentando até o valor máximo de 70% de bloqueio, em torno da voltagem de 30 mV. Para valores de voltagem acima de +32 mV, a fração de bloqueio diminui linearmente com o aumento da voltagem, atingindo o valor de aproximadamente 60 % de bloqueio para a voltagem de +92 mV, ou seja, há um certo alívio do bloqueio.

A linha sólida apresentada na figura 23A é o ajuste do modelo de WOODHULL (Equação 4) aos pontos experimentais. Os valores encontrados para o $K_d(0)$ (valor da constante de dissociação para 0 mV) e para δ (fração do campo elétrico onde a molécula se liga ao canal) foram 4 μ M e 0,17, respectivamente. Comparando o valor de $K_d(0)$, 4 μ M, com o valor de IC_{50} , 9,3 μ M (nesse caso, foi tomado o valor computando-se a fração de bloqueio calculada ao final do pulso de voltagem), nota-se que há uma diferença de aproximadamente 56 %. Já o valor de δ indica que o sítio de ligação para o bloqueio situa-se numa região correspondente a 17 % do campo elétrico da membrana, partindo do meio extra para o

intracelular. Essa região deve ficar próxima ao filtro de seletividade, pois o mesmo é responsável pela queda de cerca de 80 % do campo elétrico através da membrana, adotando-se como referencial o lado interno da mesma (DOYLE *et al.*, 1998).

Figura 23: Dependência de voltagem do efeito de SMD2 em $K_v3.1$.



A) Fração de bloqueio (círculos verdes) em relação à voltagem de membrana. A fração de bloqueio foi calculada a partir das correntes de estado estacionário da figura 23 A e B, através da equação 3. A linha tracejada representa a curva de condutância para o canal. A equação 4 foi ajustada aos pontos experimentais, para voltagens maiores que +32mV (onde a probabilidade de abertura é próxima de 1), obtendo os valores de $K_d(0) = 4 \pm 0,2 \mu M$ e $\delta = 0,17 \pm 0,01$. **B)** condutância normalizada pela condutância máxima, em função da voltagem da membrana. Em círculos pretos está a situação controle e em verde, na presença de SMD2. A linha sólida é o ajuste das equações 6 e 7 aos pontos experimentais, na ausência e na presença de SMD2, respectivamente. Os valores para o $V_{1/2}$ e K na situação controle foi de $14,2 \pm 1,1 mV$ e $10,1 \pm 0,6 mV$. Na presença de SMD2, os valores obtidos para V_1 , K_1 , V_2 , K_2 , foram respectivamente $-7 \pm 0,7 mV$, $6 \pm 0,8 mV$, $56,4 \pm 4 mV$ e $20 \pm 6,6 mV$ (N=7 células). Os gráficos mostram as médias $\pm$ EPM. **Fonte:** próprio autor.

A figura 23B mostra a relação entre condutância e voltagem, na presença e ausência de SMD2. A linha sólida que se ajusta aos pontos experimentais na situação controle é determinada pela equação de Boltzmann. Os valores para o $V_{1/2}$ e K na situação controle foi de $14,2 \pm 1,1 mV$ e $10,1 \pm 0,6$, respectivamente, muito próximos aos encontrados na literatura (GRISMER *et al.*, 1992, CHOI *et al.*, 2001). Observa-se ainda que a curva de condutância começa a atingir seu ponto máximo próximo a +32 mV sendo que, a partir de +42 mV, atinge-se um platô, ou seja, a partir dessas voltagens, o canal se encontra com sua máxima

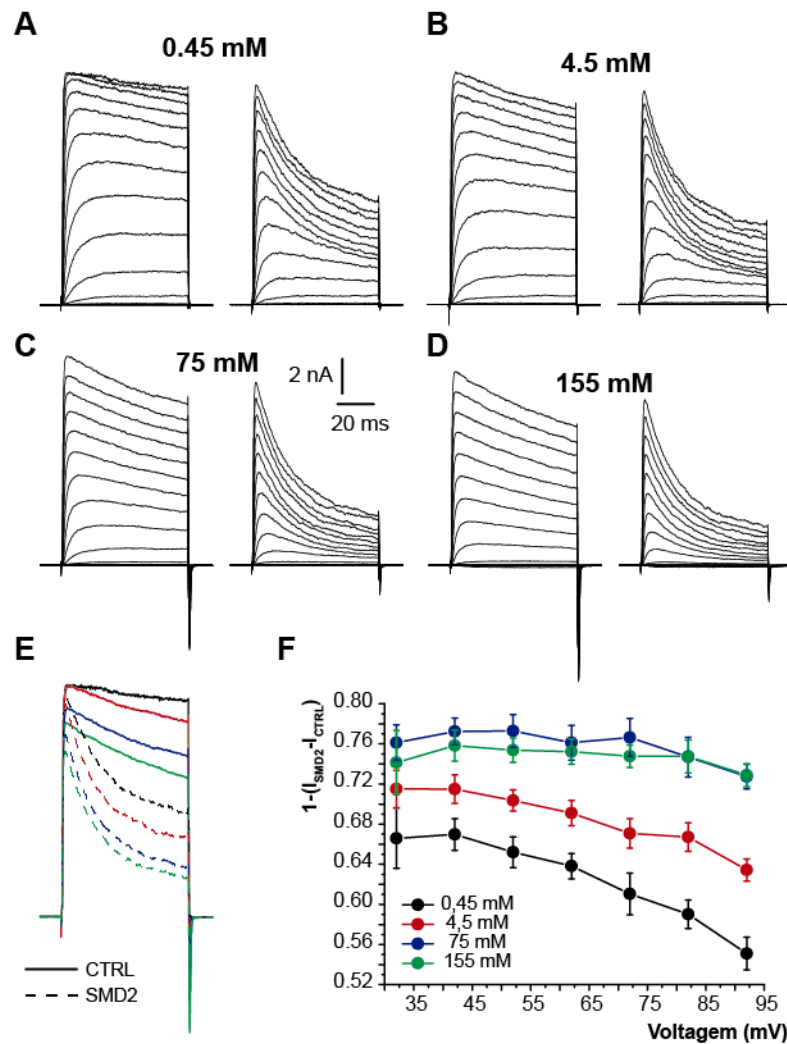
probabilidade de abertura. Além disso, pode-se observar que o canal começa a abrir próximo a voltagem de -30 mV.

Na presença de SMD2 (círculos verdes, figura 23B), observaram-se dois comportamentos distintos para a curva de condutância: para valores de voltagem menores que +12 mV, a curva desloca-se para potenciais mais negativos; já para valores maiores que +12 mV, houve outra mudança, mas agora para potenciais mais positivos e a subida da curva foi de forma quase linear. Nesse caso necessita-se de uma dupla equação de Boltzmann (equação 7) para descrever os dados experimentais. Os valores obtidos para V_1 , K_1 , V_2 , K_2 foram, respectivamente, $-7 \pm 0,7$ mV, $6 \pm 0,8$ mV, $56,4 \pm 4$ mV e $20 \pm 6,6$ mV. A partir dessas informações, depreende-se que para potenciais inferiores a +12 mV há o favorecimento na probabilidade de abertura do canal. Ou seja, SMD2 poderia estar alterando a probabilidade de abertura do canal, sendo um modificador de *gating* (*gating modifier*) (HILLE, 2001). Já para voltagens superiores a +12 mV, a dependência de voltagem torna-se menos acentuada. Isso pode estar relacionado com o fato de que aumentando-se o potencial de membrana, aumenta-se a força elétrica que direcionam os íons K^+ para fora da célula. Como a concentração de potássio foi mantida constante, a relação entre o potencial eletroquímico e o potencial de membrana será linear. A molécula SMD2 se liga ao poro do canal pelo lado externo. Assim, quando ocorre o aumento da diferença de potencial para os íons potássio, através de colisões, eles forçam a saída deslocando moléculas de SMD2 do sítio de ligação, diminuindo o bloqueio. Esse efeito é denominado de alívio do bloqueio e também é observado para outras moléculas atuando sobre outros canais iônicos (HEGINBOTHAM; KUTLUAY, 2004).

Para evidenciar o efeito do efluxo de potássio como agente promotor do alívio de bloqueio foram idealizados experimentos onde a concentração extracelular de potássio foi variada, mas a força iônica da solução foi mantida constante. Isso faz com que o gradiente eletroquímico seja diferente para as soluções testadas. Os resultados estão mostrados na figura

24. Para manter a mesma força iônica para todas as soluções testadas, com diferentes concentrações de íons potássio no meio extracelular, manteve-se constante a soma das concentrações de sódio e potássio no meio extracelular igual a 159,5 mM.

Figura 24: Fração de bloqueio e concentração de potássio extracelular.



A, B, C e D traçados representativos de correntes em função da voltagem para diferentes concentrações externas de potássio (0,45 mM, 4,5 mM, 75mM e 155mM). Os traçados à esquerda indicam a situação controle e à direita indicam para as respectivas concentrações descritas na figura. O protocolo de pulsos de voltagem foi o mesmo descrito para a figura 23. A Figura 25E mostra a sobreposição de todos os traçados de correntes para a voltagem de +92 mV. Em **F**, é mostrada a fração de bloqueio em relação ao potencial para diferentes concentrações de potássio extracelular. A taxa de aquisição foi de 20 KHz (N=5 células). O gráfico mostram as médias $\pm$ EPM. **Fonte:** próprio autor.

A figura 24 mostra a dependência da fração de bloqueio em relação à concentração de potássio extracelular. Em 24A, 24B, 24C e 24D estão os traçados representativos de corrente para as concentrações externas de potássio de 0,45 mM, 4,5 mM, 75 mM e 155 mM,

respectivamente. A Figura 24E, mostra a sobreposição de todos os traçados de corrente para a voltagem de +92 mV. Em 24F, mostra-se a fração de bloqueio em relação às concentrações de potássio. Nota-se que para o potencial de membrana de +32 mV, a fração de bloqueio para 0,45 mM, 4,5 mM, 75 mM e 155 mM, foram, respectivamente, 67 %, 72 %, 76 % e 74 %. Já para potencial de +92 mV a fração foi alterada para 55%, 64%, 73% e 73%, respectivamente, ou seja, quanto maior a concentração extracelular de potássio, maior é o efeito bloqueador de SMD2 sobre o canal. Estes dados parecem corroborar a hipótese de que os íons potássio, através de colisões, conseguem forçar a saída do canal, deslocando a molécula SMD2 do seu sítio de ligação.

Nota-se também em 24A, 24B, 24C e 24D que, quanto maior é a concentração externa de potássio, maior é a velocidade de decaimento das correntes tanto na ausência, como na presença de SMD2. Esse é um dado que pode ser melhor visualizado na figura 24E e mostra que a inativação para esses canais é do tipo U (KLEMIC; KIRSH; JONES, 2001).

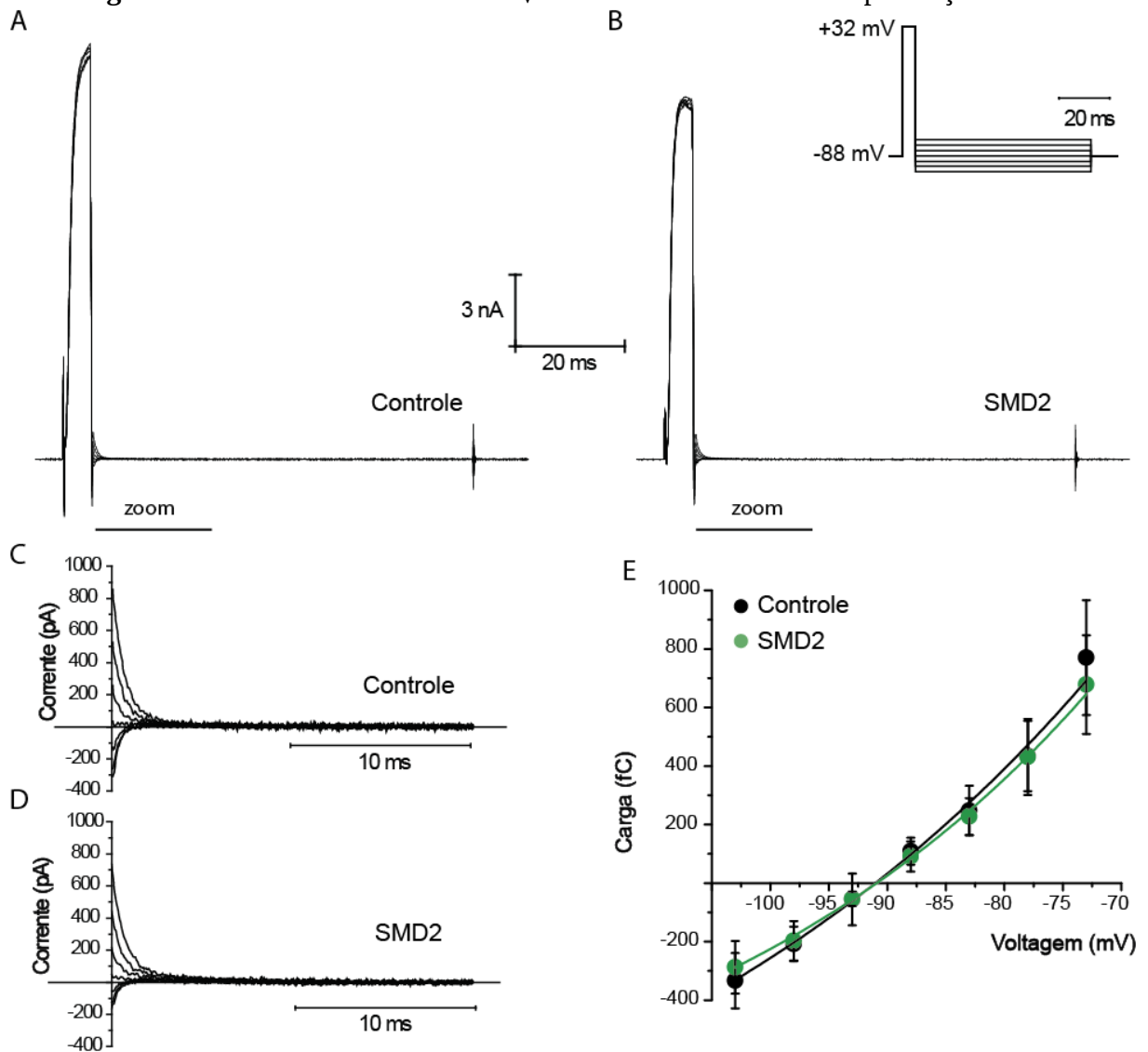
4.4. Seletividade

Quando se testa moléculas ou compostos sobre um determinado canal, uma das perguntas que se faz é se a molécula altera ou não a seletividade do canal. Alterando a seletividade, o canal poderá tornar-se permeável a outros íons. Para testar se a seletividade do $K_v3.1$ não foi alterada pela molécula SMD2, foi utilizado um protocolo onde aplica-se um breve pulso despolarizante suficiente para que o canal se abra e, em seguida, aplica-se um pulso hiperpolarizante para fecha-lo, porém, é necessário algum tempo para que os canais se fechem e assim são observadas correntes de “cauda” oriundas desse processo.

Se o pulso hiperpolarizante de voltagem for mais negativo que o potencial de Nernst para o potássio, a corrente será de entrada, caso contrário, será de saída. Dessa forma, pode-se

determinar um potencial de reversão onde a corrente seja zero, isto é, o íon encontra-se equilibrado através da membrana. Outra forma de se calcular o potencial de reversão é pela integral das correntes de cauda sendo os limites de integração a duração do pulso de voltagem hiperpolarizante aplicado, ou seja, pela carga transferida nesse processo. Neste caso, foi utilizado a carga total transferida pelo canal para avaliar-se o potencial de reversão.

Figura 25: Seletividade dos $K_v3.1$ não se altera na presença de SMD2.



A) traçados de corrente em função da voltagem aplicado, para a situação controle e **B)** traçados de corrente na presença de SMD2. Inserido em B está o protocolo de voltagem, que foi o seguinte: após um breve (5 ms) pulso despolarizado de voltagem, -88 a +32 mV, foram aplicados pulsos hiperpolarizantes de -103 a -73 mV, em passos de 5 mV, com duração de 70 ms, em intervalos de 20 s. O potencial entre os pulsos mantido em -88 mV. Em **C** e **D** são mostrados, respectivamente, os traçados das correntes de cauda, para o controle e na presença de SMD2. A escala de tempo foi estendida para melhor visualização. **E)** carga transferida (integral das *tail currents*) em função da voltagem. Os potenciais de reversão obtidos foram, respectivamente, -91 ± 1 mV e $-90,9 \pm 1,25$ mV para a situação controle e na presença de SMD2. (N = 9 células). O gráfico mostra a média $\pm$ EPM. **Fonte:** próprio autor.

A figura 25 mostra que SMD2 não altera a seletividade do canal. A e B são traçados representativos para as correntes em resposta a vários pulsos de voltagem, na ausência e na presença de SMD2, respectivamente. O protocolo de voltagem está inserido na figura 25B. As figuras 25C e 25D mostram as correntes de cauda (*tail currents*) numa escala de tempo e intensidade de corrente expandidas, para as situações controle e na presença de SMD2, respectivamente. Como esperado, vê-se alguns traçados de corrente com valores menores que 0 pA, indicando que a corrente de potássio foi de entrada e, que nesse caso, o pulso de voltagem aplicado foi mais negativo que o potencial de reversão do K^+ . Além disso, vê-se que não há grandes diferenças entre as *tail currents*, tanto na presença como na ausência de SMD2.

A figura 25E mostra um gráfico da carga (integral das *tail currents*) em função da voltagem aplicada sobre o canal. O potencial de reversão é encontrado quando a carga for nula. Ajustou-se uma exponencial simples e obtiveram-se os valores de, -91 ± 1 mV para o controle e $-90.9 \pm 1,25$ mV na presença de SMD2 para o potencial de reversão. Esses dois valores são muito próximos entre si e também do valor teórico para a reversão de -90,1 mV calculado pela equação de Nernst ($p > 0,05$), teste *t* pareado). Esse resultado indica que a molécula SMD2 não altera a seletividade do $K_{V3.1}$ para o potássio.

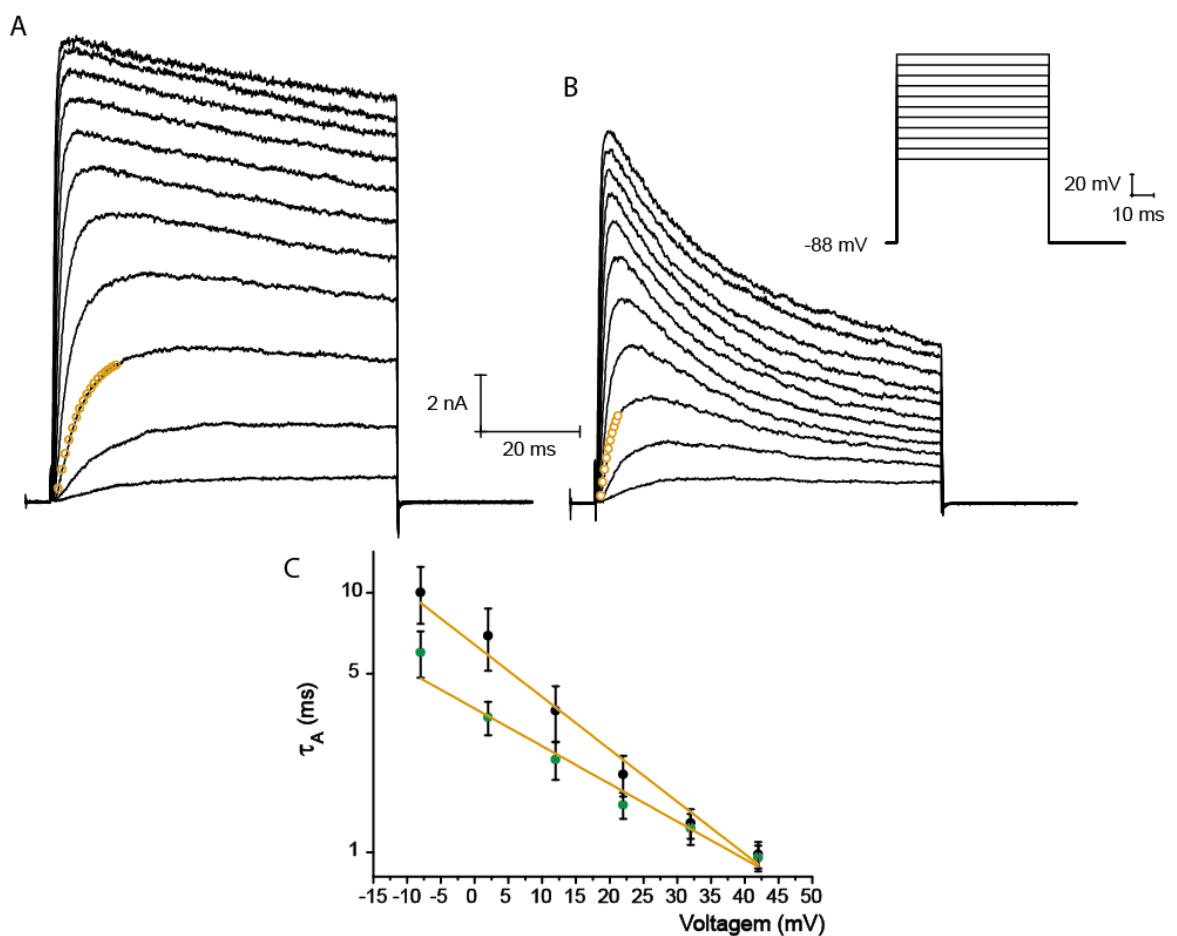
4.5 Efeito de SMD2 sobre as cinéticas de ativação, desativação e inativação do $K_{V3.1}$

4.5.1 Efeitos do SMD2 sobre a ativação dos canais $K_{V3.1}$

A figura 26 mostra a cinética de ativação do canal. Em 26A, tem-se os traçados de corrente em resposta a pulsos despolarizantes de voltagem entre -8 mV e +42 mV em situação

controle e em 26B, as mesmas respostas na presença de 13,5 μM de SMD2. Uma exponencial simples foi ajustada na região de subida da corrente (entre 10-90 % da amplitude máxima - círculos laranjas na figura 26). Dessa forma, obtêm-se os valores para as constantes de tempo da ativação (τ_A) para cada voltagem aplicada, mostrados na figura 26C. No controle, os valores das constantes de tempo de ativação estão próximos aos reportados em trabalhos anteriores para canais $K_V3.1$ (GRISMER *et al.* 1992).

Figura 26: SMD2 muda a cinética de ativação de $K_V3.1$.



A e B traçados de corrente evocados por pulsos de voltagem, para a situação controle e na presença de SMD2. Os pulsos estão inseridos em B e foram os seguintes: pulsos de voltagem aplicados de -88 mV a +42 mV, com duração de 70 ms, em intervalos de 10s, com o potencial entre pulsos mantido em -88 mV e em passos de 10 mV. (τ_A) foi encontrado, conforme descrito no texto, para ambas as situações e estão mostrados em C, círculos verdes na presença de SMD2 e círculos pretos na ausência. Pela linearização de τ_A encontrou-se que τ_A varia evezes/ $21,3 \pm 1,4$ mV para o controle, e evezes/ $29,3 \pm 2,6$ mV na presença de SMD2. A taxa de aquisição foi de 20 KHz. O gráfico mostra a média $\pm$ EPM. (N = 6 células). **Fonte:** próprio Autor.

A relação de $\ln(\tau_A)$ e a voltagem é linear. Assim, o processo é descrito por uma única exponencial. Ajustando-se a equação da reta aos pontos experimentais, encontra-se que τ_A variou $evezes/21,3 \pm 1,4$ mV para o controle, e $evezes/29,3 \pm 2,6$ mV na presença de SMD2 ($p < 0,05$, teste t pareado). Sendo assim, observa-se que na presença de SMD2, a velocidade com que o canal passa do estado fechado para o aberto é mais intensamente dependente da voltagem através da membrana. Fazendo a subtração de τ_A controle pelo τ_A na presença de SMD2, observa-se que essa diferença é -8 mV. Essa mudança de ~ -8 mV também foi observado na curva de condutância mostrada na figura 23. Além disso, observa-se na figura que τ_A na presença de SMD2 é menor em relação ao controle, indicando que o canal abre mais rapidamente na presença da molécula. Portanto, essas informações, suportam a hipótese de que na presença de SMD2, o processo de abertura do canal, nessa faixa de potencial, é facilitado, embora a molécula apresenta-se como inibidora desse canal.

4.5.2 Efeitos sobre a desativação do canal Kv3.1

A cinética de fechamento do canal também foi avaliada a partir de um protocolo, no qual, primeiramente, o canal é aberto com uma despolarização e em seguida, levado a fechar com um pulso hiperpolarizante, como mostrado no inserto da figura 27B.

A figura 27 A e B mostram traçados representativos da corrente em resposta aos pulsos de voltagem aplicados, na ausência e na presença de SMD2, respectivamente. Como esperado, observa-se que durante a despolarização de 20 ms a corrente aumenta devido a abertura dos canais e quando pulsos hiperpolarizantes são aplicados, a corrente decai, sendo denominada de corrente de cauda. Para avaliar o efeito do SMD2 sobre a cinética de fechamento, foram ajustadas exponenciais simples em todas as correntes de cauda, tanto na presença como na ausência de SMD2 e calculadas as constantes de tempo do processo. Os

valores de τ_D foram colocados num gráfico contra a voltagem em escala logarítmica, como mostrado na figura 27C.

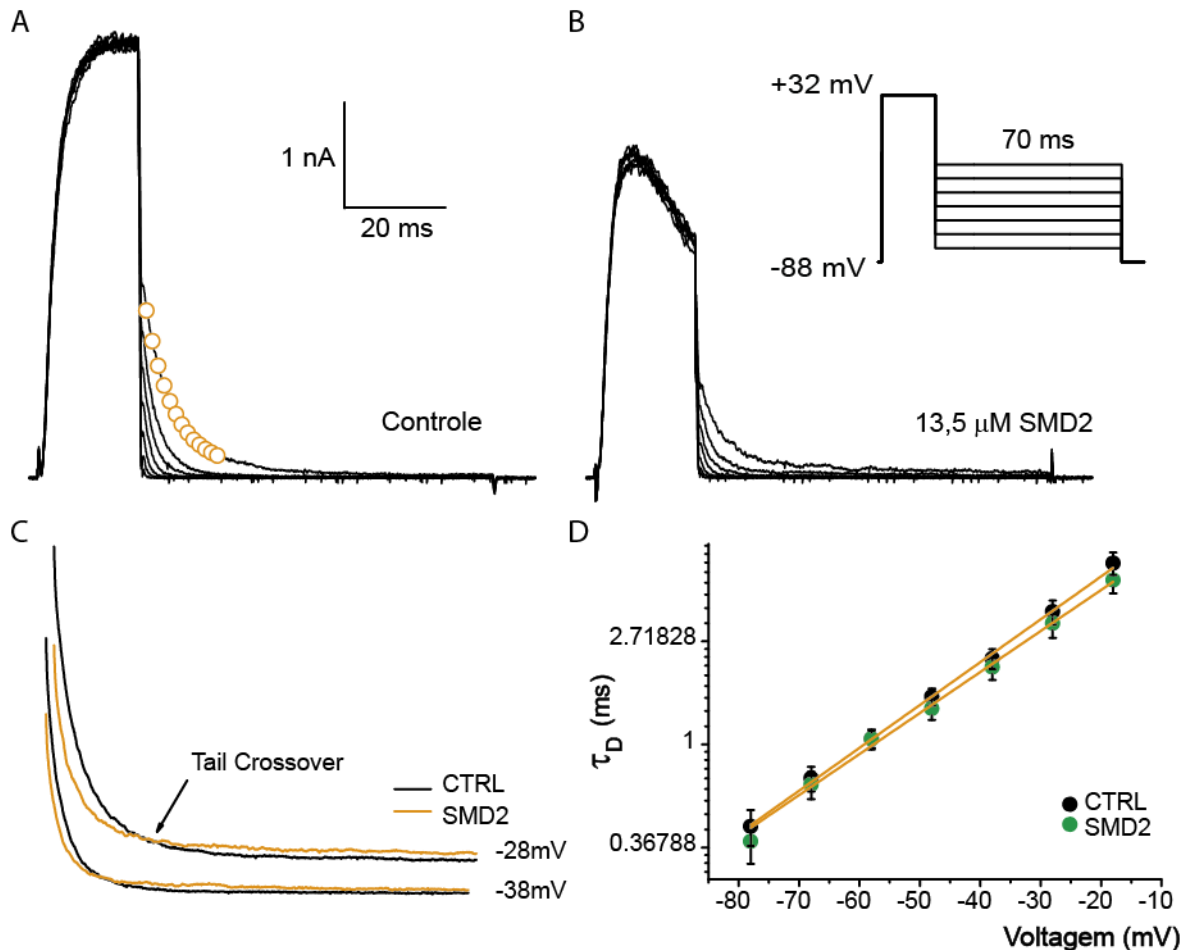
Observa-se que os valores para potenciais menos hiperpolarizados (-28 mV, por exemplo), a constante de tempo de desativação é maior do que para pulsos mais hiperpolarizados (por exemplo, -78 mV), indicando que, quanto maior a diferença de potencial hiperpolarizante, mais rápido é o fechamento do canal. Essa relação foi observada tanto na presença como na ausência da molécula. Além disso, a relação entre o $\ln(\tau_D)$ e a voltagem é linear, ou seja, o processo pode ser descrito por uma única exponencial. Ajustando-se a equação da reta aos pontos experimentais, encontra-se que τ_A variou evezes/ 24.4 ± 1.1 mV para o controle, e evezes/ 25.6 ± 1.1 mV na presença de SMD2 ($p < 0,05$, teste t pareado), ou seja, não houve efeito significativo sobre o processo de desativação do canal ($p < 0,05$).

A figura 27C mostra traçados das correntes de cauda para os valores de potencial de -28 e -38 mV. Observa-se que o traçado da corrente na presença de SMD2 cruza o de corrente de cauda na situação controle, isto é, o traçado de corrente inicia com menor magnitude e decai mais lentamente em relação ao da corrente controle, cruzando-o. Esse fenômeno é denominado de *tail crossover* e é típico de bloqueadores que atuam em canais no estado aberto.

Esse fenômeno pode ser facilmente explicado da seguinte maneira: na presença de SMD2, após 20 ms do pulso despolarizado, o canal se abre e a molécula bloqueia-o. Quando a membrana é repolarizada, os canais tendem a se fechar. Porém, os canais que estavam bloqueados, para se fecharem, necessitam que a molécula SMD2 saia. Quando a molécula sai, esses canais voltam para o seu estado aberto, o que provoca um aumento momentâneo na corrente. Esse aumento é o que provoca o *tail crossover*. Esse fenômeno foi observado para outras moléculas como por exemplo: quinidina em $K_V1.5$ (SNYDERS *et al.*, 1995), fluoxetina

e norfluoxetina em $K_V3.1$ (CHOI *et al.*, 2001). Essas duas moléculas são bloqueadores de canal aberto para os canais $K_V3.1$.

Figura 27: SMD2 não muda a constante de tempo de desativação de $K_V3.1$.



A e **B** traçados representativos das correntes de cauda utilizados para estimar a constante de tempo de desativação de $K_V3.1$, (τ_D), no controle e na presença de $13,5 \mu\text{M}$ SMD2, respectivamente. Inserido em **B** é apresentado o protocolo de voltagem aplicado, onde após um breve pulso despolarizante (-88 mV a $+32 \text{ mV}$) de 20 ms , são aplicados pulsos hiperpolarizantes (de -88 a -18 mV por 70 ms em passos de 10 mV), para que a membrana se repolarize e o canal se feche. Entre os pulsos o potencial foi mantido em -88 mV . **C**) mostra o fenômeno de *tail crossover*. **D**) τ_D foi calculada por ajuste de uma única função exponencial entre 10 e 90% da fase de decaimento dos traçados de corrente (mostrado em laranja). τ_D variou vezes/ $24,4 \pm 1,1 \text{ mV}$ e vezes/ $25,6 \pm 1,1 \text{ mV}$ na ausência e na presença de SMD2, respectivamente. O gráfico mostra a média $\pm$ EPM ($N = 11$). **Fonte:** próprio autor.

4.5.3. Efeitos de SMD2 sobre a inativação do canal $K_V3.1$

O processo de inativação se expressa como um decaimento na amplitude da corrente, mesmo mantendo-se a membrana despolarizada. Na verdade, o canal permanece no estado

aberto, porém não condutor. Há 4 tipos de inativação presentes em canais para potássio: a inativação Tipo-C (quando ocorre o fechamento da porção carboxílica dos aminoácidos, posicionados no segmento S6 (lenta); a inativação Tipo-N, também chamada de *ball and chain*, onde alguns peptídeos localizados no terminal amino do canal o entopem, não permitindo a passagem de íons (inativação rápida) (KURATA; FEDIDA, 2006); a inativação Tipo-P que ocorre devido ao colapamento da porção do poro condutor bloqueando o fluxo dos íons e a inativação Tipo-U que é uma inativação lenta, porém ainda não se sabe, do ponto de vista estrutural, quais as porções envolvidas nesse processo (CHENG *et al.*, 2011; JAMIESON; JONES, 2013). Esta última, diferencia-se da inativação do Tipo-C devido à relação entre o grau de inativação e a voltagem apresentar-se em forma de U, além do fato de que o aumento na concentração de potássio no meio extracelular aumentar a intensidade da inativação (Figura 24E) (KLEMIC; KIRSCH; JONES, 2001). Por outro lado, o aumento da concentração de potássio extracelular tende a diminuir a intensidade da inativação tipo C (BAUKROWITZ; YELLEN, 1996).

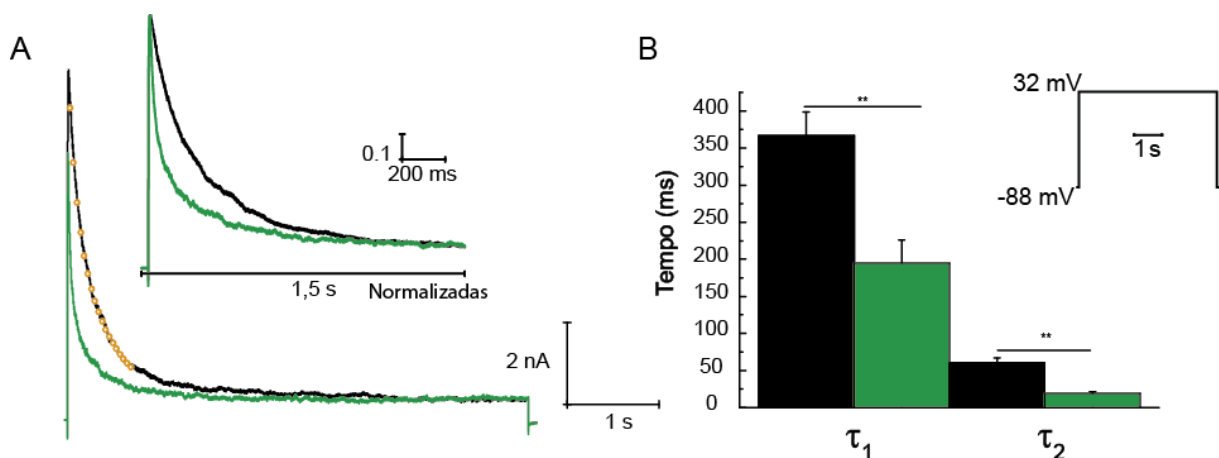
Nesse estudo, avaliou-se o efeito da inativação no decurso temporal da corrente em resposta a pulsos despolarizantes, e também sobre a dependência de voltagem na inativação, tanto na presença como na ausência de SMD2.

4.5.3.1 Efeito de SMD2 sobre o decurso temporal da inativação

Para avaliar o efeito de SMD2 sobre o decurso temporal da inativação, aplicou-se um pulso despolarizante (5 s), variando de -88 a +32 mV, com o potencial entre pulsos mantido em -88 mV, como mostrado no inserto da figura 28B. A figura 28A mostra os traçados representativos da corrente em resposta a esse pulso despolarizante. Os traçados em preto referem-se à situação controle e em verde, na presença de SMD2. O decurso temporal do

processo de inativação foi descrito por uma função exponencial dupla, ajustada aos traçados de corrente, de acordo com a seguinte equação: $y = y_0 + A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$, onde A_1 e A_2 são constantes de proporcionalidade da equação; τ_1 e τ_2 são, respectivamente, as constantes de tempo rápida e lenta e y_0 é a corrente no tempo igual a zero. As médias e os erros padrões das médias de τ_1 e τ_2 são mostrados na figura 29 B, na ausência (em preto) e na presença de SMD2 (em verde). Os valores das constantes de tempo lenta e rápida para o controle foram $60,7 \pm 6,5$ ms e $367 \pm 31,7$ ms, respectivamente. Na presença de SMD2 esses valores foram significativamente ($p < 0,05$, teste t pareado) reduzidos para $19,5 \pm 2$ ms e $195,1 \pm 30,8$ ms, respectivamente.

Figura 28: Efeito de SMD2 sobre o decurso temporal da inativação Tipo-U de $K_v3.1$.



A) traçados de corrente em a resposta a voltagem aplicada. Em preto são os traçados na situação controle e em verde na presença de SMD2. Inserido em **A)** são mostrados os traçados de corrente normalizados na janela temporal de 1,5 s. Os círculos laranjas mostram o ajuste da exponencial dupla ao traçado de corrente como descrito no texto. O protocolo de voltagem está inserido em **B)**. O pulso de voltagem aplicado foi de -88 a +32 mV, com duração de 5 s. **B)** mostra um gráfico de barras das médias de todas as constantes de tempo τ_1 e τ_2 (lenta e rápida respectivamente) na presença (verde) e na ausência de SMD2 (preto). A taxa de aquisição foi de 20 KHz (N=8 células). O gráfico mostra a média $\pm$ EPM. **Fonte:** próprio autor.

Fazendo-se a razão entre as constantes de tempo na presença de SMD2 e na situação controle ($\tau_{SMD2}/\tau_{control}$) para ambas as constantes, rápida e lenta, obtiveram -se os valores de 0,32 para a rápida e 0,53 para a lenta. Isso sugere que a molécula SMD2 estaria promovendo efeitos maiores na constante de tempo rápida do que na constante de tempo lenta. Porém, a diminuição dos valores das constantes de tempo são, na realidade, efeito do

bloqueio do canal $K_v3.1$ no estado aberto, por SMD2. Armstrong (1969) mostrou que TEA apresenta um efeito apenas aparente sobre a inativação na corrente de potássio em axônio gigante de lula. Essa mesma ideia prevalece aqui, ou seja, a molécula SMD2 aparentemente promove uma acentuação no processo de inativação, porém esse efeito é simplesmente consequência do bloqueio do canal aberto, que se reflete na diminuição da corrente no tempo, mesmo em potenciais mais despolarizados.

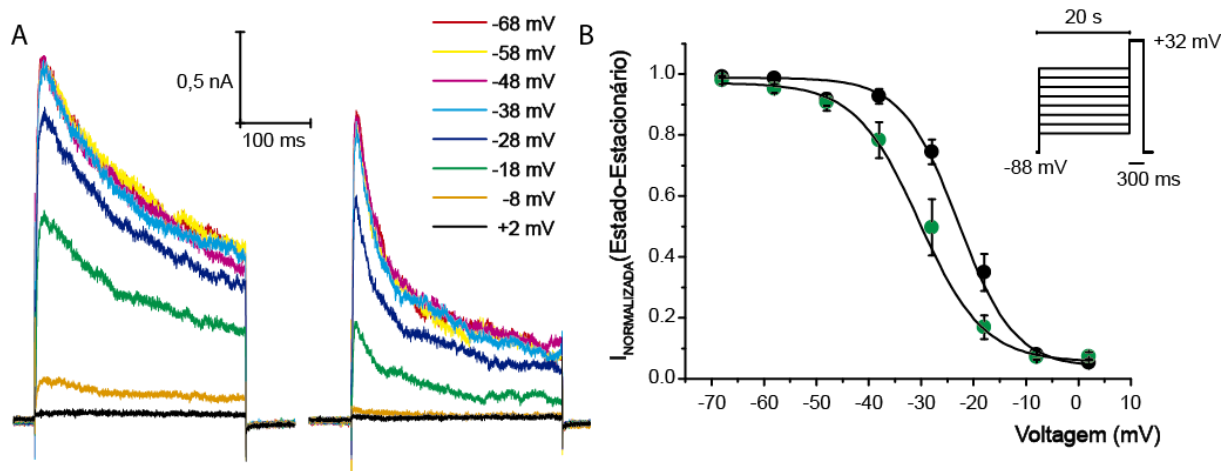
4.5.3.2 Efeito de SMD2 sobre a dependência de voltagem da inativação do $K_v3.1$

Nessa seção, mostrar-se-á o efeito de SMD2 sobre o processo de inativação do canal $K_v3.1$. Para tanto, aplicou-se um pulso despolarizante e condicionante de voltagem suficientemente longo para que os canais possam atingir o estado estacionário inativado. Os pulsos condicionantes variaram de -68 a -8 mV, durante 20 s, em passos de 10 mV. Após o pulso condicionante, foi aplicado um pulso despolarizante para +32 mV durante 300 ms, denominado de pulso teste, para avaliar a inativação estacionária para cada voltagem condicionante (inserto na Figura 29A). A figura 29 mostra resultados desse experimento. Em 29A são apresentados traçados representativos das correntes em resposta ao pulso teste para os vários pulsos condicionantes, tanto na presença como na ausência de SMD2.

Na figura 29B apresenta-se a relação entre a corrente no estado estacionário e a voltagem do pulso condicionante, sendo em preto o controle e em verde na presença de SMD2. Como se pode observar, quanto mais despolarizado o pulso condicionante, menor a amplitude de corrente em resposta ao pulso teste. Ou seja, quanto mais despolarizado, maior é o número de canais que entram para o estado inativado. Os pontos experimentais são adequadamente descritos pela equação de Boltzmann: $I(V) = I_{max} + (I_{min} - I_{max}) / (1 - \exp((V - V_{in})/K_i))$, onde I_{min} e I_{max} são as corrente mínimas e máximas, V_{in} e K_i são,

respectivamente, a voltagem onde a probabilidade da volta da inativação é 50 % e K_i , o fator de dependência de voltagem do sistema. Os valores encontrados para V_{in} e K_i na ausência de SMD2 foram de $-22,9 \pm 1,5$ mV e $5,3 \pm 0,9$ mV, respectivamente. Na presença de SMD2 os valores foram $-30,3 \pm 1,3$ mV e $6 \pm 0,8$ mV, respectivamente. Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores controle e na presença de SMD2 para o V_{in} , porém não houve diferenças significativas para os valores K_i .

Figura 29: Efeito de SMD2 na dependência de voltagem da inativação em $K_V3.1$.



A) traçados representativos de correntes em resposta ao pulso teste. O protocolo de voltagem está inserido em B. Foram aplicados vários pulsos de voltagens condicionantes, durante 20 s, variando de -68 até +2 mV. Após cada pulso condicionante foi aplicado um pulso teste de +32 mV, durante 300 ms. O potencial entre cada pulso foi mantido em -88 mV e o intervalo entre pulso foi de 20s. **B)** As correntes normalizadas a partir do estado estacionário (evocados pelo pulso teste) são mostradas em relação à voltagem do pulso condicionante. A equação de Boltzmann, foi ajustada aos pontos experimentais e os valores obtidos de V_{in} e K_i foram $-22,9 \pm 1,5$ mV e $5,3 \pm 0,9$ mV para o controle e $-30,3 \pm 1,3$ mV e $6 \pm 0,8$ mV para SMD2, respectivamente. V_{in} para a situação controle e para SMD2 foram significativamente diferentes, enquanto K_i não foram ($p < 0,05$ teste t pareado). A taxa de aquisição foi de 10 KHz ($N = 6$ células). O gráfico mostra a média $\pm$ EPM. **Fonte:** próprio autor.

Na presença de SMD2, a curva apresenta-se com desvio para a esquerda, isto é, para potenciais mais hiperpolarizados, similar ao efeito causado na curva de condutância *versus* voltagem, indicando que os canais inativam-se em voltagens mais hiperpolarizadas. Pode-se sugerir que na presença de SMD2, a volta do estado inativado para o estado aberto é facilitada. Isto pode ser explicado pelo fato do canal estar em seu estado aberto e bloqueado e com isso o processo não se daria do estado inativado, mas sim do estado aberto e bloqueado

para o estado aberto condutor. O fator de resposta à voltagem K_i não mudou na presença de SMD2 em comparação ao controle. Este fator indica a intensidade com que o canal responde a mudanças de voltagem.

4.6.Efeitos da molécula SMD2 na recuperação da inativação do canal $K_v3.1$

A recuperação dos canais de potássio do processo de inativação é muito importante tanto para a gênese como para a propagação de potenciais de ação. Quanto mais curto é o tempo de recuperação do canal, mais rápido ele estará disponível para atuar na repolarização da membrana, predispondo os canais para sódio a se abrirem e gerando um novo potencial de ação. Isto permite uma maior frequência de disparo de potenciais de ação pela célula. Como o canal $K_v3.1$ é encontrado em neurônios com alta frequência de disparos (LI; KACZMAREK; PERNEY, 2001; MACICA; KACZMAREK, 2001), torna-se interessante entender o efeito de SMD2 sobre esse componente cinético do canal.

Dessa forma, vários protocolos foram utilizados para avaliar o efeito de SMD2 sobre a cinética de recuperação do canal. Primeiramente, será apresentado o efeito sobre a cinética de maneira mais geral, com protocolos clássicos de recuperação. Depois serão apresentados protocolos específicos para entender o bloqueio dependente do uso e sobre o tempo entre a aplicação dos pulsos. Esses protocolos permitirão inferir sobre os tempos de ligação e de desligamento da molécula ao canal $K_v3.1$.

4.6.1 SMD2 altera a cinética de recuperação dos $K_v3.1$

Para avaliar o fenômeno de recuperação do canal, foram utilizados pulsos despolarizantes pareados, de -88 mV a +32 mV (duração de 200 ms), com intervalos de

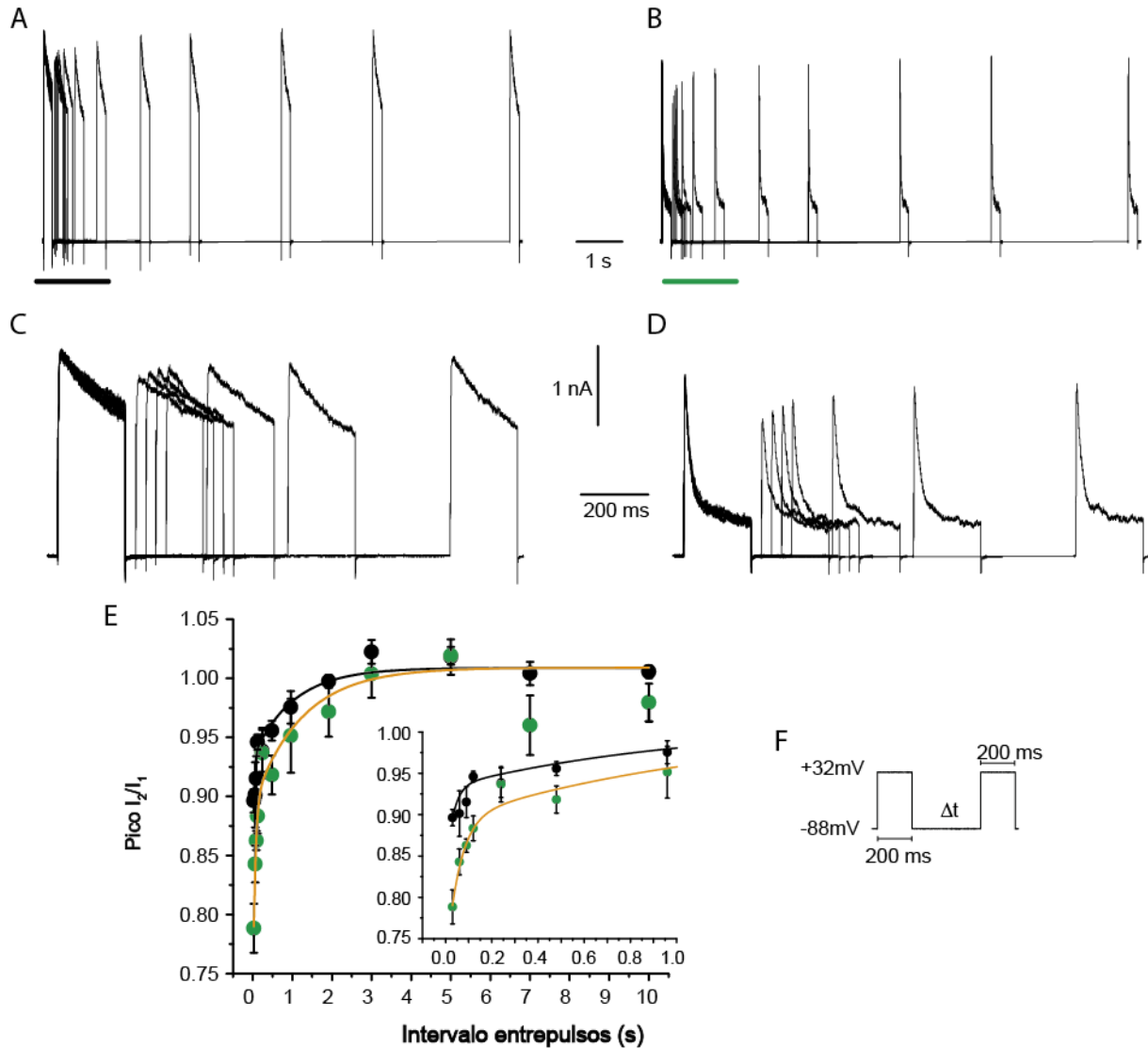
tempo variáveis entre o primeiro e o segundo pulso, conforme mostrado na Figura 30E. Os intervalos entre pulsos foram de: 0,03, 0,06, 0,12, 0,24, 0,48, 0,96, 2, 3, 5, 7 e 10 s.

A figura 30A, mostra traçados representativos de corrente para todos os intervalos entre pulsos, na situação controle e em B, na presença de SMD2. As figuras 30C e 30D, mostram os traçados das correntes na situação controle e na presença de SMD2, respectivamente, em escala temporal expandida para melhor visualização. Como pode-se observar, para intervalos de tempo muito curtos, as reposta de correntes ao segundo pulso são menores que as observadas no primeiro pulso. Na presença de SMD2, esse efeito é acentuado, indicando que a molécula aumenta o intervalo de tempo necessário à recuperação do canal $K_v3.1$. Observa-se ainda que, a partir de 0,96 s, a recuperação do canal, tanto na presença como na ausência de SMD2, é praticamente completa. Chega-se a esta conclusão devido ao fato dos dois picos dos traçados de corrente terem valores muito próximos.

A figura 30E mostra os dados de modo gráfico, onde a razão entre os picos de corrente em resposta ao segundo pulso e aqueles obtidos no primeiro pulso é colocada contra os intervalos de tempo entre os pulsos. Inserido em 30E, mostra-se a razão entre os picos numa escala expandida de até 1 s para melhor visualizar a recuperação conseguida nos intervalos de tempo mais curtos.

Os pontos experimentais das figuras 27E podem ser adequadamente descritos através de uma exponencial dupla do tipo: $y = y_0 + A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$, onde A_1 e A_2 são constantes de proporcionalidade da equação; τ_1 e τ_2 são as constantes de tempo rápida e lenta, respectivamente, e y_0 é a corrente no tempo igual a zero. Os valores obtidos para τ_1 e τ_2 , na situação controle, foram $0,03 \pm 0,05$ s e $1,0 \pm 0,4$ s, respectivamente. Na presença de SMD2 esses valores foram $0,06 \pm 0,04$ s e $1,2 \pm 1$ s, respectivamente. Através de teste t pareado ($p < 0,05$) observou-se que tanto τ_1 como τ_2 são significativamente diferentes na presença de SMD2 em relação ao controle.

Figura 30: Recuperação da cinética de inativação de Kv3.1.



A mostra a corrente em resposta a voltagem aos duplos pulsos despolarizantes para a situação controle e **B** na presença de SMD2. A duração dos pulsos foi de 200 ms e o intervalo entre os pulsos variaram. O potencial entre os pulsos foi mantido em -88 mV e a taxa de aquisição foi de 10 KHz. O protocolo é apresentado em **F**. Em **C**, são apresentados os traçados de corrente para a janela de tempo de até 1s, para o controle e em **D** na presença de SMD2. Em **E**, é apresentada a razão entre o segundo pico e o primeiro pico de corrente em relação ao intervalo entre pulsos. Inserido em **E** mostra-se o mesmo gráfico para a janela de tempo de até 1s. Através do ajuste de dupla exponencial, como descrito no texto, valores obtidos para τ_1 e τ_2 , na situação controle, foram $0,03 \pm 0,05$ s e $1,0 \pm 0,4$ s, respectivamente. Na presença de SMD2 esses valores foram $0,06 \pm 0,04$ s e $1,2 \pm 1$ s, respectivamente. Ambas as constantes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste t pareado) ($N=6$ células). O gráfico mostra a média $\pm$ EPM. **Fonte:** próprio autor.

Fazendo a razão entre as constantes de tempo na presença e na ausência de SMD2, ou seja, $\tau_{1SMD2}/\tau_{1CTRL}$ e para $\tau_{2SMD2}/\tau_{2CTRL}$, obtém-se respectivamente, 2 e 1,2. Isso indica que a cinética de recuperação na presença de SMD2 é mais demorada. Essa relação era de se esperar, devido à introdução de um novo passo cinético no processo de abertura do canal, ou

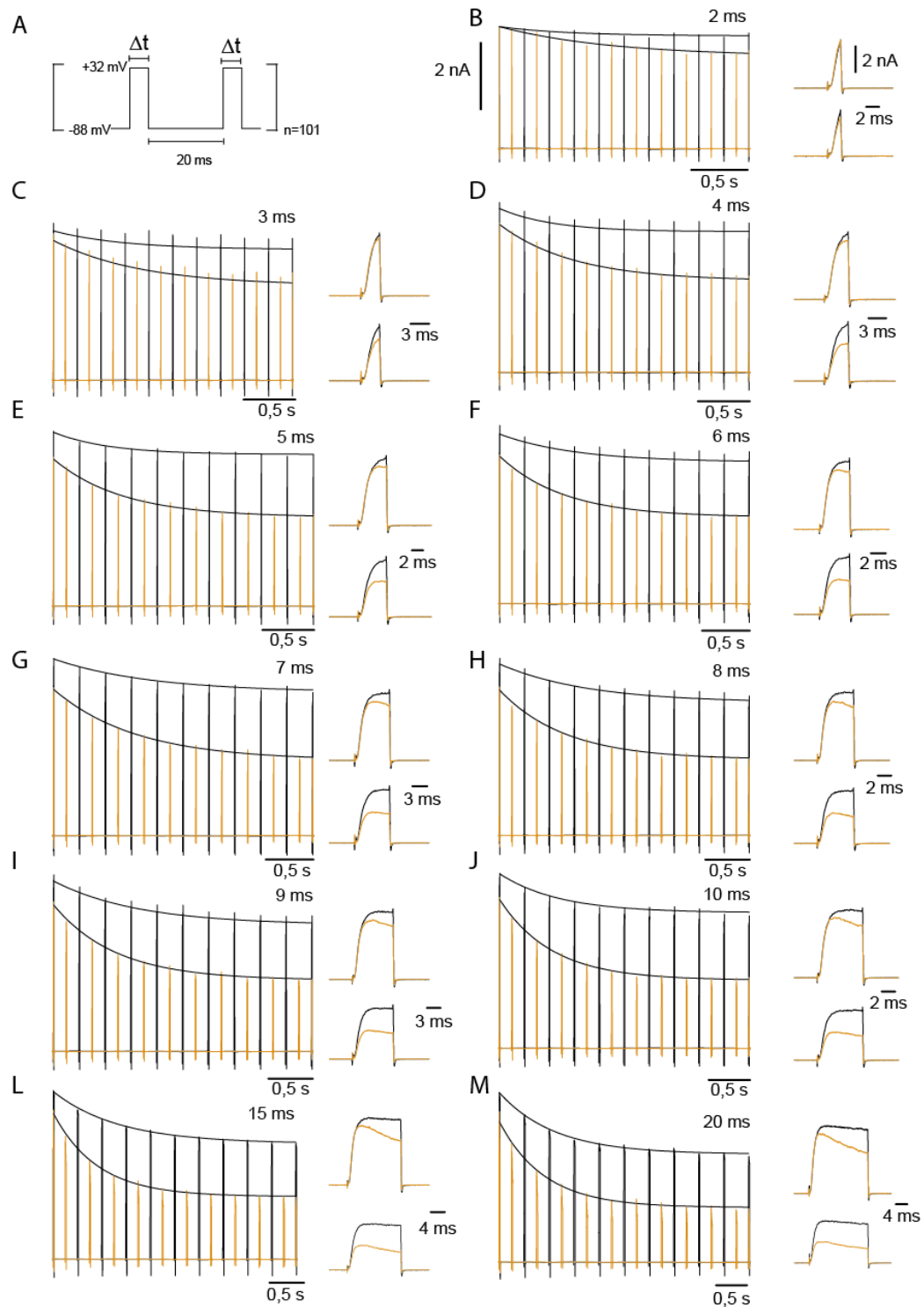
seja, na presença de SMD2, há o estado bloqueado. Dessa forma, para que ocorra a abertura novamente dos canais que foram bloqueados, eles devem sair do estado bloqueado com a expulsão da molécula do canal. Provavelmente, a demora na cinética de recuperação seja devido a esse processo.

4.6.2. SMD2 altera a dependência do uso do $K_v3.1$ (*use-dependence*)

Uma série de experimentos foi realizada para avaliar o efeito de SMD2 sobre o uso do canal $K_v3.1$, isto é, será que o bloqueio depende da frequência com que o canal abre e fecha? Foram aplicados 101 pulsos de voltagem despolarizantes, de -88 a +32 mV, mantendo-se o intervalo entre pulsos constante em 20 ms, porém, variando-se a duração de cada pulso (os tempos utilizados foram: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 e 20 ms) conforme ilustrado no esquema da figura 31A. As figuras 31B, C, D, E, F, G, H, I, J, L e M são as repostas de corrente aos pulsos para todas as durações mostradas acima. No lado direito das figuras 31B, C, D, E, F, G, H, I, J, L e M são mostrados o primeiro (número 1, acima) e o último traçado de corrente (número 101, abaixo), em escala de tempo aumentada para melhor visualização. Em preto são os traçados controle e em laranja, na presença de SMD2. Todos esses protocolos foram realizados na mesma célula.

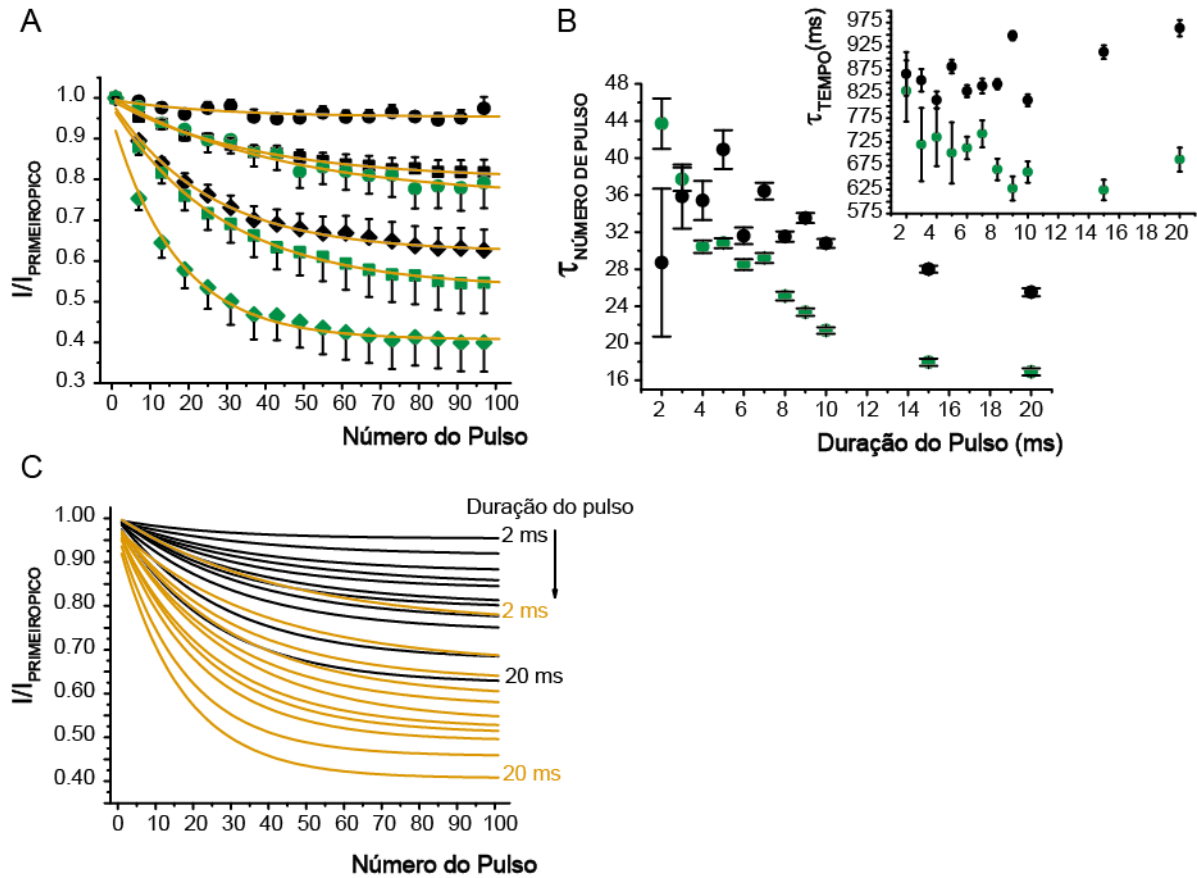
Os dados obtidos, para esse tipo de experimento, estão reunidos na figura 32. Para avaliar a influência da duração do pulso sobre o efeito de SMD2, normalizaram-se os picos de corrente das 101 respostas, em relação ao valor do pico obtido na primeira resposta. Isto está mostrado na figura 32A em função do número do pulso aplicado. Na figura 32A, apresentam-se apenas os picos normalizados para pulsos despolarizantes com durações de 2, 7 e 20 ms, para efeitos representativos e de melhor visualização.

Figura 31: Efeito de SMD2 na dependência do uso do canal Kv3.1.



A) Mostram-se os pulsos despolarizantes que variaram de -88 a +32 mV, mantendo-se o intervalo entre eles em 20ms e o potencial entre pulsos em -88 mV. **B, C, D, E, F, G, H, I, J, L e M** são traçados representativos em relação a duração dos pulsos despolarizantes, respectivamente, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 e 20. Em preto é para a situação controle e em laranja, na presença de SMD2. No lado direito dos traçados apresentados nas figuras **B, C, D, E, F, G, H, I, J, L e M** são mostrados o primeiro (n=1, traçado superior) e o último traçado de corrente (n=101, traçado inferior), em escala de tempo aumentada para melhor visualização. A taxa de aquisição foi de 50 KHz (N=7 células). Para fins de clareza, apenas 1 para cada 10 pulsos estão mostrados. **Fonte:** próprio autor.

Figura 32: Duração do pulso despolarizado em K_v3.1 aumenta o bloqueio por SMD2.



A) razão de um determinado pico em relação ao primeiro pico da corrente. Em preto é para a situação controle e em verde na presença de SMD2 (verde), em relação ao número do pulso aplicado (duração dos pulsos: $\bullet$ = 2 ms; $\blacksquare$ = 7 ms e $\blacklozenge$ = 20 ms). Para fins de clareza, são mostrados apenas um para cada seis pontos. As linhas laranjas são os melhores ajustes de uma função exponencial aos pontos experimentais. **B)** valores da constante de decaimento da exponencial (τ_n), expresso em número de pulsos, em relação à duração do pulso despolarizante. Inserido em **B** é apresentando a constante tempo da exponencial, porém agora em unidade de tempo. **C)** são apresentados todos os ajustes das funções exponenciais aos pontos experimentais. Em preto é o controle e em laranja é na presença de SMD2 (N=7 células). O gráfico mostra a média $\pm$ EPM. **Fonte:** próprio autor.

Os pontos experimentais foram ajustados com uma exponencial simples ($y = y_0 + A_1 \exp(-t/\tau_1)$), tanto no controle como na presença de SMD2, para todas as situações experimentais. Na figura 32B mostra-se a relação entre os valores da constante de decaimento da exponencial (τ_n), expresso em número de pulsos, e a duração do pulso despolarizante. Inserido na figura 32B também está a relação entre a constante de decaimento da exponencial, mostrada em unidade de tempo ao invés do número do pulso.

Observando-se os traçados apresentados nas figuras 31 e 32, pode-se notar que quanto maior é a duração do pulso, menor é a razão entre os sucessivos picos de corrente. Além

disso, esse efeito é mais acentuado na presença de SMD2. Em 32C são apresentadas todas as exponenciais que foram ajustadas aos pontos experimentais. Em preto tem-se a situação controle e em laranja na presença de SMD2.

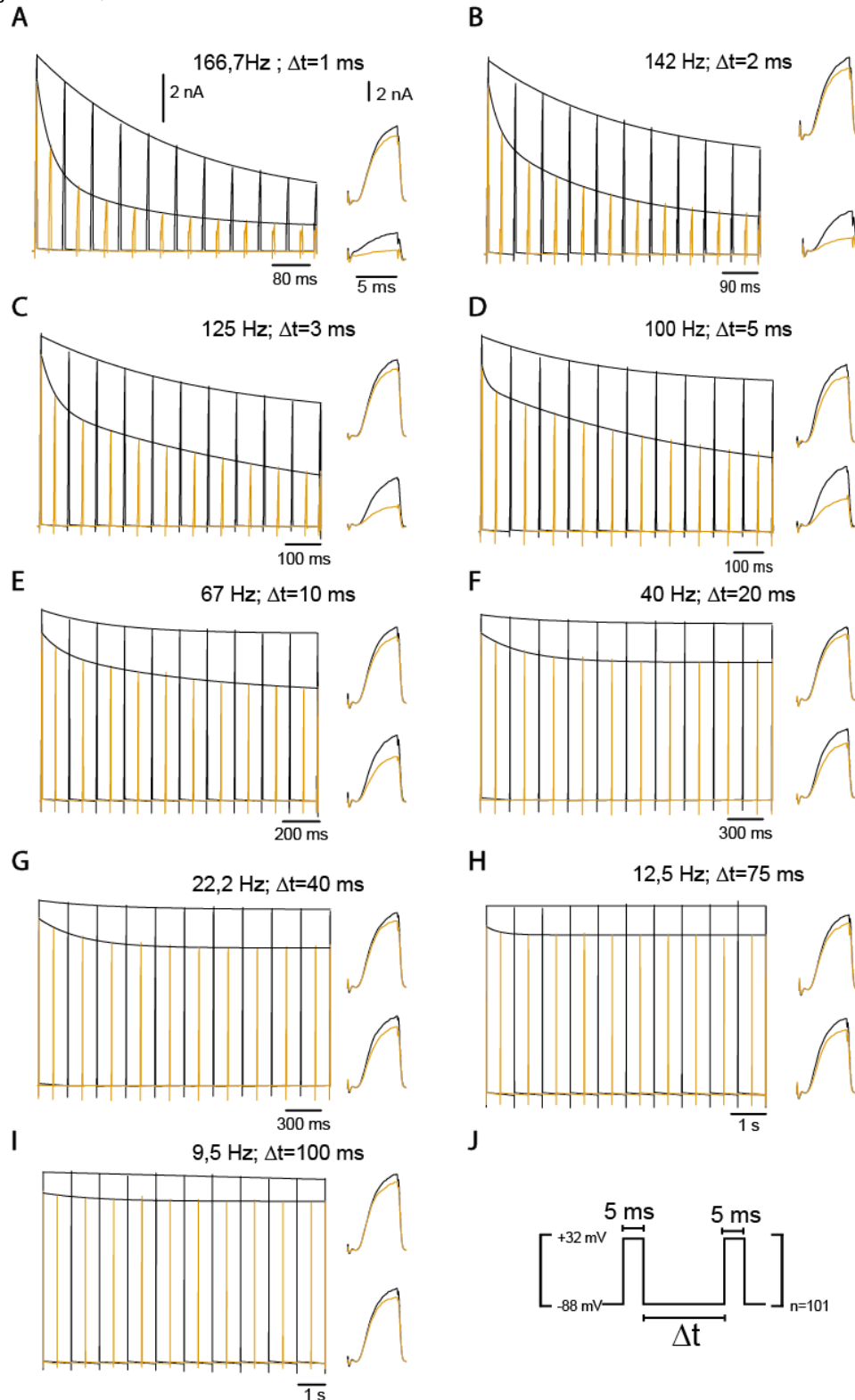
Presume-se que a redução da corrente se deve a introdução de um estado do canal bloqueado, cuja saída desse estado leva tempo e responsabiliza-se pela maior queda na amplitude dos picos em presença de SMD2. Além disso, infere-se que a molécula se liga ao canal em um tempo inferior a 2 ms. Somente a partir desse tempo, observa-se que a corrente na presença de SMD2 começa a cair, fazendo-o de modo dependente do uso do canal $K_v3.1$.

Esse é um dado interessante, pois a molécula só vai se ligar ao canal se o mesmo se abrir, e quanto mais aberturas tiverem, maior será o efeito. Assim, pode-se sugerir que essa molécula atuará como moduladora de disparos de potenciais de ação em células de alta frequência no sentido de diminuir a taxa de disparos, como explicado na introdução.

4.6.3. SMD2 modifica a resposta em relação a frequências de pulsos despolarizantes aplicados em $K_v3.1$

Como o canal $K_v3.1$ está relacionado a altas frequência de disparos de potenciais de ação, utilizou-se um protocolo para avaliar o efeito de SMD2 na resposta a diferentes frequências de estimulação. Dessa forma, foram aplicados 101 pulsos curtos (5 ms de duração) de voltagem, de -88 a +32 mV, porém com intervalos entre pulsos de duração variável. Os intervalos entre pulsos (frequência de estimulação) foram os seguintes: 1 ms (166,7 Hz), 2 ms (142,8 Hz), 3 ms (125 Hz), 5 ms (100 Hz), 10 ms (66,7 Hz), 20 ms (40 Hz), 40 ms (25 Hz), 75 ms (12,5 Hz), 100 ms (9,5 Hz).

Figura 33: Traçados representativos do efeito de SMD2 para várias frequências de estimulação de $K_V3.1$.



A, B, C, D, E, F, G, H, e I, mostram os traçados representativos para o intervalo de 1 ms (166,7 Hz), 2 ms (142,8 Hz), 3 ms (125 Hz), 5 ms (100 Hz), 10 ms (66,7 Hz), 20 ms (40 Hz), 40 ms (22,2 Hz), 75 ms (12,5 Hz), 100 ms (9,5 Hz), respectivamente. Em preto tem-se o controle e em verde na presença de SMD2. À direita é mostrado o primeiro (superior) e o último (inferior) traçado de corrente, em uma escala de tempo estendida para melhor visualização. **J)** Foram aplicados 101 pulsos de voltagem partindo de -88 mV a +32 mV, com duração de 5 ms, o intervalo entre pulsos variável, e o potencial entre pulsos mantido em -88 mV. A duração do intervalo entre pulsos foi de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 40, 75 e 100 ms. **Fonte:** próprio autor.

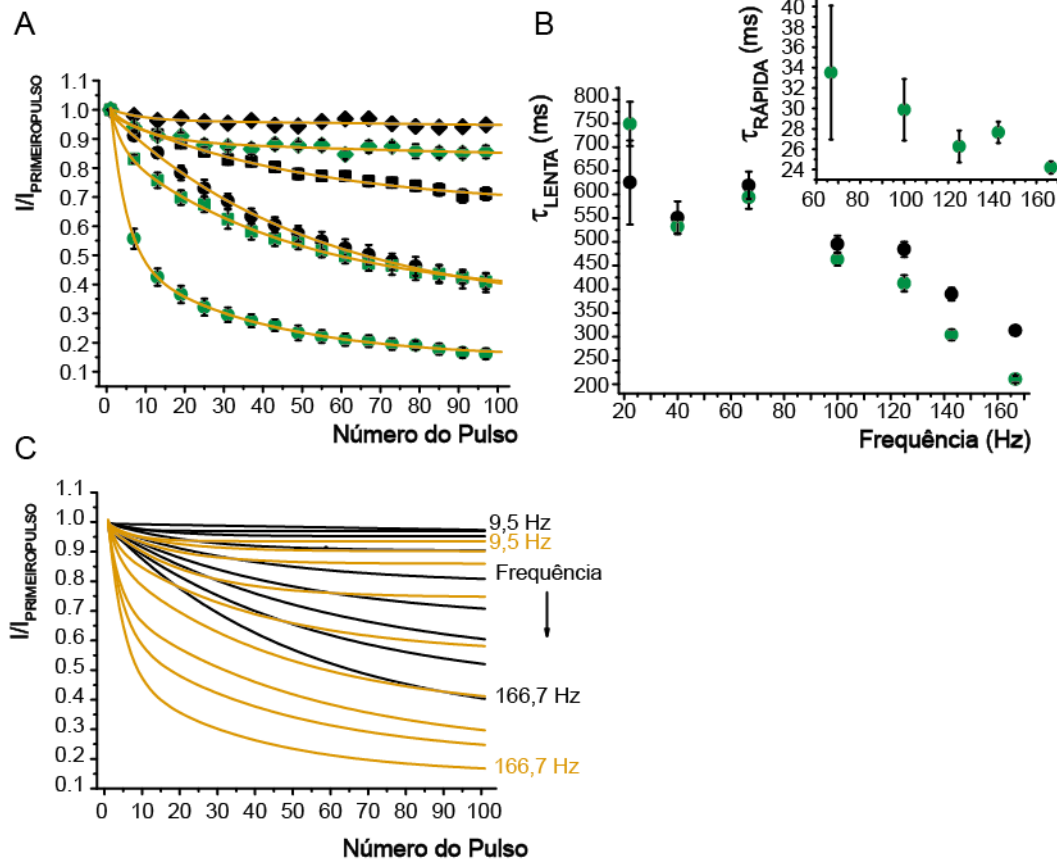
A figura 33 mostra todos os traçados de corrente em resposta aos trens de pulsos de voltagem. A, B, C, D, E, F, G, H, e I são os traçados representativos para o intervalo de 1 ms (166,7 Hz), 2 ms (142,8 Hz), 3 ms (125 Hz), 5 ms (100 Hz), 10 ms (66,7 Hz), 20 ms (40 Hz), 40 ms (25 Hz), 75 ms (12,5 Hz), 100 ms (9,5 Hz), respectivamente. Em preto tem-se o controle e em laranja, na presença de SMD2. À direita de cada traçado representativo é mostrado o primeiro (superior) e o último (inferior) traçado de corrente, em uma escala de tempo estendida para melhor visualização. A figura 33J esquematiza o protocolo de voltagem aplicado.

Na figura 34A, nota-se que os picos de corrente diminuem à medida que a frequência aumenta. Esse efeito é observado tanto no controle como na presença de SMD2. A fim de avaliar a relação entre a queda na corrente e o número de pulsos, foram ajustadas exponenciais aos pontos experimentais e calculadas as constantes de tempo dos processos. Interessantemente, na situação controle apenas uma exponencial do tipo $y = y_0 + A_1 \exp(-t/\tau_f)$, descreve o fenômeno nas várias frequências. Já na presença de SMD2, para frequências acima de 66,7 Hz, uma dupla exponencial do tipo $y = y_0 + A_1 \exp(-t/\tau_{f1}) + A_2 \exp(-t/\tau_{f2})$, onde τ_{f1} e τ_{f2} são, respectivamente, as constantes de tempo rápida e lenta, é necessária para descrever os picos de corrente.

As figuras 34B e 34C mostram as relações entre as constantes de tempo lenta (τ_f e/ou τ_{f1}) na presença e na ausência de SMD2 e a constante de tempo rápida (τ_{f2}) na presença de SMD2, em função das frequências dos pulsos aplicados, respectivamente. Observa-se na figura 34B que as constantes de tempo lentas têm valores muito próximos tanto no controle como na presença de SMD2, havendo uma tendência da constante de tempo diminuir com o aumento da frequência. Os dados para as frequências de 12,5 e 9,5 Hz não foram mostrados uma vez que para essas frequências, há um comportamento praticamente linear, ou seja, ocorre a recuperação total do canal, como pode ser observado nas figuras 33H e 33I. Inserto

em 34B, mostra a relação entre a constante de tempo rápida e a frequência de estimulação. Nota-se que a constante de tempo rápida (τ_{f2}) diminui linearmente com a frequência.

Figura 34: Efeito da frequência de estimulação sobre a eficácia do bloqueio induzido por SMD2 em $K_v3.1$.



A) mostra a razão de um determinado pico em relação ao primeiro pico da corrente em função do número de pulsos aplicados (as frequências dos pulsos foram $\bullet$ = 166,7 Hz; $\blacksquare$ = 100 Hz e $\blacklozenge$ = 22 Hz). Em preto é para a situação controle e em verde na presença de SMD2. Para fins de clareza apenas um para cada seis pontos estão mostrados. As linhas laranjas são os melhores ajustes de uma função exponencial aos pontos experimentais, no controle e para frequências abaixo de 66,7 Hz na presença de SMD2, enquanto que para frequência acima desse valor, o melhor ajuste foi dupla exponencial. **B)** mostra os valores da constante de decaimento da exponencial (τ_{LENTA}), expressos em tempo, em relação a frequência dos pulsos despolarizantes. Inserto em **B** mostra a constante tempo rápida (τ_{RAPIDA}) para frequências acima de 66,7 Hz e na presença de SMD2. **C)** apresenta todas as exponenciais que foram ajustadas aos pontos experimentais. Em preto é o controle e em laranja é na presença de SMD2 (N=8 células). O gráfico mostra a média $\pm$ EPM. **Fonte:** próprio autor.

Com isso, infere-se que, para o intervalo de tempo menor que 10 ms (frequência pulsos de 66,7 Hz), há uma fração de canais que não consegue expulsar a molécula em tempo hábil para o próximo pulso de voltagem, denunciado pelo aparecimento do segundo componente para frequências maiores que 66,7 Hz. A partir do tempo de 20 ms (frequência de pulsos de 40 Hz), observa-se uma única constante de tempo com valores muito próximos, tanto na

presença, como na ausência de SMD2. Assim, sugere-se que o tempo médio que a molécula fica desligada ao canal seja maior que 10 e menor que 20 ms.

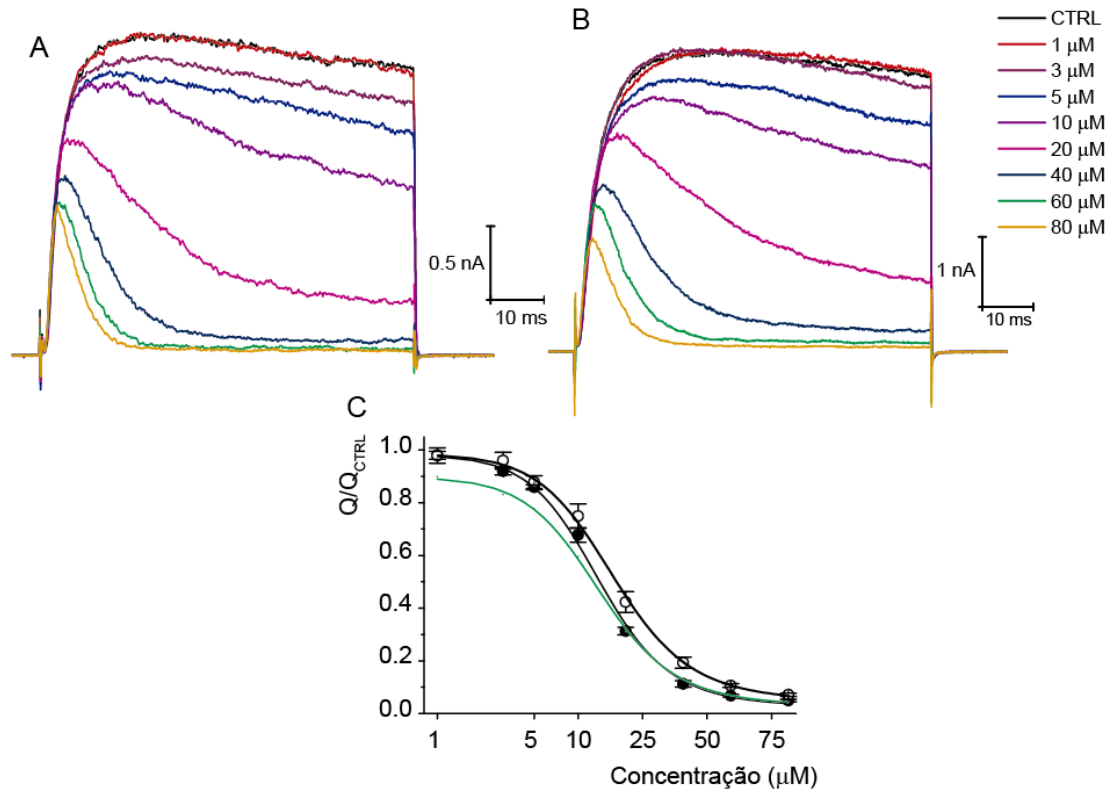
4.7. Dependência do pH no bloqueio de SMD2 em K_v3.1

Nessa seção será abordado o efeito do pH sobre o bloqueio do canal K_v3.1, já que SMD2 apresenta-se com uma carga negativa resultante em sua molécula. WOODHULL (1973) mostrou que canais para sódio poderiam ser bloqueados por prótons. Além disso, a toxina TsTX-K α mostrou diferenças no bloqueio com a variação do pH. Para pH mais ácido o bloqueio sobre o canal se mostrou mais efetivo (RODRIGUES et al. 2003). A partir disso, pretendeu-se entender se mudanças no pH poderiam afetar o bloqueio da molécula SMD2. Para tanto, utilizaram-se três pH diferentes: 7,9, 7,4 e 6,7 comparando as respectivas curvas dose-resposta.

As Figura 35A e 35B mostram os traçados representativos de correntes na presença de várias concentrações de SMD2 (1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 80 μ M), para o pH de 7,9 e 6,7. As correntes foram geradas através de pulsos despolarizantes de voltagem (conforme as figuras 18 e 19). A Figura 35C mostra a relação entre a carga total transferida e a concentração de SMD2, dividido pela carga transferida na situação controle. Essa curva foi obtido da mesma maneira que na seção 4.1. As linhas sólidas representam o ajuste da equação de Hill para o pH 6,7 e 7,9, tomados a partir da carga transferida. A linha em verde é o ajuste da curva de Hill para o pH de 7,4, como calculado na figura 20. Os valores obtidos para o IC₅₀ e o índice de Hill foram de $13,8 \pm 0,5 \mu$ M e $1,85 \pm 0,04$ para o pH de 7,9 e $17,5 \pm 0,6 \mu$ M e $1,74 \pm 0,06$ para o pH de 6,7, respectivamente. Através do teste *t* pareado ($p < 0,05$), esses valores não se mostraram significativamente diferentes entre si e nem diferentes do valor para pH 7,4,

indicando que não há dependência de pH para o bloqueio nas condições experimentais utilizadas.

Figura 35: pH não promove efeito sobre o bloqueio de SMD2 em $K_{V3.1}$.



Em **A** e **B** são mostrados respostas de corrente a pulsos despolarizantes na presença e na ausência de SMD2 para o pH de 7,9 e para o pH de 6,7, respectivamente. Em **C** é mostrada a relação entre a carga transferida numa determinada concentração de SMD2 (Q) e a carga na situação controle Q_{CTRL} ($N=4$). Em círculos sólidos estão os valores da carga para o pH 7,9, em círculos abertos para o pH de 6,7. A linha sólida verde é o ajuste da curva de Hill para o pH de 7,4. As linhas sólidas em preto são os ajustes de Hill para os pH de 7,9 e 6,7. O valor de IC_{50} para 7,9 e 6,7 foram, respectivamente, $13,7 \pm 0,7 \mu$ M e $17,5 \pm 0,3 \mu$ M. O índice de Hill, n , foram respectivamente, $1,8 \pm 0,07$ e $1,7 \pm 0,06$ para pH de 7,9 e 6,7. O protocolo de voltagem utilizado está mostrado na figura 16B. O gráfico mostra a média $\pm$ EPM. **Fonte:** próprio autor.

5. DISCUSSÃO

As benzenossulfonamidas são conhecidos principalmente pelos seus efeitos como agentes antibacterianos. Uma vez que a sua estrutura é muito semelhante a do ácido para-aminobenzóico (PABA), as sulfonamidas competem com o PABA pelo sítio ativo da enzima *dihydropteroate sintase* (SUPURAN *et al.*, 1998). Na literatura, é sabido que moléculas derivadas e análogas as sulfonamidas possuem atividade em canais para potássio dependentes de voltagem do tipo $K_v1.5$ (GROSS *et al.*, 2009) e moléculas como a glibenclamida, que possuem em sua estrutura uma sulfonamida, são utilizadas para tratamento de diabetes tipo 2, devido a inibição de canais para potássio ativados por ATP em células β (WANG, 2015). Devido à interação das sulfonamidas e seus análogos com os canais para potássio, e também da atividade bacteriostática dessas moléculas, neste trabalho foi testada a hipótese de que benzenossulfonamidas poderiam ser inibidores de canais para potássio do tipo $K_v3.1$. Para tanto, utilizaram-se células L-929 expressando heterologamente canais para potássio $K_v3.1$, como descrito em (GRISSMER *et al.*, 1994).

Ao todo, foram testados e estudados dez compostos bioisósteros, que possuem semelhanças estruturais, conforme mostrado na figura 11. Foram testadas moléculas análogas ao ácido benzenossulfônico, análogas ao PABA e também *N*-alquil-benzenossulfonamidas. Dentre esses bioisósteros, os que apresentaram efeitos inibitórios sobre o canal $K_v3.1$ foram as *N*-alquilbenzenossulfônidas: 4-cloro-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida (SMD2), 4-cloro-3-nitro-*N*-furfutilbenzenossulfonamida (SMD3), 4-[*N*-(3'aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida (SMD2_APP), 4-[*N*-(3'aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-*N*-furfutilbenzenossulfonamida (SMD3_APP), 4-cloro-*N*-butilbenzenossulfonamida (SMD2_SN) e 4-cloro-*N*-furfutilbenzenossulfonamida (SMD3_SN) promoveram atividade inibitória sobre os $K_v3.1$ (Figura 16, 17 e 18), sendo os valores de IC_{50} e índice de Hill,

observados pelo ajuste da Equação de Hill, estão mostrados na figura 19 e na Tabela 4. Todos os valores de IC_{50} estão na faixa de μM , indicando que o bloqueio pelas *N*-Alquil-benzenossulfonamidas foram eficazes, em uma faixa de concentração comparáveis a bloqueadores de canais para potássio $K_v3.1$ descritos na literatura, como mostrados na Tabela 2. O índice de Hill encontrado para todas as moléculas ficaram próximos de 2, sugerindo que há dois sítios de ligação para o bloqueio do canal pelas das moléculas.

As moléculas análogas ao PABA, ácido 4-[*N*-(3'aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitrobenzóico (Amostra 7) e o ácido 4-[*N*-(3'aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzóico (Amostra 8); e as moléculas análogas ao ácido benzenossulfônico, ácido 4-[*N*-(3'aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitrobenzenossulfônico (Sar_APP) e ácido 4-[*N*-(3'aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzenossulfônico (Sar_APA) não apresentaram efeitos inibitórios sobre os $K_v3.1$, até a concentração de 100 μM , como mostrados nas figura 15 e Tabela 5.

Pela análise das estruturas de todos os bioisósteros estudados neste trabalho e conforme os resultados apresentados na tabela 4 e figuras 15, 16, 17, 18 e 19, chega-se a conclusão que para as moléculas sintetizadas possuírem atividades bloqueadoras sobre os canais $K_v3.1$, é necessário a presença de uma benzenossulfonamida em sua estrutura. Os bioisósteros que não apresentaram essa estrutura não tiveram efeitos sobre os $K_v3.1$. Portanto, aquele arranjo é o que se apresenta como unidade elementar para a atividade bloqueadora dessas moléculas sobre os $K_v3.1$ (figura 21).

A análise das estruturas das moléculas SMD2, SMD3, SMD2_APP, SMD3_APP, SMD2_SN e SMD3_SN, que tiveram atividades bloqueadoras, revelam que os grupos químicos volumosos (aminolactâmas) ligados ao nitrogênio anilínico diminuem a eficácia do bloqueio; que o grupo nitro na posição orto do anel benzênico auxilia na eficácia do efeito e

que o aumento da cadeia alquílica e grupos mais volumosos ligados ao nitrogênio ligado ao grupo sulfônico diminuem a eficácia do bloqueio (Figura 20).

Acima foi discutido que as *N*-alquilbenzenossulfonamidas possuem atividade bloqueadora dos $K_{Vs3.1}$. A pergunta que se faz e que se pretende responder agora é: Qual o mecanismo de ação dessas moléculas? Para responder essa pergunta, é necessário a análise dos traçados de corrente, mostrados na figura 19. Nota-se que na presença de SMD2, SMD2_APP, SMD2_SN, SMD3, SMD3_APP e SMD3_SN as correntes iônicas carregadas pelo canal caem mais rapidamente, após atingirem um pico em aproximadamente 5 ms, na presença das moléculas quando comparadas a situação controle.

O aumento da velocidade de decaimento das correntes na presença de várias concentrações de benzenossulfonamidas sugere que essas moléculas atuem na conformação aberta do canal, isto é, o canal deve estar no estado aberto para que as moléculas alcancem o sítio de ligação e em seguida, obstruam o poro. Esse mecanismo foi primeiramente apresentado por (ARMSTRONG, 1969) a fim de explicar os efeitos de tetraetilamônio em correntes de potássio no axônio gigante de lula. Atualmente este mecanismo é empregado para descrever o efeito de bloqueadores de canais abertos para diversas outras moléculas e entre outros canais. Por exemplo, TEA em $K_v2.1$ (ANDALIB *et al.*, 2003) e em $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.5$ e $K_v3.1$ (GRISSMER *et al.* 1994); quinidina em $K_v1.5$ (SNYDERS *et al.*, 1992); norfluoxetina (CHOI *et al.*, 2001), sibutramina (KIM *et al.*, 2007.) e fluoxetina em $K_v3.1$ (SUNG *et al.*, 2008).

A corrente medida através da técnica de *patch clamp* está relacionada com a probabilidade de abertura dos canais para os pulsos de voltagem aplicados. Na situação controle, o processo de abertura ocorre quando há a mudança da diferença de potencial, visto pelo aumento da corrente macroscópica. A corrente macroscópica é a somatória dos íons que passam pelos canais. Após um período, os canais começam a entrar em inativação, refletido

como a diminuição na corrente macroscópica. Quando o pulso de voltagem é retornado para o potencial de *holding* as correntes caem abruptamente, indicando o fechamento dos canais.

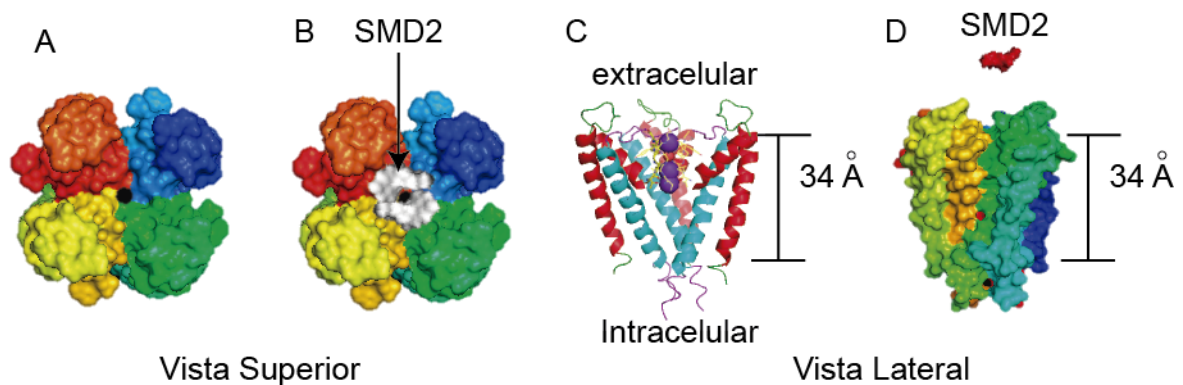
Se o efeito das moléculas fosse no estado fechado do canal, o que se observaria nas correntes macroscópicas seria a diminuição das correntes sem modificações na cinética, isto é, sem alteração na velocidade de decaimento. Pois haveria a diminuição dos canais disponíveis a abertura e os canais que não teriam sido bloqueados continuariam com sua cinética inalterada. Isso seria refletido como a diminuição proporcional da corrente ao longo de todo o tempo que o pulso de voltagem permanecesse sobre o canal.

Como notado nos traçados de corrente (figura 18), na presença das moléculas, há um pico de corrente seguido do aumento da velocidade de decaimento, sendo estes proporcionais as concentrações das moléculas. O decaimento está envolvido com a transição dos canais do seu estado aberto, para o estado aberto bloqueado, sendo esta transição mais favorável que a transição para o estado inativado (figura 37). Isso fica evidenciado, pois para altas concentrações das benzenossulfonamidas no banho, ainda se observa um pico de corrente, mesmo sendo este pequeno. Dessa forma, a hipótese mais plausível é que as moléculas estudadas atuem no estado aberto do canal K_v3.1.

Devido à relativa dificuldade da obtenção de resultados através da técnica de *patch clamp*, não foram possíveis a realização de experimentos de *single-channel* que poderiam elucidar de maneira mais clara o efeito das moléculas sobre um único canal. Sendo assim, sugere-se este modo para outros estudos envolvendo estas moléculas e os canais K_v3.1. Além destes experimentos, estudos computacionais poderiam auxiliar no entendimento do tipo de interação que ocorre entre as moléculas e os aminoácidos presentes na boca do canal, ou nas regiões dos segmentos S5, S6 e o *loop P*. Esses experimentos são sugeridos em conjunto com estudos do efeito de todas as moléculas sobre o K_v3.1, em aspectos cinéticos.

A figura 36, mostra a representação da região do filtro de seletividade do canal para potássio, KcsA, com uma molécula SMD2 se ancorando no mesmo, numa tentativa de mostrar como poderia se dar a interação do bloqueador com o canal aberto. Essa figura serve apenas como ilustração dos processos discutidos anteriormente. Não foi levado em consideração nenhum aspecto físico-químico da interação da molécula com os aminoácidos que formam a boca do poro do canal. Foi utilizado a boca do canal KcsA devido a ausência da estrutura cristalográfica dos canal K_v3.1.

Figura 36: Representação da ligação de SMD2, utilizando o poro do canal KcsA como exemplo.



O filtro de seletividade do canal para potássio KcsA foi obtido através do PDB (1BL8). Em verde, vermelho, azul e amarelo, são representados 4 segmentos das subunidades S5-Loop de reentrada P-S6. Em branco é mostrado uma representação da superfície da molécula SMD2. Em **A**, é a representação da boca do canal em seu estado aberto e em **B**, a representação do boca do canal na presença de SMD2, na vista superior ao canal. Em **C**, é mostrado o filtro de seletividade e em **D**, o filtro de seletividade junto com a molécula SMD2 (em vermelho), na vista lateral do canal em relação a membrana. Essa molécula foi utilizada para representação, por ter sido a molécula mais estudada sobre o efeito em K_v3.1, em aspectos cinéticos. Fonte: Adaptado de DOYLE *et al.*, 1998 e PDB (1BL8).

Das figuras 15, 16 e 17, pôde-se observar que os efeitos das moléculas sobre o canal foram reversíveis. Isso é uma característica interessante, pois na ausência das moléculas o canal retorna as suas propriedades biofísicas intrínsecas. A reversibilidade é interessante também para mostrar que as moléculas não atravessam a membrana celular e que seu efeito ocorre no lado externo do canal. Se o efeito fosse do lado interno, o processo de lavagem seria mais demorado ou não aconteceria, ou seja, o efeito seria irreversível, conforme o efeito de

moléculas derivados de psoraleno em canais $K_v1.3$ (SCHMITZ *et al.*, 2005). Portanto o efeito das benzenossulfonamidas é dependente de estado e ocorre do lado externo da membrana, próximo a boca do canal.

Para avaliar o efeito das benzenossulfonamidas sobre os aspectos cinéticos do canal foi utilizada a molécula SMD2, que possui a melhor eficácia no bloqueio. Para tanto, avaliou-se os efeitos de SMD2 sobre a dependência de voltagem no bloqueio (figura 22 e 23); dependência da concentração de potássio extracelular (figura 24); seletividade do canal (Figura 25); efeito sobre os processos de ativação (abertura do canal mediante as diferentes voltagens (figura 26)); sobre o processo de desativação (fechamento do canal mediante as diferentes voltagens (figura 27)); decurso temporal da inativação (figura 29); volta da inativação no estado-estacionário (figura 29); recuperação da inativação (figura 30); dependência de uso (figura 31 e 32); frequência de estímulos (figura 33 e 34) e sobre a variação do pH extracelular (figura 35).

Foi observado que SMD2 promoveu a mudança na curva de condutância *versus* voltagem (também conhecida como curva de probabilidade de abertura do canal) em relação ao controle, aproximadamente -8 mV, para voltagens inferiores a +12 mV, conforme pode ser visto na figura 23B. Isto leva a hipótese de que o processo de bloqueio do canal por SMD2 é dependente da voltagem através da membrana e que provavelmente a molécula estaria carregada para o pH de 7,4. Além disso, observou-se o deslocamento nas cinéticas de ativação e na curva de inativação em relação à voltagem, também em -8 mV (figuras 26 e 29, respectivamente). Esses dados suportam outra hipótese de que SMD2 pode ser um *gating modifier* dos $K_v3.1$. De acordo com HILLE (2001), um modificador de *gating* (“*gating modifier*”) promove a mudança da dependência de voltagem de todos os processos de *gating*.

O fato da molécula estar carregada, somado ao efeito ser dependente de voltagem, a modificação das curvas de ativação e na volta da inativação de estado-estacionário, sugerem

que o acúmulo de cargas na superfície extracelular, oriundas de SMD2, pode ter alterado o campo elétrico sentido pelo canal e assim, ter favorecido sua abertura, mesmo a molécula sendo caracterizada como um bloqueador deste canal. Infelizmente, não há como comprovar experimentalmente esta hipótese, com os experimentos apresentados neste trabalho. Seriam necessários o estudo das correntes de *gating* do canal na ausência e na presença de SMD2.

Pelo fato do efeito ser dependente de voltagem e a molécula aparentemente estar em sua forma carregada foram realizados experimentos alterando o pH extracelular com a intenção de elucidar melhor o aspecto da interação eletrostática entre SMD2 e os K_v3.1, tornando a molécula descarregada ou para vislumbrar a ligação desta com algum resíduo de aminoácido carregado na boca do canal. Para tal, utilizou-se pH 6,7 e pH 7,9 nas soluções externas. Entretanto, não se constatou nenhum efeito do pH no valor de IC₅₀, sugerindo que a molécula estava em sua forma carregada para esses pH.

A Figura 23 mostra um fenômeno muito interessante. Conforme o potencial de membrana é aumentado, ocorre a diminuição do bloqueio. Esse efeito é denominado de alívio do bloqueio (do inglês, *block relief*) (ARMSTRONG; LOBODA, 2001). Isso pode estar relacionado com o fato de que aumentos no potencial de membrana resultam em aumentos no potencial elétrico para que os íons de K⁺ saiam da célula. Como a molécula SMD2 se liga a boca do canal, pelo lado externo sugere-se então, que os íons, através de colisões, conseguiriam forçar a saída da célula, retirando as moléculas de SMD2 e induzindo a diminuição do bloqueio. Para explorar mais esse efeito e também para testar a hipótese de que os íons forcem a sua saída da célula através de colisões, realizaram-se experimentos com diferentes concentrações extracelulares de potássio, mas mantendo a força iônica constante. O que se observou é que conforme a concentração de potássio diminui o alívio do bloqueio é maior e quanto a concentração é aumentada, o alívio do bloqueio praticamente não se altera. Portanto, sugere-se que o alívio de bloqueio de SMD2 em K_v3.1 é uma consequência da

concentração de K^+ externo (conforme observado na figura 24). Um efeito semelhante foi observado por IKEDA; KORN (1995) para o bloqueio extracelular de TEA^+ sobre $K_v2.1$.

O processo de desativação é mais lento na presença de SMD2 e tem apenas um efeito menor sobre a dependência da voltagem do processo, sem ser significativamente diferente (figura 27). Na figura 27C, observa-se o fenômeno de *tail croosver*, ou seja, para que o canal volte do estado aberto para o seu estado fechado, SMD2 precisa sair do canal para essa transição ocorrer. Esse é também um outro dado que reforça a hipótese de que SMD2 seja um bloqueador de canal aberto (SNIDERS *et al.*, 1992).

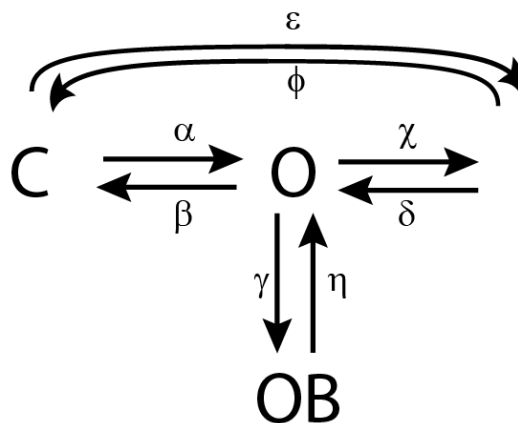
Já que $K_v3.1$ possui inativação do tipo U (KLEMIC; KIRSH; JONES, 2001), e para analisar os efeitos de SMD2 sobre o processo de inativação, pulsos longos de voltagem com duração de 5 s, foram aplicados, conforme mostra a figura 28. SMD2 acelera a constante de decaimento e induz um desvio para a direita na relação entre inativação e voltagem (figura 29). Na verdade, SMD2 tem um efeito proporcionalmente maior sobre o componente rápido do que no lento. No entanto, como foi observado anteriormente, o decaimento da corrente é devido tanto à inativação como o bloqueio dos canais. Assim, a pergunta que fica é: será que $K_v3.1$ inativa quando SMD2 está ligada ao seu sítio de ligação ou o canal tem de ser desbloqueado (aberto) antes de ocorrer inativação? Embora a base estrutural e molecular da inativação do tipo U não tenha sido totalmente compreendida (CHENG *et al.*, 2011; JAMIESON; JONES, 2013), essa pergunta pode ser respondida simplesmente observando que SMD2 retarda o tempo para a recuperação da inativação, como mostrado na figura 30. Em outras palavras, o canal necessita ser mantido em um tempo mais longo em potenciais hiperpolarizados a fim de ser completamente ativado na presença de SMD2. Isto indica que, para o canal inativar deve ser, primeiro, desbloqueado.

Como descrito na literatura, os $K_v3.1$ tem uma cinética rápida de fechamento (LABRO *et al.*, 2015) o que lhe confere propriedades adequadas para células que disparam PAs em

altas frequências. Explorou-se o efeito de SMD2 sobre esse mecanismo pela aplicação de pulsos com várias durações e também várias frequências de estímulos. Observou-se que pulsos de curta duração induzem efeitos menos intensos e pulsos mais longos, efeitos mais intensos de SMD2 sobre o canal. Em outras palavras, é necessário um menor número de pulsos com uma grande duração a fim de ter um efeito maior do que no caso de pulsos de curta duração. Este efeito é explorado nas figuras 31 e 32. Como corolário destes experimentos, as figuras 33 e 34 mostram que quanto mais o canal é usado, ou seja, aberto, mais ele é bloqueado por SMD2. Resultados semelhantes são mostrados para vários outros tipos de moléculas em canais para potássio dependentes de voltagens, tais como *Nicardipina* em Kv4.3L (HATAN et al., 2003) e *tirfostina* (AG879) em Kv4.2 (YU et al. 2015).

O fato da molécula SMD2 ser dependente do uso do canal, abre precedente para que se infira que a mesma possa se tornar um agente anticonvulsivante, ela só se ligaria ao canal em seu estado aberto atuando quando o canal estivesse em uso. A figura 37 apresenta um diagrama de estados para sumarizar o efeito de SMD2 sobre os Kv3.1.

Figura 37: Diagrama de estados para o bloqueio do canal na presença de SMD2.



As letras gregas indicam as constantes de taxa (velocidade) a partir da teoria de cinética química. Os estados C, O, OB e I, são respectivamente, fechado, aberto, aberto bloqueado e inativado. **Fonte:** próprio autor.

Na ausência de SMD2, as transições do canal são: C→O: fechado para aberto através da despolarização da membrana (figuras 22, 26), O→I: aberto para inativado pelos processos

descrito na seção 4.5 (figuras 24, 27, 28, 29, 30, 33 e 34) e $I \rightarrow C$: inativado para fechado, como pode ser observado pelos experimentos apresentados nas figuras 28, 29, 30, 31 e 32.

Na presença de SMD2, as transições do canal são: $C \rightarrow O$: fechado para aberto através da despolarização da membrana (figuras 21, 25), $O \rightarrow OB$: aberto para aberto bloqueado (figuras 16, 17, 18, 19 e 28), $OB \rightarrow O$: aberto bloqueado para aberto, conforme observado nas figuras 27C, 29, 30, 33 e 34, $O \rightarrow I$: aberto para inativado pelos processos descrito na seção 4.5 (figuras 24, 27, 28, 29, 30, 33 e 34) e $I \rightarrow C$: inativado para fechado, como pode ser observado pelos experimentos apresentados nas figuras 28, 29, 30, 31 e 32.

Alguns resultados preliminares e não mostrados neste trabalho, mostram que as moléculas SMD3 e SMD3_APP tem atuação no bloqueio de canais para sódio $Na_v1.1$, 1.5 e em $K_v1.3$ e $K_v1.4$. Idealmente, um bloqueador eficaz em canais para potássio dependente de voltagem seria àquele seletivo a um determinado tipo de K_v . Por exemplo, um bloqueador específico ao $K_v3.1$. CATTERALL, 2012 discute essa possibilidade, postulando que bloqueadores específicos seriam aqueles que se ligassem ao domínio sensor de voltagem em vez de se ligar a boca do canal ou ao poro condutor. A argumentação é simples, os amino ácidos da boca do canal, e do poro condutor são muito conservados em canais iônicos, especialmente em K_v s. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que as moléculas são bloqueadores de estado aberto e que se ligam a região do poro. Portanto, devido a essas moléculas apresentarem um efeito inibidor em outros canais, são necessários mais estudos de bioisósteros para que se consiga encontrar uma molécula que seja específica à apenas um canal, neste caso específicas ao $K_v3.1$.

6. CONCLUSÕES

Foi estudada a hipótese de moléculas análogas ao ácido *para*-aminobenzoico, *N*-Alquil-benzenossulfonamidas e análogas ao ácido benzenossulfônico atuassem como bloqueadores de canal para potássio dependente de voltagem, do tipo $K_v3.1$. Encontrou-se seis *N*-Alquil-benzenossulfonamidas que promoveram efeitos inibitórios sobre os $K_v3.1$, enquanto que as moléculas análogas ao ácido *para*-aminobenzoico e análogas ao ácido benzenossulfônico não promoveram atividade bloqueadora sobre o canal.

As *N*-Alquil-benzenossulfonamidas atuaram como bloqueadores de canal aberto. Esta afirmação é suportada pelo fato de que as benzenossulfonamidas promoveram o aumento da velocidade de decaimento da corrente e que os valores de IC_{50} tomados pela carga transferida pelo canal e pela corrente serem diferentes. Sendo assim, o processo de bloqueio é dependente de estado.

As moléculas ácido 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitrobenzoico, ácido 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzoico, ácido 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitrobenzenossulfônico e ácido 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzenossulfônico não apresentaram efeitos inibitórios sobre os $K_v3.1$ até a concentração de 100 μM . As duas primeiras sendo análogas ao PABA e as duas últimas análogas ao ácido benzenossulfônico.

As *N*-Alquil-benzenossulfonamidas: 4-cloro-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida (SMD2), 4-cloro-3-nitro-*N*-furfutilbenzenossulfonamida (SMD3), 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida (SMD2_APP), 4-[*N*-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-*N*-furfutilbenzenossulfonamida (SMD3_APP), 4-cloro-*N*-butilbenzenossulfonamida (SMD2_SN) e 4-cloro-*N*-furfutilbenzenossulfonamida (SMD3_SN) promoveram atividade inibitória sobre os $K_v3.1$, sendo os valores de IC_{50} e índice de Hill, respectivamente para todas as moléculas $13,5 \mu M \pm 0,5$ e $1,7 \pm 0,1$, $16,9 \mu M \pm$

0,5 e $1,6 \pm 0,1$, $25,9 \mu\text{M} \pm 1,5$ e $1,5 \pm 0,1$, $34,2 \mu\text{M} \pm 1,8$ e $1,7 \pm 0,1$, $34,9 \mu\text{M} \pm 0,7$ e $2,3 \pm 0,1$ e $60 \mu\text{M} \pm 2,2$ e $2,2 \pm 0,1$. Todos os valores de IC_{50} estão na faixa de μM indicando que o bloqueio pelas *N*-Alquilbenzenossulfonamidas foram eficazes. Além disso, o índice de Hill encontrado para todas as moléculas ficaram próximos de 2, sugerindo que há dois sítios de ligação para o bloqueio do canal pelas das moléculas. Além disso, pôde-se observar que o efeito das moléculas sobre o canal foram reversíveis.

Pelo fato da molécula 4-cloro-3-nitro-*N*-butilbenzenossulfonamida (SMD2) ter possuído o menor valor de IC_{50} , mostrando ser a mais eficaz no bloqueio dos $\text{K}_v3.1$. Foi analisado o efeito desta molécula sobre os aspectos cinéticos do $\text{K}_v3.1$. Foi observado que SMD2 atua como um bloqueador de canal aberto devido ao aumento da velocidade de decaimento com o aumento da concentração de SMD2; e pela observação do fenômeno de “*tail croosver*”. Além disso, a molécula SMD2 parece atuar como um modificador de *gating*, pois promoveu o deslocamento em -8 mV, em relação ao controle, nas curvas de condutância *versus* voltagem, nas cinéticas de ativação e na curva de inativação em relação à voltagem. Dessa forma, esses processos foram facilitados, embora a molécula seja um bloqueador desses canais. Para as constantes de tempo de desativação e para a seletividade do canal ao potássio, a presença da molécula SMD2 não alterou nenhum desses eventos.

Foi observado que, para potenciais mais despolarizados, ocorreu o alívio do bloqueio e não houve o efeito na mudança do pH extracelular sobre o bloqueio. Encontrou-se que o tempo para que a molécula SMD2 se ligue ao canal é menor que 2 ms e que o tempo que a molécula SMD2 deixe o canal está entre 10 e 20 ms, além do efeito ser dependente de uso do canal.

As comparações entre os diferentes grupos químicos modificados e encontrados para as moléculas testadas nesse trabalho mostram que a presença de um grupo nitro na posição *orto* auxiliou o efeito bloqueador; a inserção de grupos volumosos ligados ao nitrogênio anilínico

pareceu diminuir a eficácia do bloqueio e a presença de grupos menos volumosos ligado ao grupo sulfônico pareceu aumentar a eficácia do bloqueio do canal pelas *N*-Alquil-benzenossulfonamidas.

O principal achado desta tese é que para as moléculas testadas possuem atividade inibitória elas devem ser benzenossulfonamidas, e o que confere maior eficácia são os grupos químicos ligados a ela. Devido a importância fisiológica dos $K_{v3.1}$, presentes em células com altas frequências de disparos de potenciais de ação e também devido a sua postulação como alvo para agentes anticonvulsivantes, de um ponto de vista farmacológico, a *N*-Alquil-benzenossulfonamidas podem constituir-se em uma nova classe de moduladores de $K_{v3.1}$. Sendo agora necessário o desenvolvimento de novos bioisósteros para o completo entendimento dos diferentes grupos químicos ligados a ela e do papel estrutural das benzenossulfonamidas no bloqueio do canal. Isso poderá ser realizado através de técnicas computacionais e também a partir de novos ensaios eletrofisiológicos.

REFERÊNCIAS

- ADELMAN JR, W. J.; FRENCH, R. J. Blocking of the Squid Axon Potassium Channel by External Caesium Ions. **Journal of Physiology**, London, Vol. 276, N. 1, p. 13-25, Mar. 1978.
- AIYAR, J. *et al.* The P-region and S6 of K_v3.1 contribute to the formation of the ion conduction pathway. **Biophysical Journal**, Maryland Heights, Vol. 67, N. 6, p. 2261-2264, Dez. 1994.
- ALDRICH, R. *et al.* Calcium-activated potassium channels, introduction. **IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY**, disponível em: <<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=69>>. Acessado em 04/10/2015.
- ANDALIB, P. *et al.* The External TEA Binding Site and C-Type Inactivation in Voltage-Gated Potassium Channels. **Biophysical Journal**, Maryland Heights, Vol. 87, N. 5, p. 3148-3161, Nov. 2004.
- ANGULO, E. *et al.* Upregulation of the Kv3.4 potassium channel subunit in early stages of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, Vol. 91, N. 3, p. 547–557, Nov. 2004.
- ARMSTRONG, C. M. Inactivation of the Potassium Conductance and Related Phenomena Caused by Quaternary Ammonium Ion Injection in Squid Axons. **The Journal of General Physiology**, New York, Vol. 54, N. 5, p. 553-575, Nov. 1969.
- ARMSTRONG, C. M.; LABODA, A. Model for 4-Aminopyridine Action on K Channels: Similarities to Tetraethylammonium Ion Action. **Biophysical Journal**, Maryland Heights, Vol. 81, N. 2, p. 895-904, Ago. 2001.
- AZAM, P *et al.* Targeting effector memory T cells with the small molecule Kv1.3 blocker PAP-1 suppresses allergic contact dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, Vol. 127, N. 6, p. 1419–1429, Jun. 2007.
- BAUKROWITZ, T.; YELLEN, G., Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from the multi-ion pore of a K⁺ channel. **Science**, New York, Vol. 271, N. 5249, p. 653–56, Fev. 1996.
- BETZ, U. A. K. *et al.* Potent In Vivo Antiviral Activity of the Herpes Simplex Virus Primase Helicase Inhibitor BAY 57-1293. **Antimicrobial Agents and Chem.**, Washington, Vol. 46, N. 6, p. 1766–1772, Jun. 2002.
- BEETON, C. *et al.* Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, Vol. 103, N. 46, p. 17414–17419, Nov. 2006.
- BEZANILLA, F. How membrane proteins sense voltage. **Nature reviews: Molecular Cell Biology**, London, Vol. 9, N. 4, p.323-332, Abr. 2008.

BHATTACHARYA, G. *et al.* Synthesis and Antitubulin Activity of N1- and N4 Substituted 3,5-Dinitro Sulfanilamides against African Trypanosomes and Leishmania. **Journal of Medical Chemistry**, Washington, Vol. 47, N.7, p. 1823-1832, 2004.

BRUICE, P. Y. (a) The Organic Mechanisms of the Coenzymes In: __ **Organic Chemistry**. 4^a Ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. Cap. 25, p. 1068.

BRUICE, P. Y. (b) The Organic Chemistry of Drugs In: __ **Organic Chemistry**. 4^a Ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. Cap. 30, p. 1211-1212.

BRUNER, J. K. *et al.* Identification of novel small molecule modulators of K_{2P}18.1 twopore potassium channel. **European Journal of Pharmacology**, Vol 740, p. 603-610, Out. 2014.

BUTTERWORTH, J. V., STRICHARTZ, G. R. Molecular Mechanisms of Local Anesthesia: A Review, **Anesthesiology**, Vol. 72, N. 4, p. 711-734, Abr. 1990

CATTERALL, W. A. *et al.* Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins, **Toxicon**, Vol. 49, N. 2, p. 124-41, Fev. 2007.

CATTERALL, W. A. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function and Pathophyiology, **Neuron**, Cambridge, Vol. 67, N. , p.915-928, Set. 2012.

CHANDY, K. G. *et al.* IUPHAR database (IUPHAR-DB). **Voltage-gated potassium channels subunits**. Disponível em: <<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/VoltageGatedSubunitListForward>>. Acessado em: 26 de março de 2015.

CHAE, Y. J.; CHOI, J.-S.; HAHN, S. J. Inhibition of K_v4.3 potassium channels by trazodone. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, Vol. 386, N. 8, p. 711-719, Abr. 2013.

CHENG, Y. M. *et al.* Molecular determinants of U-type inactivation in K_v2.1 channels. **Biophysical Journal**, Maryland Heights, Vol. 101, N. 3, p. 651-61, Ago. 2011

CHOI, B. H. *et al.* Effects of norfluoxetine, the major metabolite of fluoxetine, on the cloned neuronal potassium channel K_v3.1, **Neuropharmacology**, Vol. 41, N. 4, p. 443-53, Set. 2001

COTTON, S. Royal Society of Chemistry. **Chemistry in its element – sulfanilamide**. Disponível em: <http://www.rsc.org/chemistryworld/podcast/CIEcompounds/transcripts/Sulfanilamide.asp>. Acesso em: 26/06/2016.

Dixon, J. E. *et al.* Role of the K_v4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. **Circ. Res.** 79, 659-668 (1996).

DOYLE, D. A. *et al.* The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity, **Science**, Washington, Vol. 280, N. 5360, p.69-77, Abr. 1998

FORD, J. W.; MILNES, J. T. New drugs targeting the cardiac ultra-rapid delayed-rectifier current (I_{Kur}): rationale, pharmacology and evidence for potential therapeutic value. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Vol. 52, N. 2, p. 105-120, Ago. 2008.

GADSBY, D. C., Ion Channels versus ion pumps: the principal difference, in principle, **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, London, Vol. 10, N. 5, p. 344-353, Maio 2009.

GAGNON, D. G., BEZANILLA, F., The contribution of individual subunits to the coupling of the voltage sensor to pore opening in Shaker K channels: effect of ILT mutations in heterotetramers, **Journal General Physiology**, New York, Vol. 136, N. 5, p. 555-568, 25 Out. 2010.

GAN, L.; KACZMAREK, L K. When, where, and how much? Expression of the K_v3.1 potassium channel in high-frequency firing neurons, **Journal of Neurobiology**, Vol. 37, N. 1, p. 69-79, Out. 1998.

GONÇALVES, R. S. *et al.* Synthesis of potentially bioactive PABA-related N-(aminoalkyl)lactamic amino acids and esters via selective S_NAr reactions. **Amino Acids**, Viena, Vol. 40, N. 1 p.197-204. Jan. 2011

GOUAUAX, E.; MACKINNON, R. Principles of selective Ion Transport in Channels and Pumps, **Science**, Washington, Vol. 310, N. 5753, p. 1461-1465, 2 Dez. 2005.

GRISMER, S. *et al.* The Shaw-Related Potassium Channel Gene, K_v3.1, on Human Chromosome-11, Encodes the Type-L K⁺ Channel in T-Cells. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, Vol. 267, N. 29, p. 20971-79, Out. 1992.

GRISMER, S. *et al.* Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types K_v1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. **Molecular pharmacology**, Bethesda, Vol. 45, N. 6, p. 1227-34, Jun. 1994

GROSS, M. F. *et al.* Aryl sulfonamido tetralin inhibitors of the K_v1.5 ion channel. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Vol. 19, N. 11, p. 3063-66, Jun. 2009.

GOPALAKRISHNAN, M. *et al.* Pharmacology of human sulphonylurea receptor SUR1 and inward rectifier K⁺ channel Kir6.2 combination expressed in HEK-293 cells. **British Journal of Pharmacology**, London, Vol. 129, N.7, p.1323-1332. 88. Abril 2000.

HAEMMERLEIN, B. *et al.* Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. **Molecular Cancer**, Vol. 5, N. 41, p.1-13, Out. 2006.

HAGIWARA, S.; MIYAZAKI, S.; ROSENTHAL, N. P. Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. **The Journal of General Physiology**, New York, Vol. 67, N. 6, p. 621-38, Jun. 1976

HAMILL O. P *et al.* Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patch, **Pflugers Archiv**, Vol. 391, N. 2, p. 85-100, Ago. 1981.

HEGINBOTHAM, L.; KUTLUAY, E. Revisiting voltage-dependent relief of block in ion channels: a mechanism independent of punchthrough. **Biophysical Journal**, Maryland Heights, vol. 86, n.6, p. 3663-70, Jun. 2004.

HILLE, B. Potassium channels and chloride channels. In:___ **Ionic channels of excitable**

membranes. 3.ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2001. Cap. 5, p. 131-167.

HILLE, B; SCHWARZ, W. Potassium channels as multi-ion single-file pores. **The Journal of General Physiology**, New York, Vol. 72, N. 4, p. 409–42, Out. 1978.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **Journal of Physiology**, London, Vol. 117, N. 4, p.500-544, Ago. 1952.

IKEDA, S. R.; KORN, S. J. Influence of permeating ions on potassium channel block by external tetraethylammonium. **Journal of Physiology**, London, Vol. 486, N. 2, p. 267-272, Jul. 1995.

JAMIESON, Q.; JONES, S W. Role of outer-pore residue Y380 in U-type inactivation of K_V2.1 channels. **Journal of Membrane Biology**, Vol. 246, N. 8, p. 633–45, Ago. 2013.

JEONG, I.; Choi, B. H.; Hahn, S. J. Rosiglitazone inhibits K_V4.3 potassium channels by open-channel block and acceleration of closed-state inactivation. **British Journal of Pharmacology**, London, Vol. 163, N. 3, p. 510–20, Jun. 2011.

JOHO, R. H.; HURLOCK, E. C., The role of K_V3-type potassium channels in cerebellar physiology and behavior. **Cerebellum**, Vol. 8, N. 3, p. 323–33, Set. 2009.

KIM, S.E. *et al.* Open Channel Block of A-Type, K_V4.3, and Delayed Rectifier K⁺ Channels, K_V1.3 and K_V3.1, by Sibutramine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, Vol. 321, N. 2, p. 753–62, Maio 2007.

KLEMIC, K. G.; KIRSCH, G. E.; JONES, S. W. U-type inactivation of K_V3.1 and Shaker potassium channels. **Biophysical Journal**, Maryland Heights, Vol. 81, N. 2, p. 814–26, Ago. 2001.

KLUCZYK, A. *et al.* Drug evolution: p-Aminobenzoic Acid as a Building Block. **Current Medicinal Chemistry**, Vol. 9, N. 21, p. 1871-1892, Nov. 2002.

KOPLJAR, I. *et al.* A polyether biotoxin binding site on the lipid-exposed face of the pore domain of K_V channels revealed by the marine toxin gambierol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, Vol. 106, N. 24, p. 9896-9901, 16 Jun. 2009

KUANG, Q.; PURHONEN, P.; HEBERT, H., Structure of potassium channels, **Cellular and Molecular Life Sciences**, Vol. 72, N. 19, p. 3677-3693, Out. 2015.

KURATA, H.T.; FEDIDA, D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, cidade, Vol. 92, N. 2, p. 185–208, Out. 2006.

LABRO, A. J. *et al.* K_V3.1 uses a timely resurgent K⁺ current to secure action potential repolarization. **Nature Communications**, London, Vol. 6, N. 10173, p.1-12, 17, Dez. 2015.

LACROIX, J. J. *et al.* Moving gating charges through the gating pore in a K_V channel voltage sensor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, Vol.111 ,N.19, E1950–E1959, Apr. 2014.

LI, W.; KACZMAREK, L. K.; PERNEY, T. M. Localization of two high-threshold potassium channel subunits in the rat central auditory system. **Journal of Comparative Neurology**, Vol. 437, N. 2, p. 196–218, Ago. 2001.

LIEN, C.-C.; JONAS, P. K_V3 potassium conductance is necessary and kinetically optimized for high-frequency action potential generation in hippocampal interneurons. **The Journal of Neuroscience**, Washington, Vol. 23, N. 6, p. 2058–68, Mar. 2003.

LLOYD, J. *et al.* Benzopyran sulphonamides as K_V1.5 potassium channel blockers. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Vol. 17, N. 12, p. 3271–3275, Jun. 2007.

LONG, S. *et al.* Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment, **Nature**, London, Vol. 450, N. 7168, p. 376–382, Nov. 2007.

LU, Z. Mechanism of Rectification in Inward-Rectifier K⁺ Channels. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, Vol. 66, N. 1, p. 103–29, Mar. 2004.

MACICA, C. M.; KACZMAREK, L. K. Casein kinase 2 determines the voltage dependence of the K_V3.1 channel in auditory neurons and transfected cells. **The Journal of Neuroscience**, Washington, Vol. 21, N. 4, p. 1160–68, Fev. 2001.

MARTINS, C. C. *et al.* Mass spectrometry study of N-alkylbenzenesulfonamides with potential antagonist activity to potassium channels. **Amino Acids**, Vienna, Vol. 48, N. 2, p. 445–59, Fev. 2016.

MCCROSSAN, Z. A *et al.* MinK-Related Peptide 2 Modulates K_V2.1 and K_V3.1 Potassium Channels in Mammalian Brain, **The Journal of Neuroscience**, Washington, Vol. 23, N. 22, p. 8077– 8091, Set. 2003.

MEREDITH, A. L. Genetic methods for studying ion channel function in physiology and disease. In: ZHENG, J.; TRUDEAU, M. C. (Orgs) **Handbook of Ion Channels**, Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2015, cap. 13, p. 167- 188.

MORAIS-CABRAL, J. H. , ZHOU, Y., MACKINNON, R. Energetic Optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter, **Nature**, London, Vol. 414, N. 5869, p. 37–42, Nov. 2001

OLSSON, R. I. *et al.* Lactam sulfonamides as potent inhibitors of the K_V1.5 potassium ion channel. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Vol. 24, N. 5, p. 1269–1273, Mar. 2014.

OUSINGSAWAT, J. *et al.* Expression of Voltage-Gated Potassium Channels in Human and Mouse Colonic Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, Vol. 13, N. 3, p. 824–31, Fev. 2007.

OZAWA, Y. *et al.* E7070, a novel sulphonamide agent with potent antitumour activity in vitro and in vivo. **European Journal of Cancer**, Vol. 37, N. 17, p. 2275–2282, Nov. 2001.

PANNACCIONE, A. et al. Upregulation and increased activity of K_v3.4 channels and their accessory subunit MinK-related peptide 2 induced by amyloid peptide are involved in apoptotic neuronal death. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, Vol. 72, N. 2, p. 665–673 2007.

PARDO, L. A. *et al.* Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. **The EMBO Journal**. Vol. 18, N. 20, p. 5540–5547, 1999.

PARK, J.-B. *et al.* Open Channel Block by KCB-328 [1-(2-Amino-4-methanesulfonamidophenoxy)-2-[N-(3,4-dimethoxyphenethyl)-N-methylamino]ethane Hydrochloride] of the Heterologously Expressed Human Ether-a-go-go-Related Gene K⁺ Channels. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, Vol. 302, N. 1, p. 314–319, Jul. 2002.

PETRI JR, W. A. Antimicrobianos (continuação). In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN G. A. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. Cap. 44, p.877-890.

PLANT L. D. ; GOLDSTEIN, S. A. N. Two-Pore Domain Potassium Channels. In: ZHENG, J.; TRUDEAU, M. C. (Orgs) **Handbook of Ion Channels**, Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2015, cap. 19, p. 261- 274.

REN, Y. R. *et al.* Clofazimine Inhibits Human K_v1.3 Potassium Channel by Perturbing Calcium Oscillation in T Lymphocytes, **PlosONE**, San Francisco, Vol. 3, N. 12, e4009, Dez. 2008.

RODRIGUES, A. R. A. *et al.* Tityustoxin-K α Blockade of K⁺ channels. **British Journal of Pharmacology**, London, Vol. 139, N. 6, p. 1180-1186, Jul. 2003.

RUDY, B.; MCBAIN, C. K_v3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high frequency repetitive firing. **TRENDS in Neurosciences**, Cambridge, Vol. 24, N. 9, p. 517-526, Set. 2001.

RUTA, V. *et al.* Functional analysis of an archaeobacterial voltage-dependent K⁺ channel, **Nature**, London, Vol. 422, N. 6928, p.180-185, Mar. 2003.

SCHMIDT, D.; JIANG, Q.-X.; MACKINNON, R. Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. **Nature**, London, Vol. 444, N. 7120, p. 775–797, Dez. 2006.

SCHMITZ, A. *et al.* Design of PAP-1, a Selective Small Molecule K_v1.3 Blocker, for the Suppression of Effector Memory T Cells in Autoimmune Diseases, **Molecular Pharmacology**, Bethesda, Vol. 68, n.5, p. 1254-1270, Nov. 2005.

SHIEH, C.-C. et al. Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities, **Pharmacological Reviews**, Bethesda, Vol. 52, N. 4, p. 557-592, Dez. 2000.

SNYDERS, D. J. *et al.* Block by Quinidine Cloned Human Cardiac Potassium Channel. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, Vol. 41, N. 2, p. 322–30, Fev. 1992.

SUNG, M. J. *et al.* Open channel block of K_v3.1 currents by fluoxetine. **Journal of Pharmacological Sciences**, Vol. 106, N. 1, p. 38–45, Jan. 2008.

SUNG, M. J.; SANG J. H.; CHOI B. H. Effect of Psoralen on the Cloned K_v3.1 Currents, **Archives of Pharmacal Research**, Vol. 32, N. 3, p. 407–12, Mar. 2009.

TAO, X. *et al.* A Gating Charge Transfer Center in Voltage Sensors, **Science**, Washington, Vol. 328, N. 5974, p. 67–73, Abr. 2010.

TASKIN, B. *et al.* Biophysical characterization of K_v3.1 potassium channel activating compounds. **European Journal of Pharmacology**, Vol. 758, p. 164–70, Jul. 2015.

VALIYAVEETIL *et al.* Ion Selectivity in a Semisynthetic K⁺ Channel Locked in the Conductive Conformation, **Science**, Washington, Vol. 314, N. 5801, p. 1004–7, Nov. 2006.

WALTER, M. E *et al.* Antinociceptive Properties of Chloromaleinimides and their Sulphonyl Derivatives. **Archiv der Pharmazie**, Vol. 337, N.4, p. 201–206, Abr. 2004.

WANG, L.-Y. *et al.* Contribution of the K_v3.1 potassium channel to high-frequency firing in mouse auditory neurones, **Journal of Physiology**, London, Vol. 509, N.1, p. 183–94, Maio 1998.

WANG, K, Drugs targeting ion channels. In: ZHENG, J.; TRUDEAU, M. C. (Orgs) **Handbook of Ion Channels**, Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2015, cap. 43, p. 649 - 660.

WULFF, H. *et al.* Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, Vol. 97, N. 14, p. 8151–56, Jul. 2000.

WULFF, H.; ZHOROV, B. K⁺ Channel Modulators for the Treatment of Neurological Disorders and Autoimmune Diseases, **Chemical Reviews**, Vol. 108, V. 5, p. 1744–73, Maio 2008.

WULF, H., CASTLE, N. A., PARDO, L. A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. **Nature Review: Drug Discovery**, London, Vol. 8, n. 12, p. 982–999, Dez. 2009.

YANG, H.; CUI, J. BK channels. In: ZHENG, J.; TRUDEAU, M. C. (Orgs) **Handbook of Ion Channels**, Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2015, cap. 17, p. 227- 240.

YASUDA, T.; CUNY, H.; ADAMS, D. J. K_v3.1 channels stimulate adult neural precursor cell proliferation and neuronal differentiation. **The Journal of Physiology**, London, Vol. 591, N.10, p. 1–13, Mar. 2013.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. **Science Signaling**, Washington, Vol. 253, N. 15, p.1–17, Set. 2004.

YU, H. *et al.* Effect of tyrphostin AG879 on K_V4.2 and K_V4.3 potassium channels. **British Journal of Pharmacology**, London, Vol. 172, N. 13, p.3370–82, 2015.

ZHANG, H. *et al.* Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel. **Nature Communications**, London, Vol. 2, N. 250, p. Mar. 2011

ZHOU, Y. MACKINNON, R. The occupancy of Ions in the K⁺ Selectivity filter: Charge Balance and Coupling of Ion Binding to a Protein Conformational Change Underlie High Conduction Rates, **Journal of Molecular Biology**, London, Vol. 333, N. 5, p. 965-975, Nov. 2003.

APÊNDICE A – DESENVOLVIMENTO DA EQUAÇÃO DE HILL PARA A CARGA TRANSFERIDA

A equação de Hill para a corrente no estado estacionário pode ser escrita da seguinte forma (RODRIGUES *et al.*, 2003):

$$\frac{I}{I_{CTRL}} = \frac{IC_{50}^N}{IC_{50}^N + ([D])^N}, \quad (8)$$

Onde IC_{50} é a concentração da molécula que reduz a corrente pela metade e N é o coeficiente de Hill para a corrente de estado estacionário. Lembrando que $i=dq/dt$, multiplicando-se a equação 8 por dt/dt , tem-se:

$$\frac{I \cdot dt}{I_{CTRL} \cdot dt} = \frac{IC_{50}^N}{IC_{50}^N + ([D])^N}, \quad (9)$$

substituindo a equação (9) em (8)

$$\frac{\int I \cdot dt}{\int I_{CTRL} \cdot dt} = \frac{IC_{50}^N}{IC_{50}^N + ([D])^N}. \quad (10)$$

Como $Q = \int I \cdot dt$ e $Q_{CTRL} = \int I_{CTRL} \cdot dt$, chega-se a equação de Hill para a carga transferida pelo canal, equação 2 da seção 4.1.1:

$$\frac{Q}{Q_{CTRL}} = \frac{IC_{50}^N}{IC_{50}^N + ([D])^N}. \quad (11)$$

Onde IC_{50} é a concentração da molécula que reduz a carga transferida pela metade e N é o coeficiente de Hill para a carga transferida.

ANEXO I – CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DAS MOLÉCULAS UTILIZADAS NESSE TRABALHO

Nessa seção, são mostrados os detalhes dos resultados de espectroscopia de todas as moléculas testadas. As informações sobre as moléculas SMD2, SMD3, SMD3_APP, SMD2_APP, SMD2_SN e SMD3_SN foram retirados de MARTINS et al. (2016), enquanto que os resultados das caracterizações das moléculas Amostra 7, Amostra 8, Sar_APP e Sar_APA, foram retirados de GONÇALVES et al. (2011).

SMD2_SN (4-cloro-N-butilbenzenossulfonamida): Sólido Branco (0.164 g, 33.1 %); pf = 46–46.5 °C; MM = 247.74 g/mol. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.84–7.76 (m, 2H), 7.53–7.44 (m, 2H), 4.81 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 2.93 (dd, J = 13.3, 6.9 Hz, 2H), 1.47–1.40 (m, 2H), 1.32–1.23 (m, 2H), 0.84 (t, J = 7.3 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 139.16, 138.65, 129.49, 128.64, 43.07, 31.67, 19.78, 13.62. EI-MS m/z encontrado: 247. ESI(+)-MS m/z encontrado: 246.03720, m/z calculada para $[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2\text{S}+\text{H}]^+$: 246.0361.

SMD2 (4-cloro-3-nitro-N-butilbenzenossulfonamida): Sólido amarelo claro (0.450 g, 77 %), pf = 68–69 °C; MM = 292.73 g/mol. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) δ 8.42 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.05 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.95 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 2.80 (dd, J = 12.8, 6.9 Hz, 2H), 1.40–1.32 (m, 2H), 1.24 (sext, J = 14.0, 7.0 Hz, 2H), 0.81 (t, J = 7.3 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 147.45, 140.88, 133.09, 131.26, 129.12, 123.86, 42.21, 31.05, 19.12, 13.40. EI-MS m/z encontrado: 292. ESI(+)-MS m/z encontrado: 291.02251, m/z calculado para $[\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}+\text{H}]^+$: 291.02118.

SMD2_APP (4-[N-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-N-butilbenzenossulfonamida): Sólido Amarelo (0.414 g, 52 %), pf = 111–113.7 °C; MM = 398.47 g/mol. RMN de ^1H (600 MHz, DMSO) δ 8.63 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.42 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.78 (dd, J = 9.1, 1.9 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.40 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 3.35 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 3.27 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.71 (dd, J = 13.1, 6.8 Hz, 2H), 2.22 (t, J = 8.1

Hz, 2H), 1.95–1.89 (m, 2H), 1.79 (qu, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.37–1.32 (m, 2H), 1.26–1.20 (m, 2H), 0.79 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 174.22, 146.63, 133.21, 129.79, 126.01, 125.90, 115.54, 46.34, 42.14, 40.10, 39.30, 30.99, 30.40, 25.86, 19.22, 17.53, 13.43. EI-MS m/z encontrada: 399. ESI(+)-MS m/z encontrado: 399.16556, m/z calculado para $[\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5\text{S} + \text{H}]^+$: 399,16967.

SMD3_SN (4-cloro-N-furfurilbenzenossulfonamida): Sólido marrom (0.320 g, 59 %), $\text{pf} = 118.7\text{--}119.9$ °C; $\text{MM} = 271.72$ g/mol. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76–7.74 (m, 1H), 7.74–7.72 (m, 1H), 7.45–7.44 (m, 1H), 7.44–7.42 (m, 1H), 7.22 (dd, $J = 1.8, 0.7$ Hz, 1H), 6.22 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.09 (dd, $J = 3.2, 0.6$ Hz, 1H), 4.84 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.21 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 149.31, 149.30, 142.73, 139.20, 138.69, 138.67, 129.37, 128.64, 110.53, 108.60, 108.59, 40.20. EI-MS m/z encontrada: 271. ESI(+)-MS m/z encontrada: 270.00074, m/z calculada para $[\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3\text{S} + \text{H}]^+$: 269.99972.

SMD3 (4-cloro-3-nitro-N-furfurilbenzenossulfonamida): Sólido Bege (0.434 g, 68.7 %), $\text{pf} = 131.8\text{--}132.4$ °C; $\text{MM} = 316.17$ g/mol. RMN de ^1H (600 MHz, DMSO) δ 8.62 (s, 1H), 8.31 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.40 (dd, $J = 1.8, 0.8$ Hz, 1H), 6.24 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.17 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 4.13 (s, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 149.87, 147.13, 142.59, 141.09, 132.82, 131.25, 129.01, 123.86, 110.27, 108.51, 39.16. EI-MS m/z encontrada: 316. ESI(+)-MS m/z encontrado: 314.98674, m/z calculado para $[\text{C}_{11}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S} + \text{H}]^+$: 314.98479.

SMD3_APP (4-[N-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-N-furfurilbenzenossulfonamida): Sólido amarelo (0.463 g, 54.8 %), $\text{pf} = 115\text{--}117.8$ °C; $\text{MM} = 422.45$ g/mol. RMN de ^1H (600 MHz, DMSO) δ 8.64 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.19 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.71 (dd, $J = 9.2, 2.3$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.17 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 4.01 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.44–3.39 (m, 2H), 3.38–3.36 (m, 2H), 3.28 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.24 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 1.98–1.90 (m, 2H), 1.79 (qu, $J = 6.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 174.71, 150.74, 147.04, 142.90, 133.65, 130.16, 126.51, 115.77,

110.72, 108.55, 46.83, 40.53, 39.77, 39.67, 30.88, 26.33, 18.00. EI-MS m/z encontrada: 423. ESI(+)-MS m/z encontrado: 23.13222, m/z calculado para $[C_{18}H_{22}N_4O_6S+H]^+$: 423.13273.

Amostra 7 (Ácido 4-[N-(3'-aminopropil)-2 pirrolidona]-3-nitrobenzóico): Sólido amarelo (2.18 g, 89%): pf = 219–224 °C; MM = 344.09 g/mol. RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) d 8.53 (d, 1H, 4JHH = 1.9 Hz), 8.22 (dd, 1H, 4JHH = 1.9, 3JHH = 8.2 Hz), 7.53 (d, 1H, 3JHH = 8.2 Hz), 5.28 (s, 1H), 3.62 (t, 2H), 3.51 (t, 2H), 3.40 (t, 2H), 3.13 (t, 2H), 2.16 (qu, 2H), 2.04 (qu, 2H) ppm; ^{13}C NMR (250 MHz, D_2O) d 170.6, 164.5, 146.5, 136.6, 133.7, 131.6, 128.3, 125.8, 41.9, 37.7, 31.1, 29.7, 17.9 ppm; FTIR (KBr) m 3,214, 1,608, 1,683 cm^{-1} ; ESI(+)-MS m/z encontrada: 308.141, m/z calculada para $[C_{14}H_{17}N_3O_5 + H]^+$: 308.125, fragmentos observados: $[M + H-H_2O]^+$ de m/z 290, $[M + H-H_2O + C_2H_4]^+$ de m/z 262 e $[M + H-C_7H_6N_2O_4]^+$ de m/z 126 (5 membros no anel).

Amostra 8 (Ácido 4-[N-(3'-aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzóico): Sólido amarelo (1,74 g, 86%): pf = 157–159 °C; MM = 372,12 g/mol. RMN de 1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) d 8.47 (d, 1H, 4JHH = 1.9 Hz), 8.16 (dd, 1H, 4JHH = 1.9, 3JHH = 8,3 Hz), 7.87 (d, 1H, 3JHH = 8.3 Hz), 3.55 (t, 2H), 3.47 (t, 2H), 3.37 (m, 2H), 3.25 (m, 2H), 1.90 (qu, 2H), 1.60 (m, 6H) ppm; ^{13}C NMR (250 MHz, D_2O) d 174.4, 168.6, 149.6, 139.3, 136.5, 134.5, 131.5, 128.8, 50.8, 40.6, 35.4, 31.1, 28.5, 26.0, 21.8, 17,7 ppm; FTIR (KBr) m 3,220, 1,605, 1,680 cm^{-1} ; ESI(+)-MS m/z encontrado: 336.201, m/z calculado para $[C_{16}H_{22}N_3O_5 + H]^+$: 336.156, fragmentos observados: $[M + H-H_2O]^+$ de m/z 318, $[M + H-H_2O-C_2H_4]^+$ de m/z 290 e $[M + H-C_7H_6N_2O_4]^+$

Sar_APP (Ácido 4-[N-(3'-aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitrobenzenossulfônico): Sólido marrom (1.7 g, 82%): pf >310 °C; MM = 307,3 g/mol. RMN de 1H (500 MHz, D_2O) d 8.25 (d, 1H, 4JHH = 2.1 Hz), 7.76 (dd, 1H, 4JHH = 2.1, 3JHH = 8.3 Hz), 6.92 (d, 1H, 3JHH = 8.3 Hz), 3.55 (t, 2H), 3.31 (m, 2H), 2.87 (t, 2H), 2.72 (t, 2H), 2.30 (m, 2H), 1.91 (m, 2H)

ppm; ^{13}C NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ 178.6, 146.5, 142.6, 132.9, 130.5, 124.5, 123.2, 53.3, 47.9, 42.0, 39.3, 29.8, 18.1 ppm; FTIR (KBr) ν 3,570, 1,653, 1,269 cm^{-1} ; ESI(+)-MS m/z encontrado: 344.099, m/z calculado para $[\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S} + \text{H}]^+$: 344.092, fragmentos observados: $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ de m/z 326, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_2\text{H}_4]^+$ de m/z 298 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_5\text{S}]^+$ de m/z 126 (5 membros no anel).

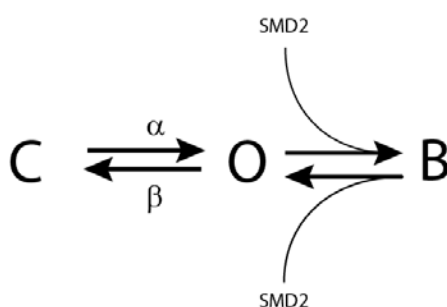
Sar_APA (Ácido 4-[N-(3'-aminopropil)-2-azepanona]-3-nitrobenzenossulfônico):

Sólido de cor marrom: (2.55 g, 86%), $\text{pf} > 310^\circ\text{C}$; MM = 335,36 g/mol. RMN de ^1H (500MHz, DMSO- d_6) δ 8,41 (d, 1H, $J_{\text{meta}} = 1,9$ Hz), 8,12 (dd, 1H, $J_{\text{meta}} = 1,9$, $J_{\text{orto}} = 8,3$ Hz), 7,79 (d, 1H, $J_{\text{orto}} = 8,3$ Hz), 3,54 (t, 2H, $3J_{\text{HH}} = 5,8$ Hz), 3,47 (t, 2H), 3,26 (t, 2H, $3J_{\text{HH}} = 5,8\text{Hz}$), 2,68 (t, 2H), 1,91 (qu, 2H, $3J_{\text{HH}} = 5,8$ Hz), 1,63 (m, 6H) ppm; RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 170,7; 152,5; 142,1; 139,4; 136,9; 132,5; 131,3; 58,8; 53,3; 43,1; 36,9; 33,7; 31,4; 28,8; 24,4 ppm; FT-IV (KBr) ν 3600, 1703, 1270 cm^{-1} ; ESI(+)- MS m/z encontrada: 372,110, m/z calculada para $[\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_6\text{S} + \text{H}]^+$: 372,123, os fragmentos iônicos são também observados: $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ de m/z 354, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_2\text{H}_4]^+$ de m/z 326 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_5\text{S}]^+$ de m/z 154 (7-membros no anel).

ANEXO II- DESENVOLVIMENTO DA EQUAÇÃO DE WOODHULL

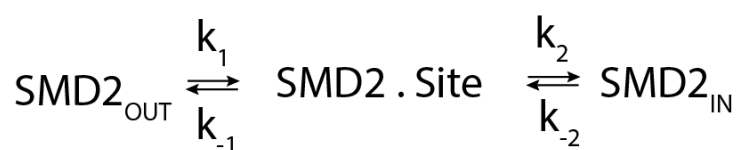
Tomando como base o diagrama de estados apresentados na figura 39, apresenta-se o estado fechado (C), o estado aberto (O) e o estado aberto bloqueado (OB) que são as possíveis transições para o K_V3.1 adotada nesse trabalho. Nesse modelo, adotou-se que a molécula não se liga ao estado fechado e nem ao estado inativado do canal.

Figura 38: Diagrama de estado para o bloqueio do K_V3.1 por SMD2.



Fonte: próprio autor.

Assumindo que há um sítio de ligação para o íon (ou bloqueador) dentro do canal, este pode alcançar o sítio tanto a partir do lado interno quanto do lado externo, obteve-se o seguinte diagrama (WOODHULL, 1973):



A partir da teoria de cinética química (teoria de Eyring), para as constantes de taxa (velocidade) das ligações obteve-se que:

$$k_1 = [X]_o * a_1 * \exp\left(\frac{-U_1}{RT} - \frac{z\delta FE}{2RT}\right), \quad (12)$$

$$k_{-1} = a_{-1} * \exp\left(\frac{-U_{-1}}{RT} + \frac{z\delta FE}{2RT}\right), \quad (13)$$

$$k_2 = a_2 * \exp\left(\frac{-U_2}{RT} - \frac{z(1-\delta)FE}{2RT}\right), \quad (14)$$

$$k_{-2} = [X]_i * a_{-2} * \exp\left(\frac{-U_{-2}}{RT} + \frac{z(1-\delta)FE}{2RT}\right). \quad (15)$$

Onde $[X]_o$ e $[X]_i$ são as concentrações de bloqueadores do canal para o lado interno e externo, respectivamente. U_i são os componentes de energia de ativação dependentes de voltagem, a_i são as constantes de proporcionalidade, z é a valência do íon, R é a constante dos gases, T a temperatura em Kelvin, F é a constante de Faraday e E é o potencial de membrana (V). As constantes de proporcionalidade podem ser combinadas na seguinte equação:

$$b_i = a_i * \exp\left(\frac{-U_i}{RT}\right). \quad (16)$$

Dessa forma, no estado estacionário a probabilidade (p) de uma molécula se ligar ao canal e o bloquear é:

$$p = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-1} + k_1 + k_2 + k_{-2}}. \quad (17)$$

Assumindo que a molécula se liga ao canal e não o permeia, então, pôde-se adotar que:

$$K_2, K_{-2} \text{ e } [SMD2]_i \rightarrow 0. \quad (18)$$

Logo,

$$p = \frac{k_{-1}}{k_{-1} + k_1}. \quad (19)$$

Normalizando a equação 19 por K_1 , chegou-se a seguinte equação:

$$p = \frac{\frac{b_{-1}}{b_1} * \exp\left(\frac{z\delta FE}{RT}\right)}{[X]_o + \frac{b_{-1}}{b_1} \exp\left(\frac{z\delta FE}{2RT}\right)}, \quad (20)$$

$$p = \frac{1}{1 + \frac{[X]_o \exp\left(\frac{-z\delta FE}{RT}\right)}{\frac{b_{-1}}{b_1}}}. \quad (21)$$

A partir da equação 3, $f=1-(I_{SMD2}/I_{CTRL})$ e a fração de bloqueio é igual a $1-p$, chegou-se a equação 4 da seção 4.3.1:

$$1 - p = f = \frac{[X]_o}{[X]_o + \frac{b_{-1}}{b_1} \exp\left(\frac{z\delta FE}{RT}\right)}. \quad (4)$$