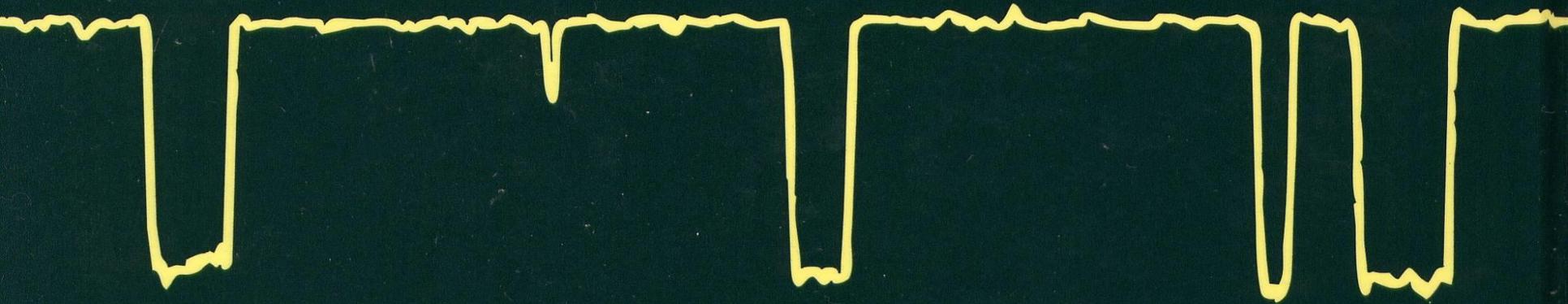


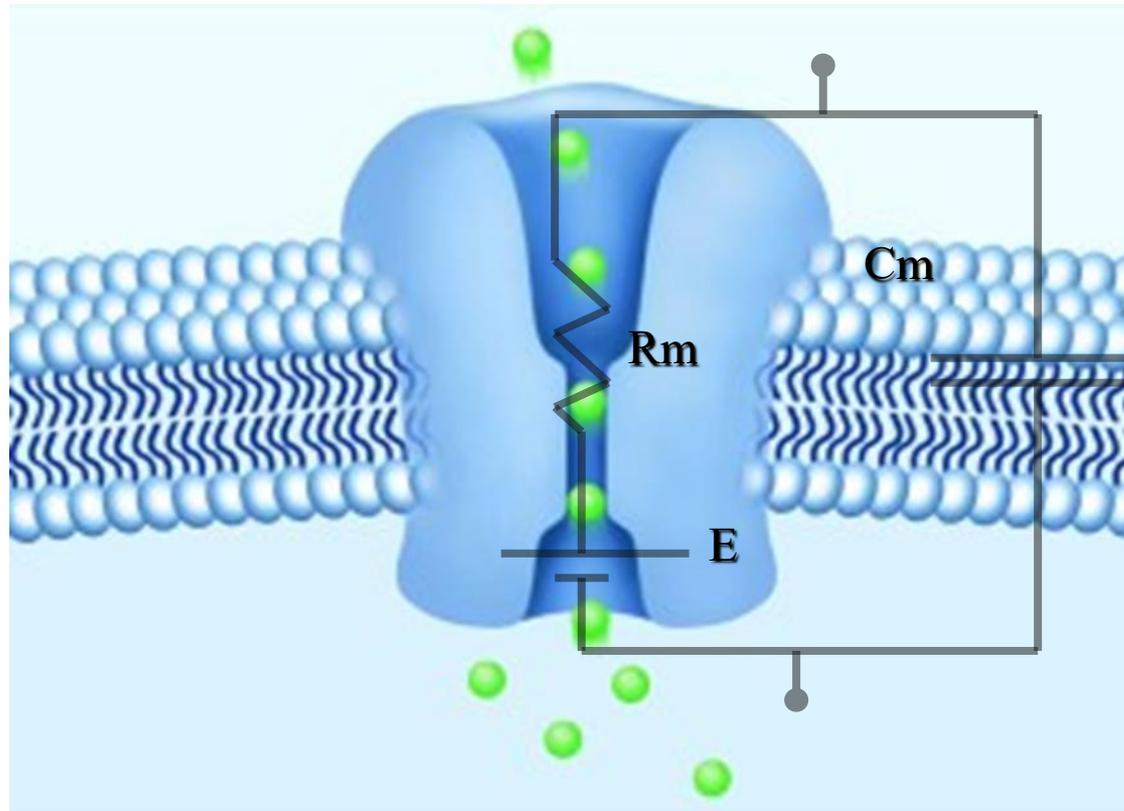
Os Canais Iônicos



Prof. Ricardo M. Leão
FMRP-USP

O que é um canal iônico?

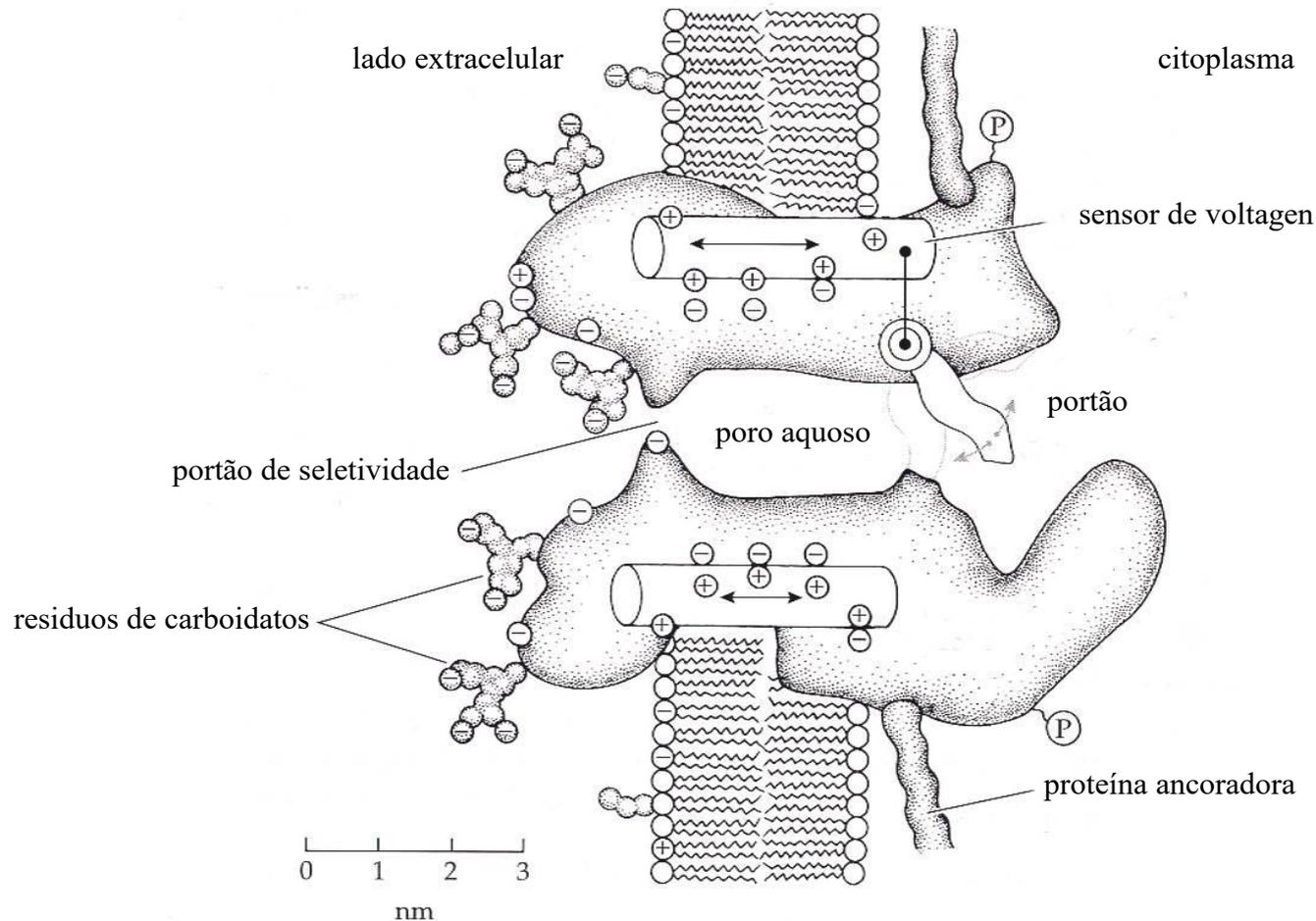
- É um “caminho” hidrofílico para os íons através da membrana
- Pode ser entendido como um condutor elétrico



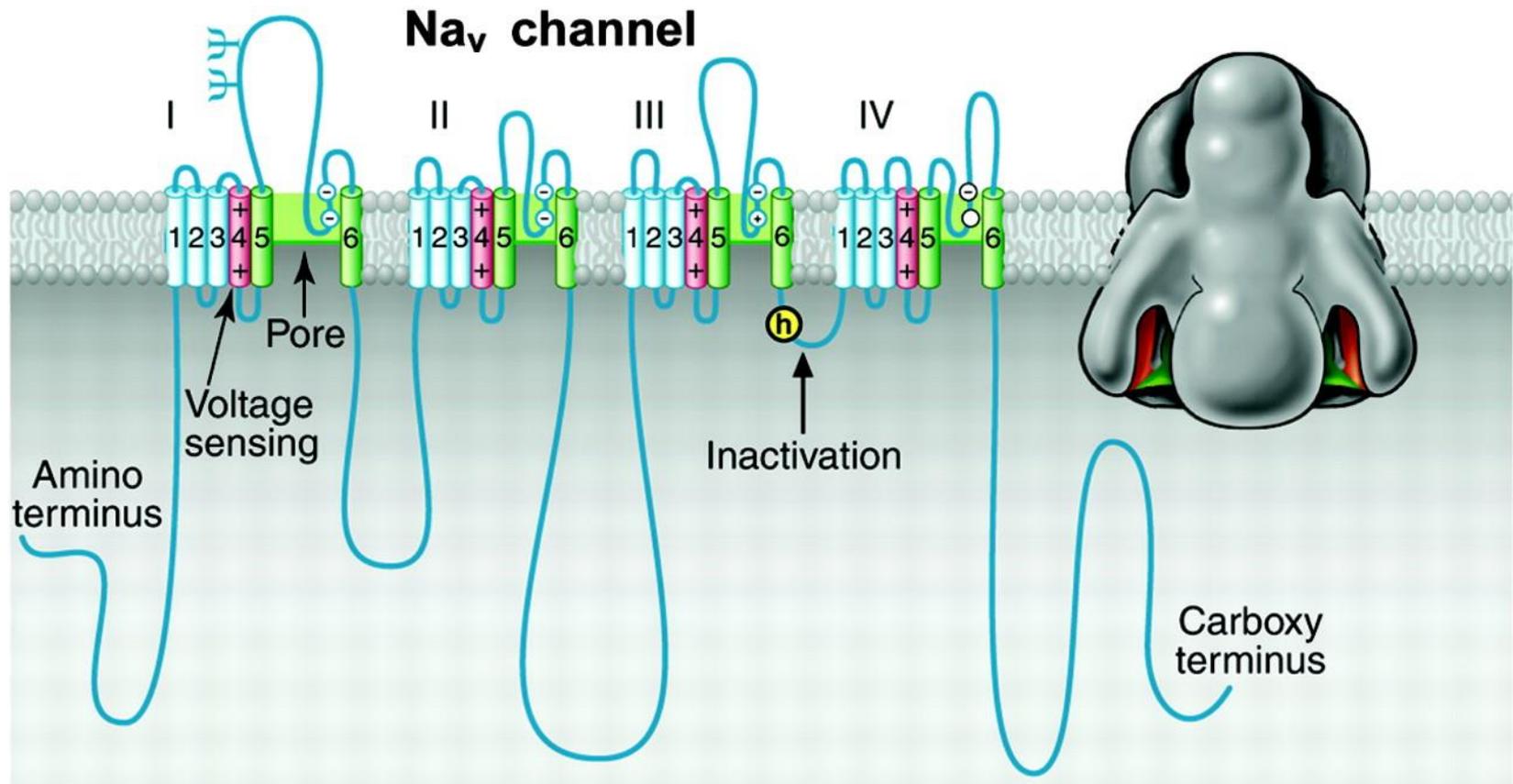
Canais iônicos

São proteínas integrais de membrana, que permeiam íons através da membrana celular

Modelo clássico de canal iônico sensível a voltagem (Hille, 1992)



Um modelo moderno de canal de sódio voltage-dependente





**KEEP
CALM
AND
PATCH
CLAMP**



E. Neher



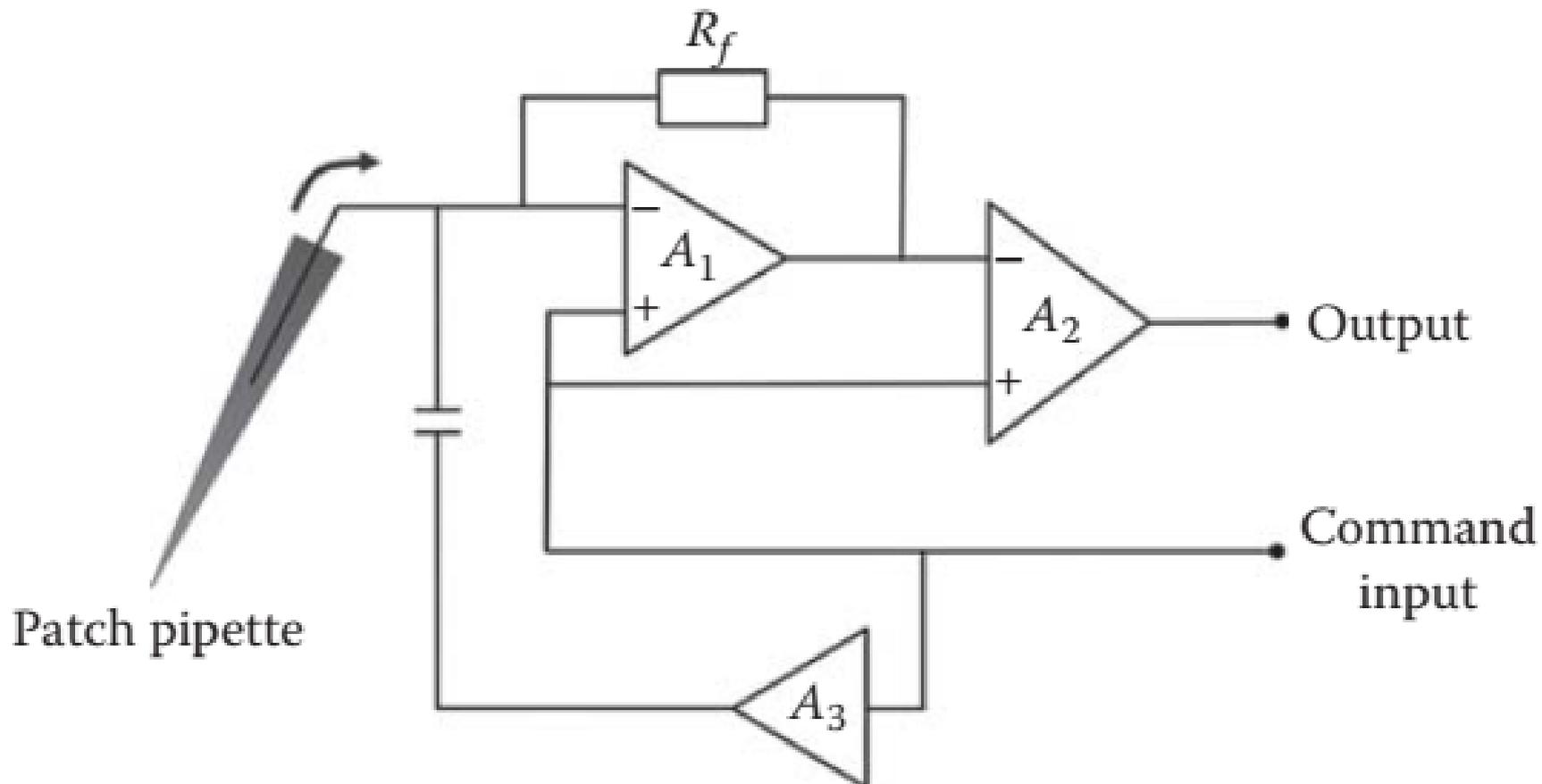
B. Sakmann

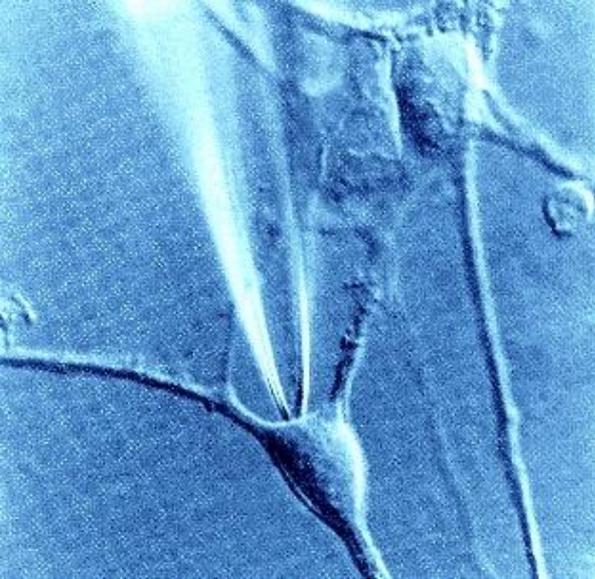
1991 Nobel Prize in Medicine

For the development of the Patch clamp

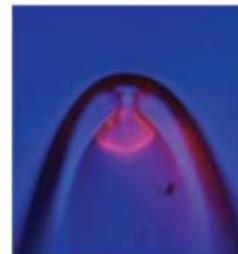
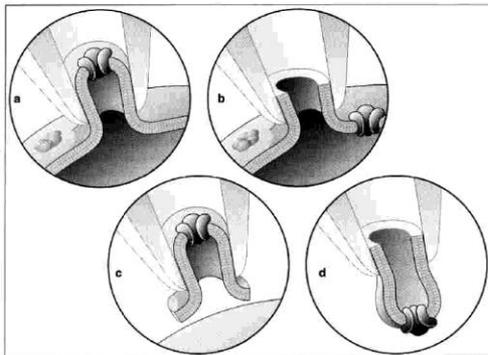
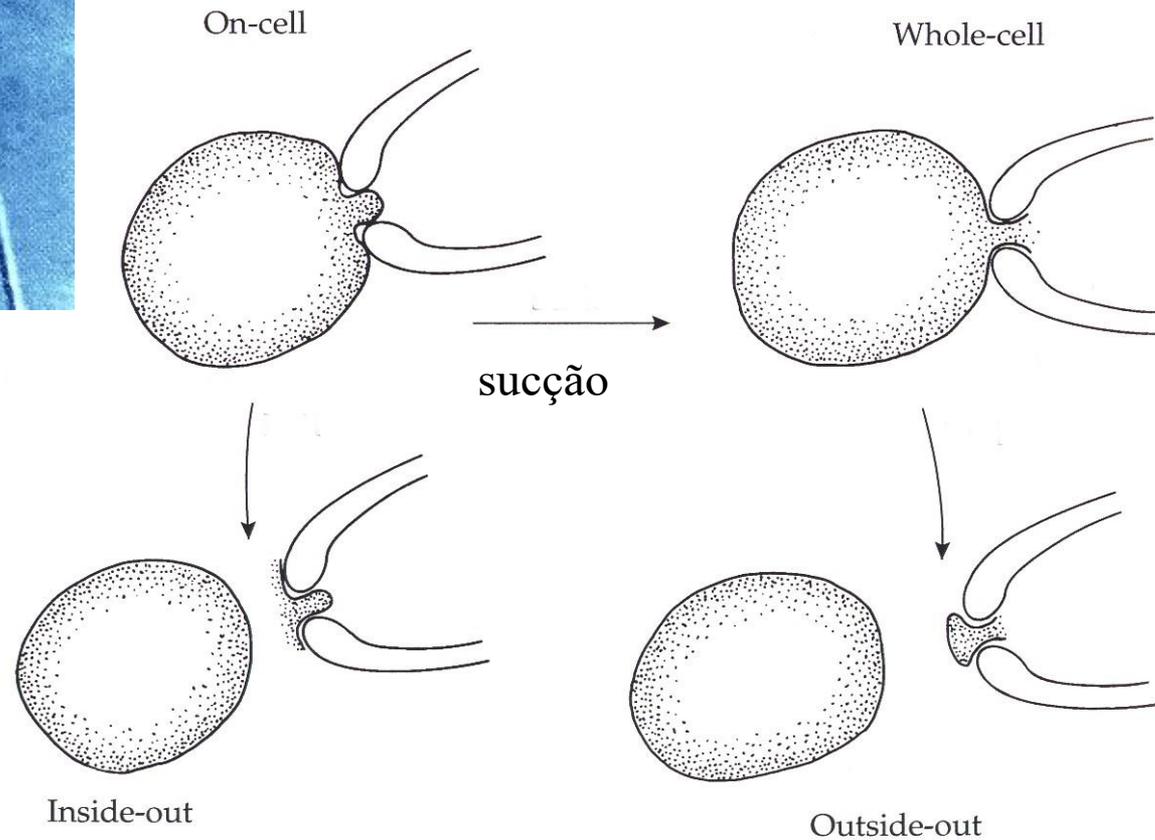
Small patch of membrane is sealed to the tip of a micropipette

The high resistance seal (called a gigaohm seal) ensures that currents flow through the amplifier rather than escaping through the rim of the patch

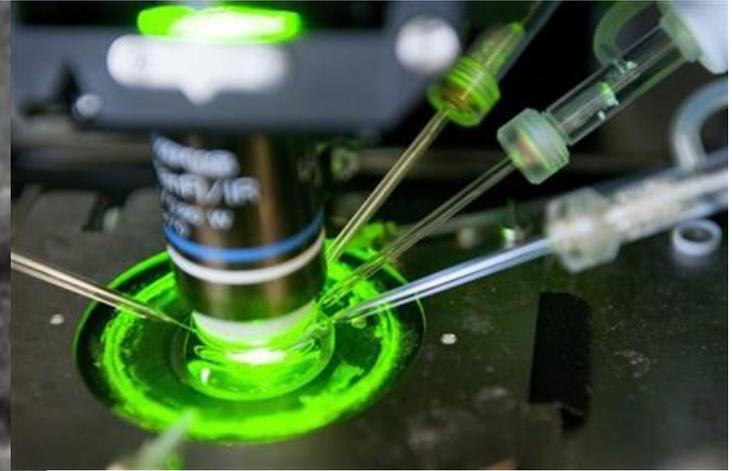
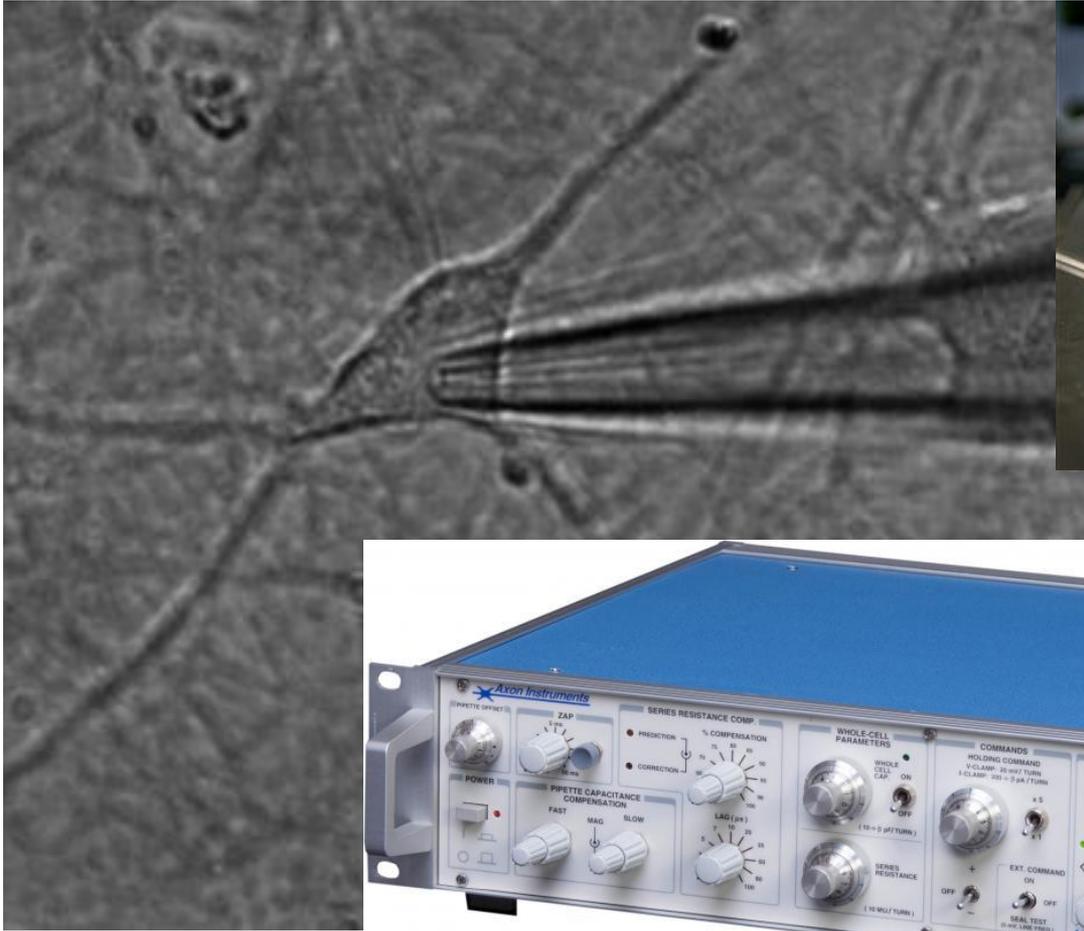




patch-clamp



patch-clamp



Current-clamp e voltage-clamp

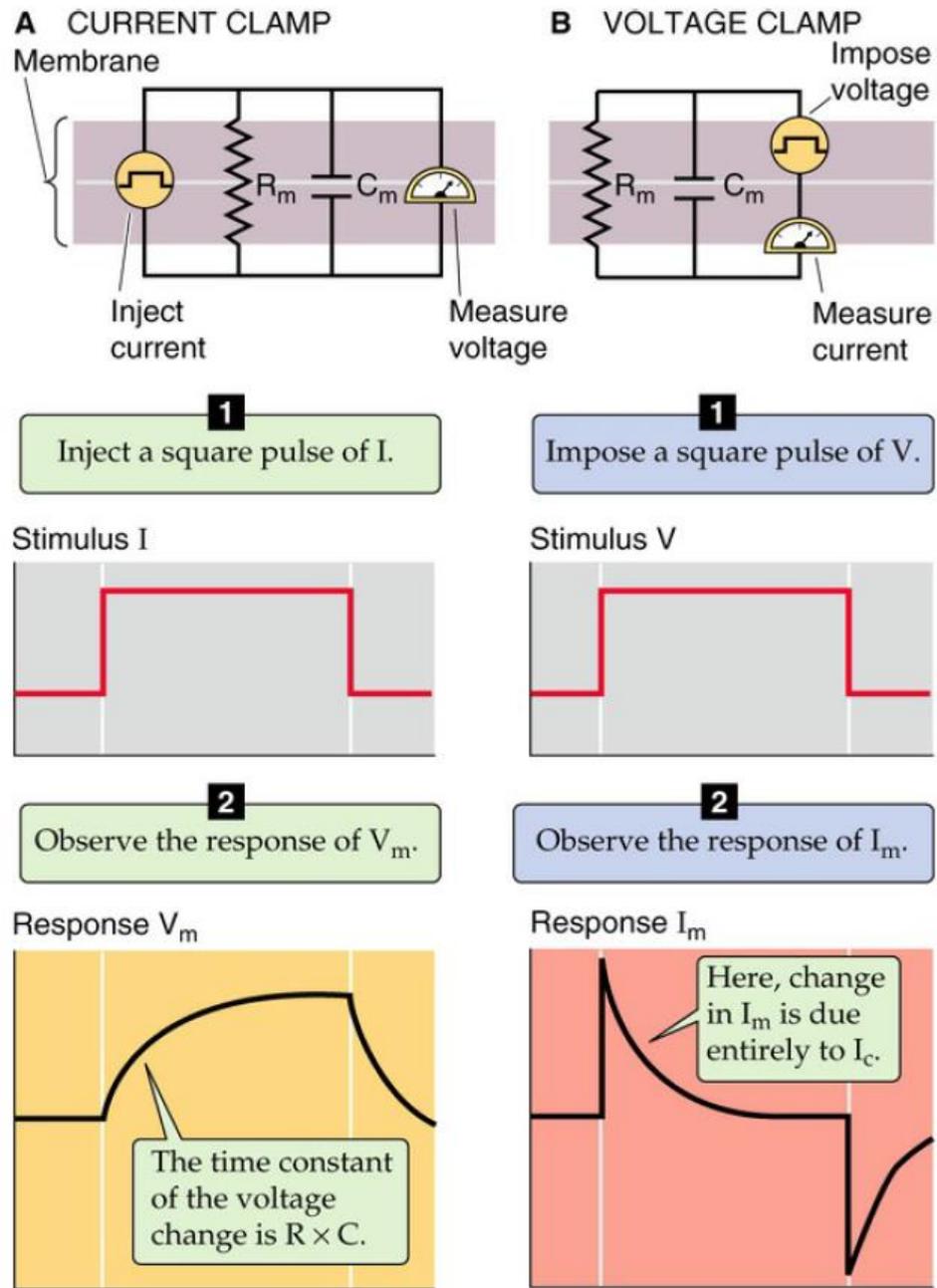
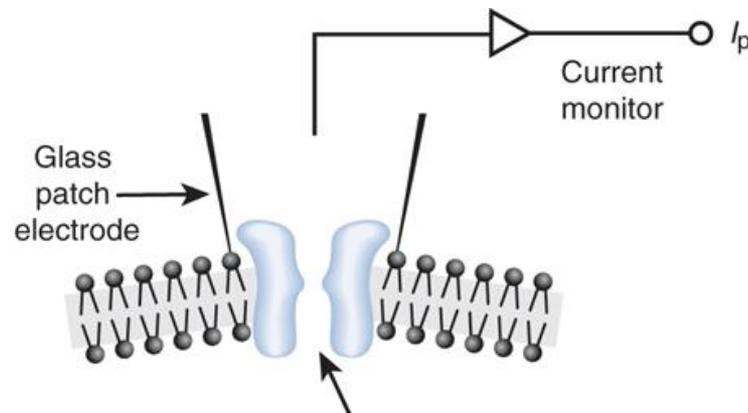
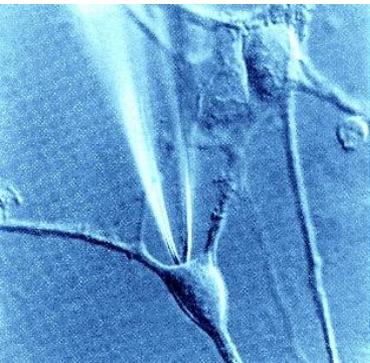
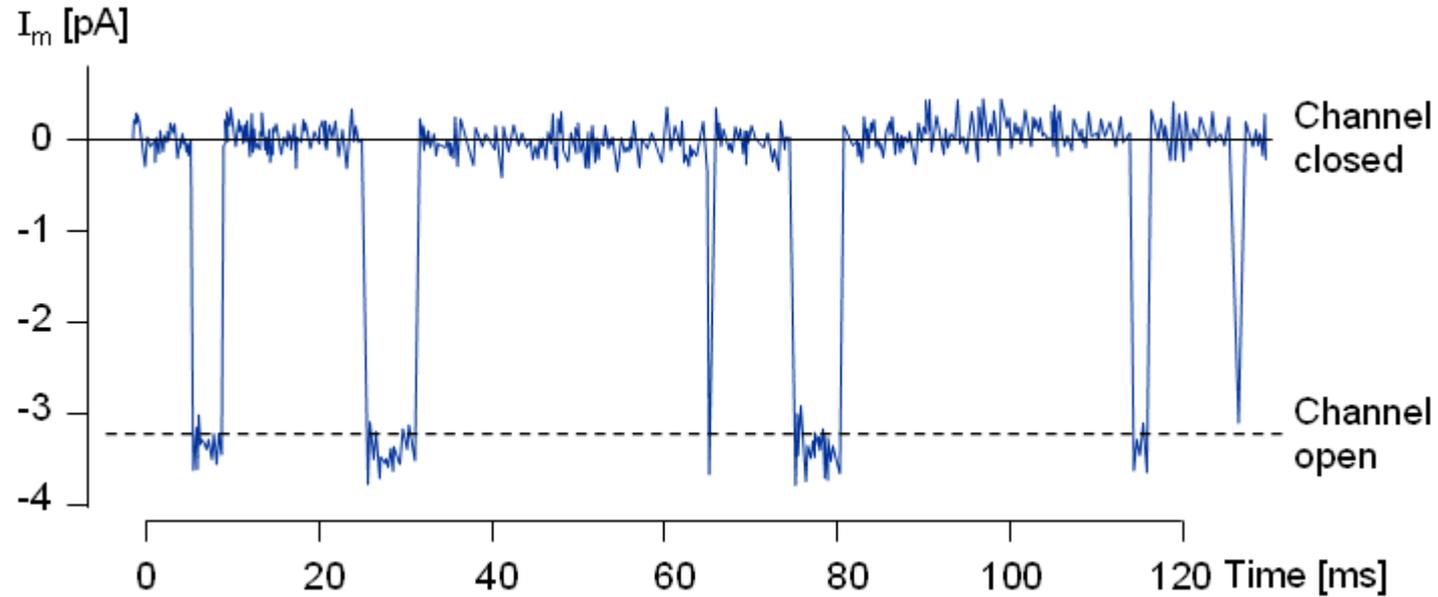
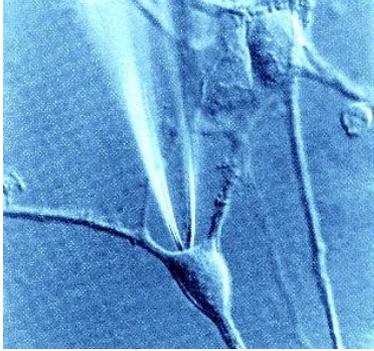


Figure 6-12 Voltage and current responses caused by the presence of a membrane capacitance. (See Note: [Two-Electrode Voltage Clamping](#))

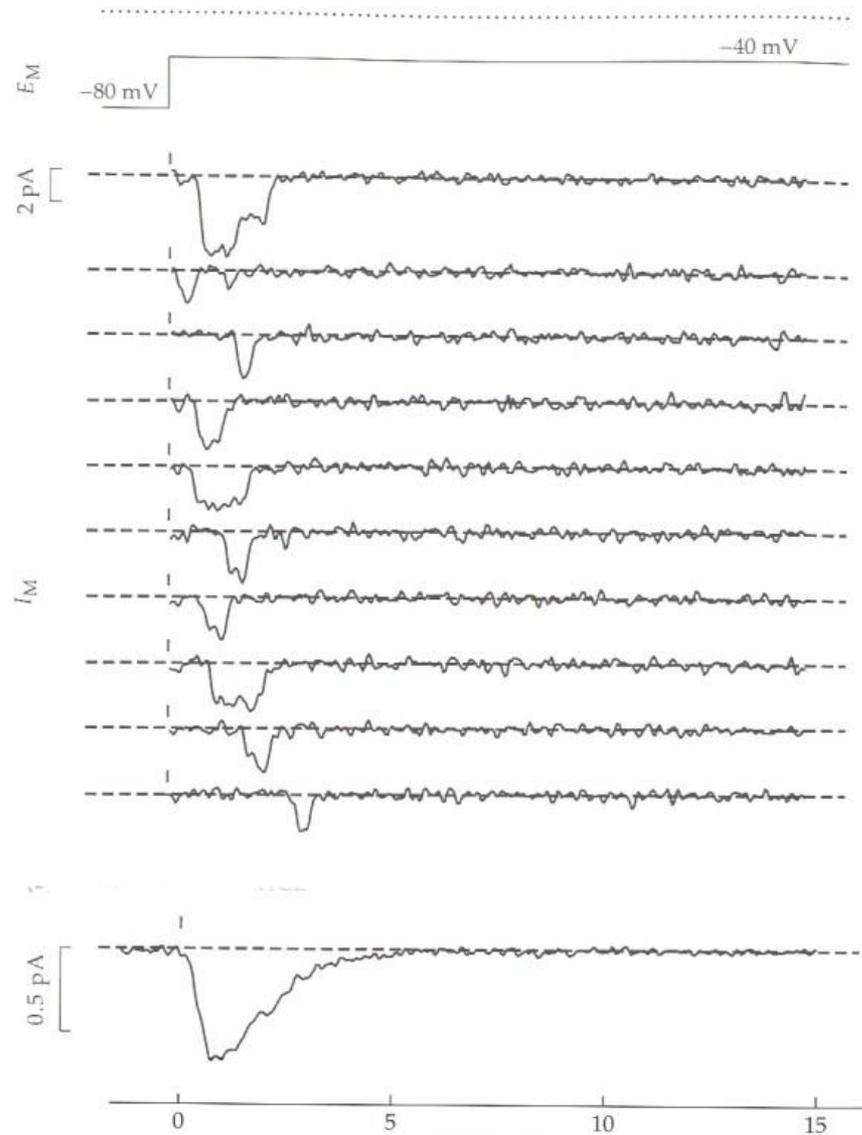
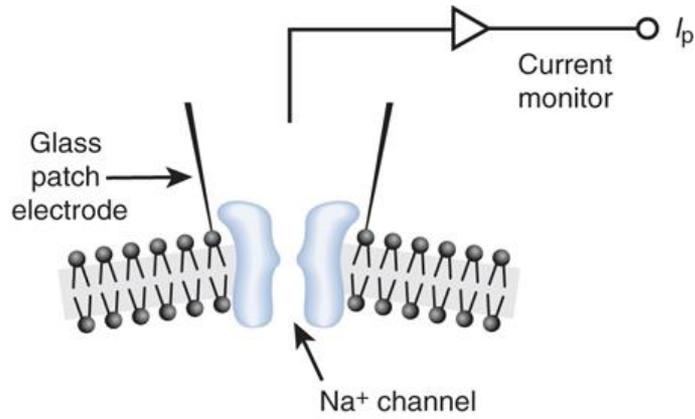
Single-channel recording



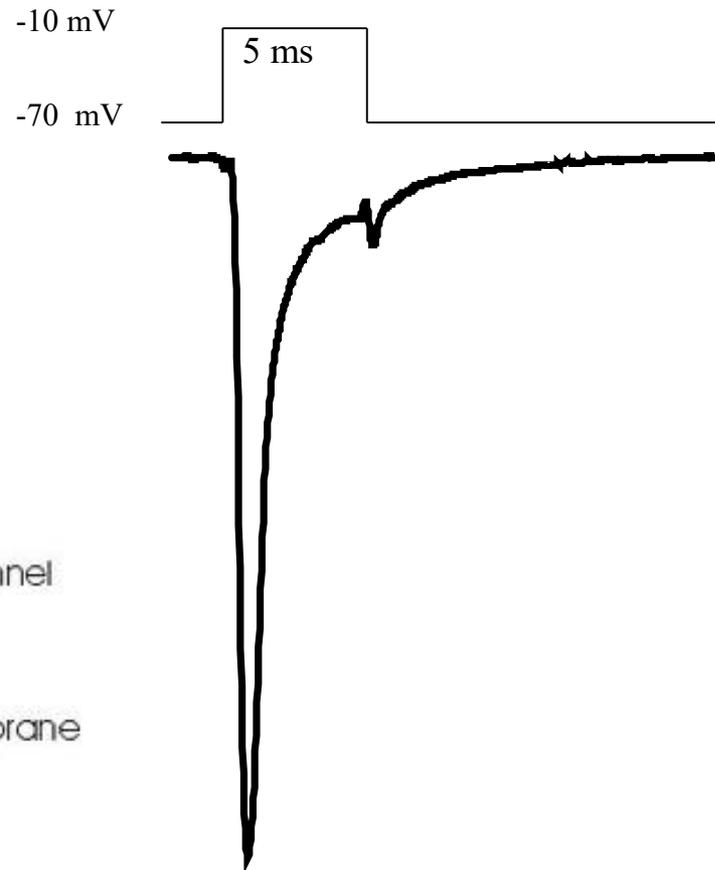
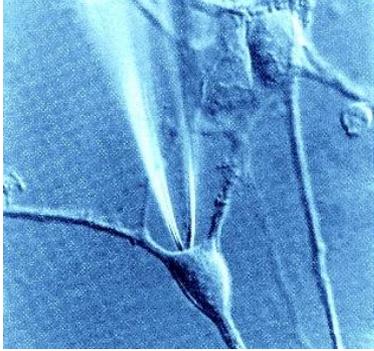


Correntes unitárias = *single channel*

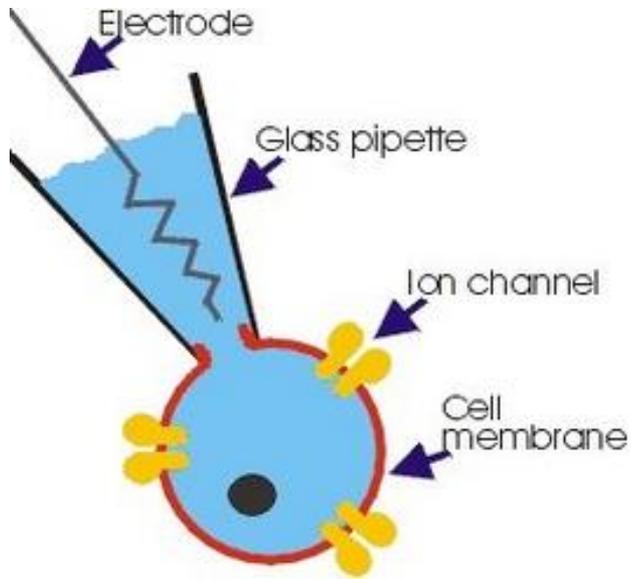
Correntes de sódio unitárias



Correntes macroscópicas = *whole-cell*



Corrente de sódio macroscópica



Tipos de canais iônicos

- Sensíveis a voltagem
 - Canais de sódio, potássio e cálcio das células excitáveis
- Sensíveis a ligantes
 - Receptores de neurotransmissores (glutamato, GABA, acetilcolina, etc...)
 - Sensores químicos (pH, oxigênio, etc...)
 - Outros (canais ativados por cGMP dos fotorreceptores)
 - mistos (canais de potássio ativados por cálcio)
- Sensíveis a estímulos físicos
 - Canais sensíveis a tensão da cóclea
 - Canais sensíveis a calor e frio
- Canais de vazamento
 - Canais de sódio, cloreto e de potássio presentes nas membranas celulares em geral

Funções fisiológicas dos canais iônicos

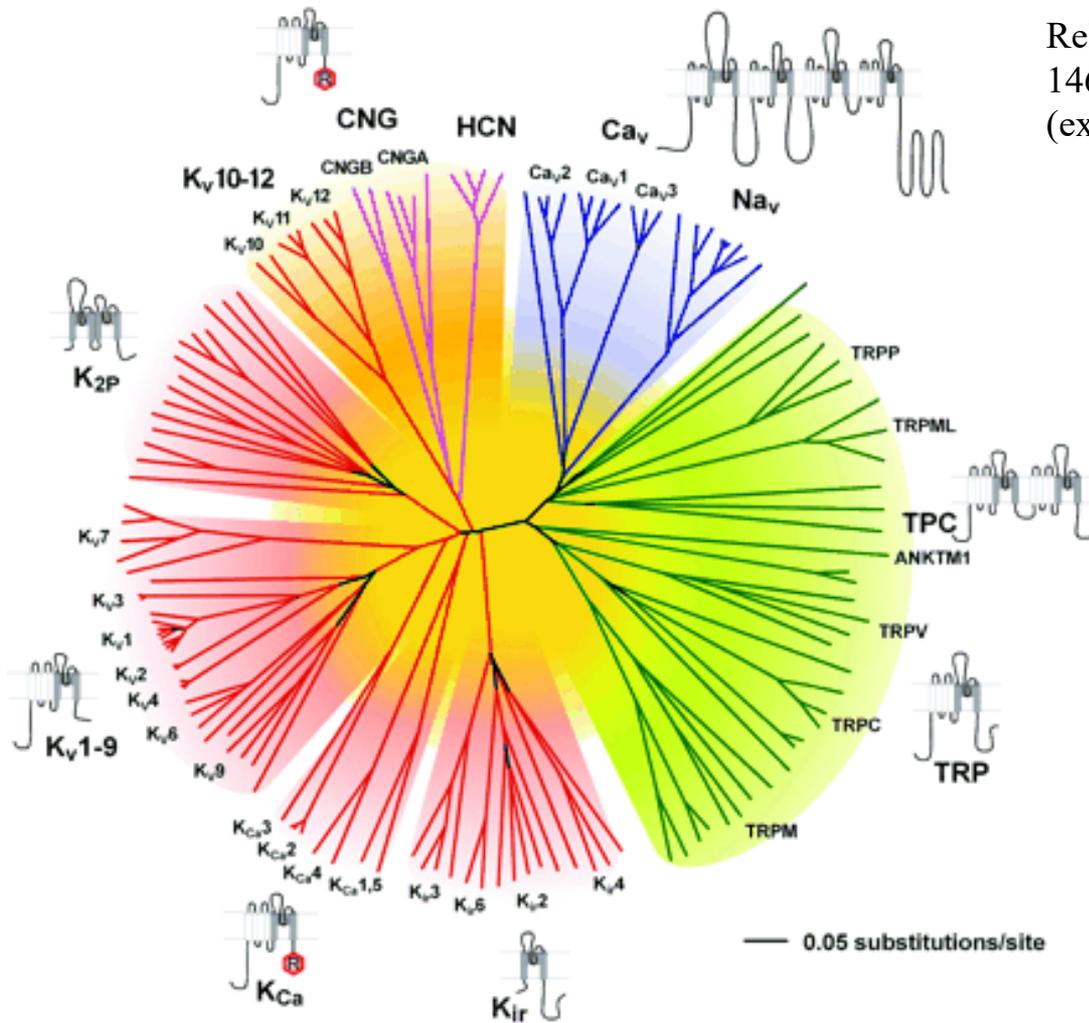
- Sensíveis a voltagem
 - Sódio: geração do potencial de ação (PA), aumento da excitabilidade celular
 - Potássio: repolarização do PA; controle do disparo dos PAs, controle da excitabilidade celular.
 - Cálcio: secreção de neurotransmissores e hormônios; contração muscular, sinalização intracelular
 - Catiônicos: controle da excitabilidade celular (canais tipo HCN)
- Sensíveis a ligantes
 - Catiônicos; neurotransmissão excitatória; sinalização de dor e dano celular; (canais TRPV) transdução de sinal nos fotoreceptores; controle da excitabilidade celular (canais de K sensíveis a ATP).
 - Aniônicos: neurotransmissão inibitória.

Funções fisiológicas dos canais iônicos

- Sensíveis a estímulos físicos
 - Detecção de estiramento celular.
 - Detecção de calor/frio (canais TRPV).
 - Controle do volume celular (canais de cloreto)
 - Transdução do sinal acústico na cóclea.
- Canais de vazamento
 - Controle do potencial de repouso da membrana.
 - Controle da excitabilidade celular.
 - Controle do volume celular (canais de cloreto).
 - Secreção e absorção de íons.

Diversidade de canais iônicos

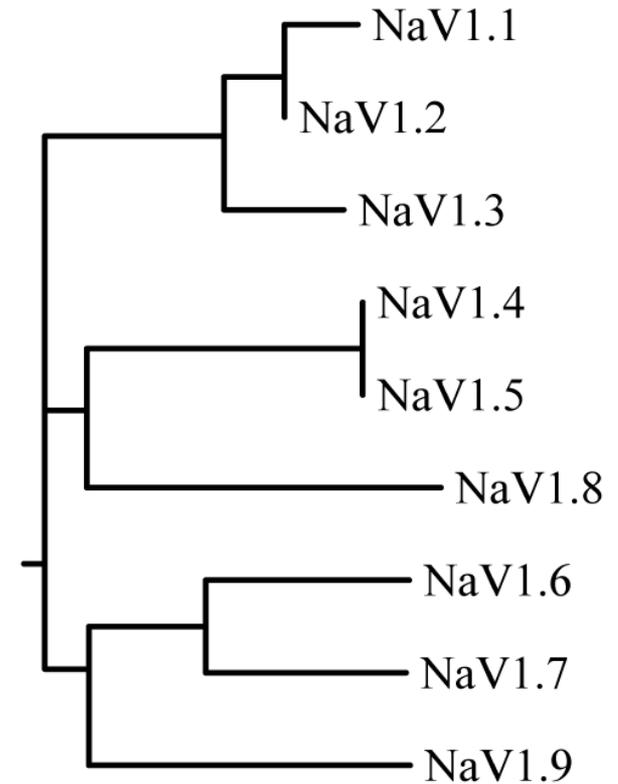
Relação filogenética dos aminoácidos dos 146 genes de canais iônicos de mamíferos (excluindo receptores de neurotransmissores)



Diversidade dos canais de sódio dependentes de voltagem (Na_v)

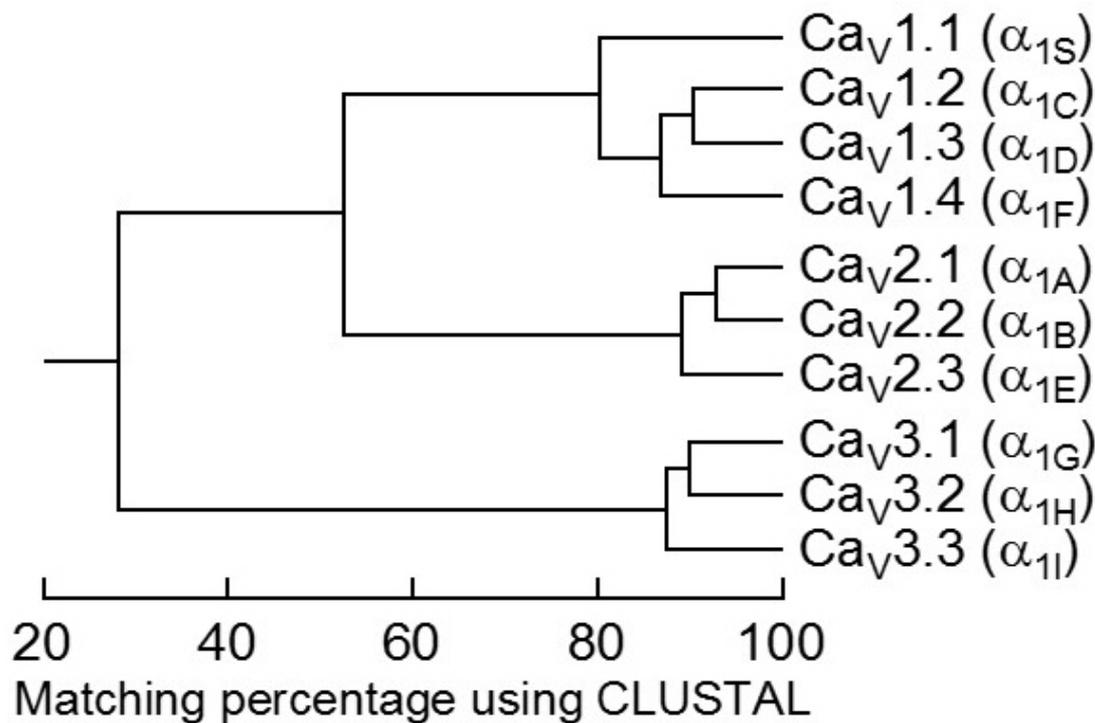
Table 1. Mammalian sodium channel α subunits

Type	Gene symbol	Chromosomal location	Primary tissues
$\text{Na}_v1.1$	<i>SCN1A</i>	Mouse 2 Human 2q24	CNS neurons
$\text{Na}_v1.2$	<i>SCN2A</i>	Mouse 2 Human 2q23–24	CNS neurons
$\text{Na}_v1.3$	<i>SCN3A</i>	Mouse 2 Human 2q24	CNS neurons
$\text{Na}_v1.4$	<i>SCN4A</i>	Mouse 11 Human 17q23–25	SkM
$\text{Na}_v1.5$	<i>SCN5A</i>	Mouse 9 Human 3p21	Uninnervated SkM, heart
$\text{Na}_v1.6$	<i>SCN8A</i>	Mouse 15 Human 12q13	CNS neurons
$\text{Na}_v1.7$	<i>SCN9A</i>	Mouse 2 Human 2q24	PNS neurons
$\text{Na}_v1.8$	<i>SCN10A</i>	Mouse 9 Human 3p22–24	DRG neurons
$\text{Na}_v1.9$	<i>SCN11A</i>	Mouse 9 Human 3p21–24	DRG neurons

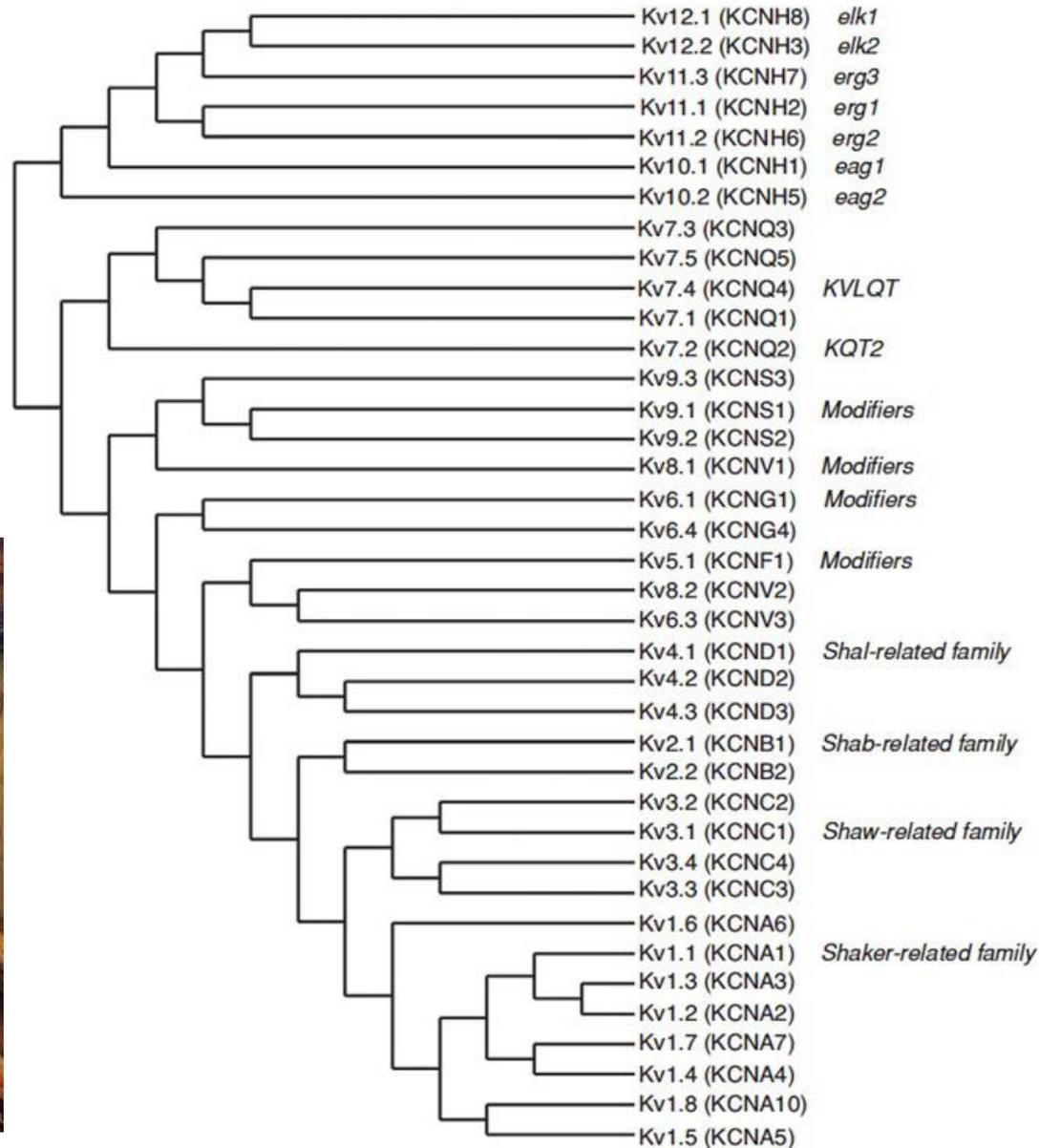


Diversidade dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v)

Channel	Current	Localization	Specific Antagonists*	Cellular Functions
$Ca_v1.1$	L	Skeletal muscle; transverse tubules	Dihydropyridines; phenylalkylamines; benzothiazepines	Excitation-contraction coupling; excitation-transcription coupling
$Ca_v1.2$	L	Cardiac myocytes; smooth muscle myocytes; endocrine cells; neuronal cell bodies; proximal dendrites	Dihydropyridines; phenylalkylamines; benzothiazepines	Excitation-contraction coupling; hormone release; regulation of transcription; synaptic integration
$Ca_v1.3$	L	Endocrine cells; neuronal cell bodies and dendrites; cardiac atrial myocytes and pacemaker cells; cochlear hair cells	Dihydropyridines; phenylalkylamines; benzothiazepines	Hormone release; regulation of transcription; synaptic regulation; cardiac pacemaking; hearing; neurotransmitter release from sensory cells
$Ca_v1.4$	L	Retinal rod and bipolar cells	Dihydropyridines (low affinity)	Neurotransmitter release from photoreceptors
$Ca_v2.1$	P/Q	Nerve terminals and dendrites; neuroendocrine cells	ω -Agatoxin IVA	Neurotransmitter release; dendritic Ca^{2+} transients; hormone release
$Ca_v2.2$	N	Nerve terminals and dendrites; neuroendocrine cells	ω -Conotoxin-GVIA	Neurotransmitter release; dendritic Ca^{2+} transients; hormone release
$Ca_v2.3$	R	Neuronal cell bodies and dendrites	SNX-482	Repetitive firing; dendritic Ca^{2+} transients
$Ca_v3.1$	T	Neuronal cell bodies and dendrites; cardiac and smooth muscle myocytes	None	Pacemaking; repetitive firing
$Ca_v3.2$	T	Neuronal cell bodies and dendrites; cardiac and smooth muscle myocytes	None	Pacemaking; repetitive firing
$Ca_v3.3$	T	Neuronal cell bodies and dendrites	None	Pacemaking; repetitive firing



Diversidade de canais de potássio sensíveis a voltagem (K_v)

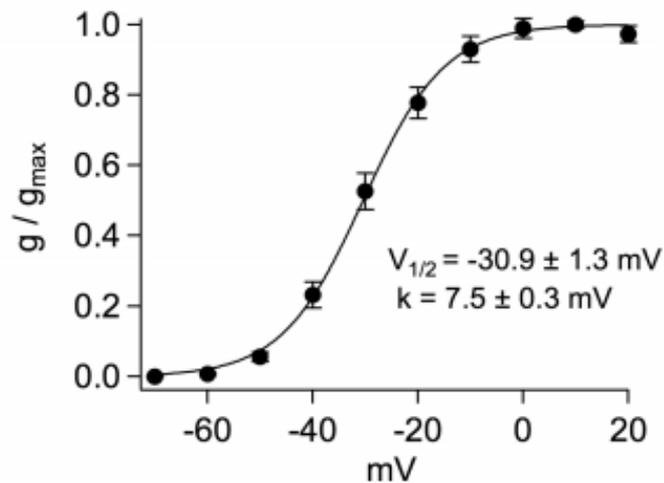
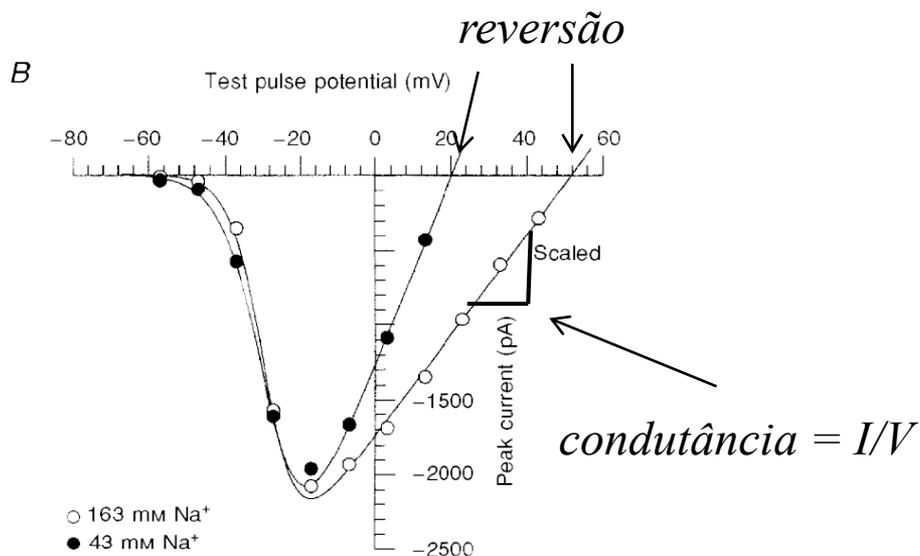
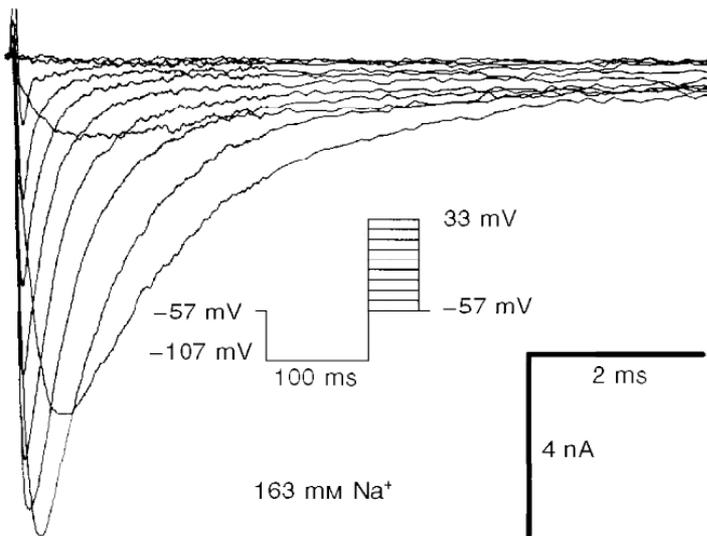


Caracterização dos canais iônicos

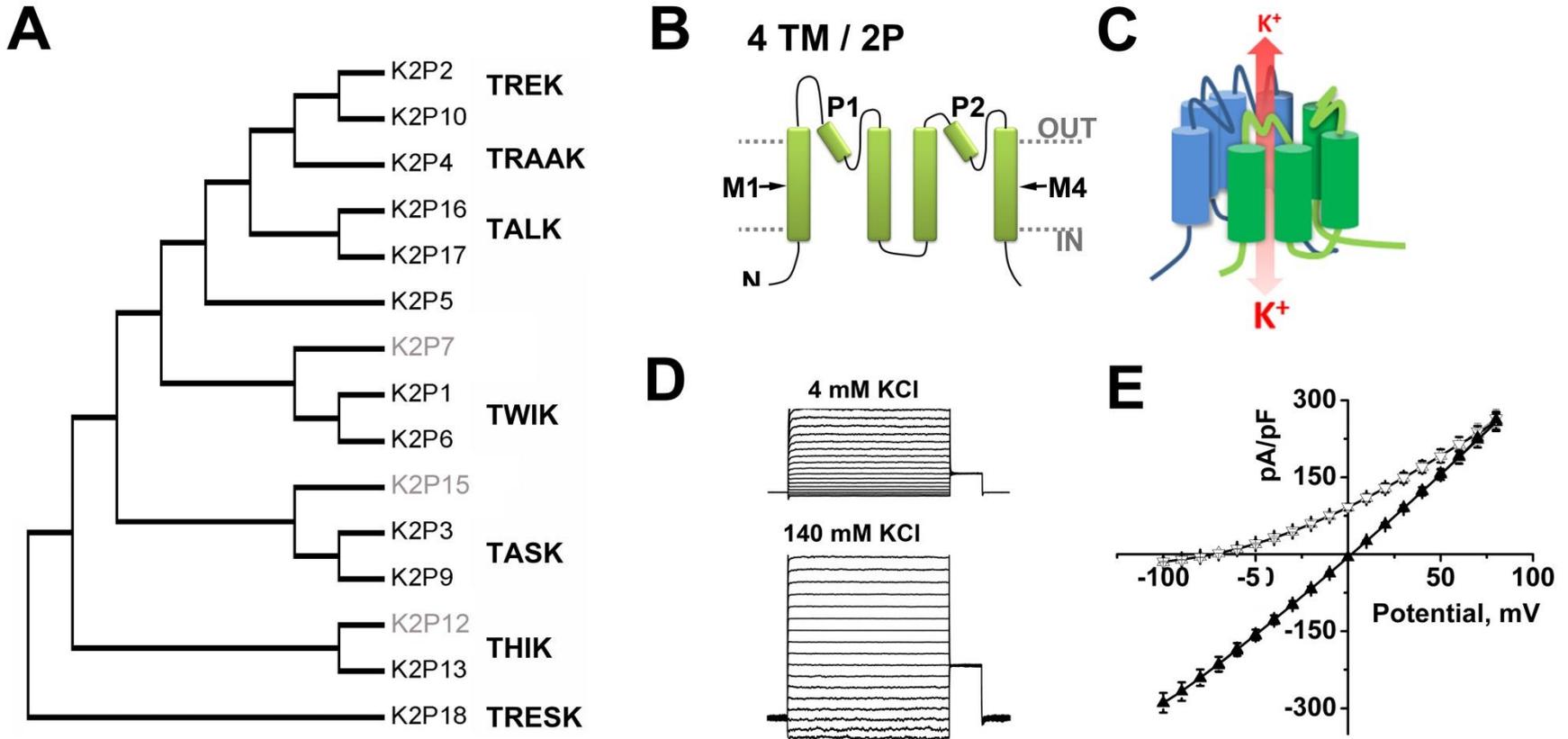
- Biofísica
 - *voltage-clamp (patch-clamp)*
 - dependência de voltagem
 - condutância
 - cinética (ativação, desativação, inativação)
 - seletividade
- Isolamento das diferentes correntes
 - farmacologia
 - uso de bloqueadores específicos para as diferentes condutâncias
 - biofísica
 - inativação de canais iônicos específicos
 - Retificação
 - Reversão das correntes

Dependência de voltagem – canais para sódio

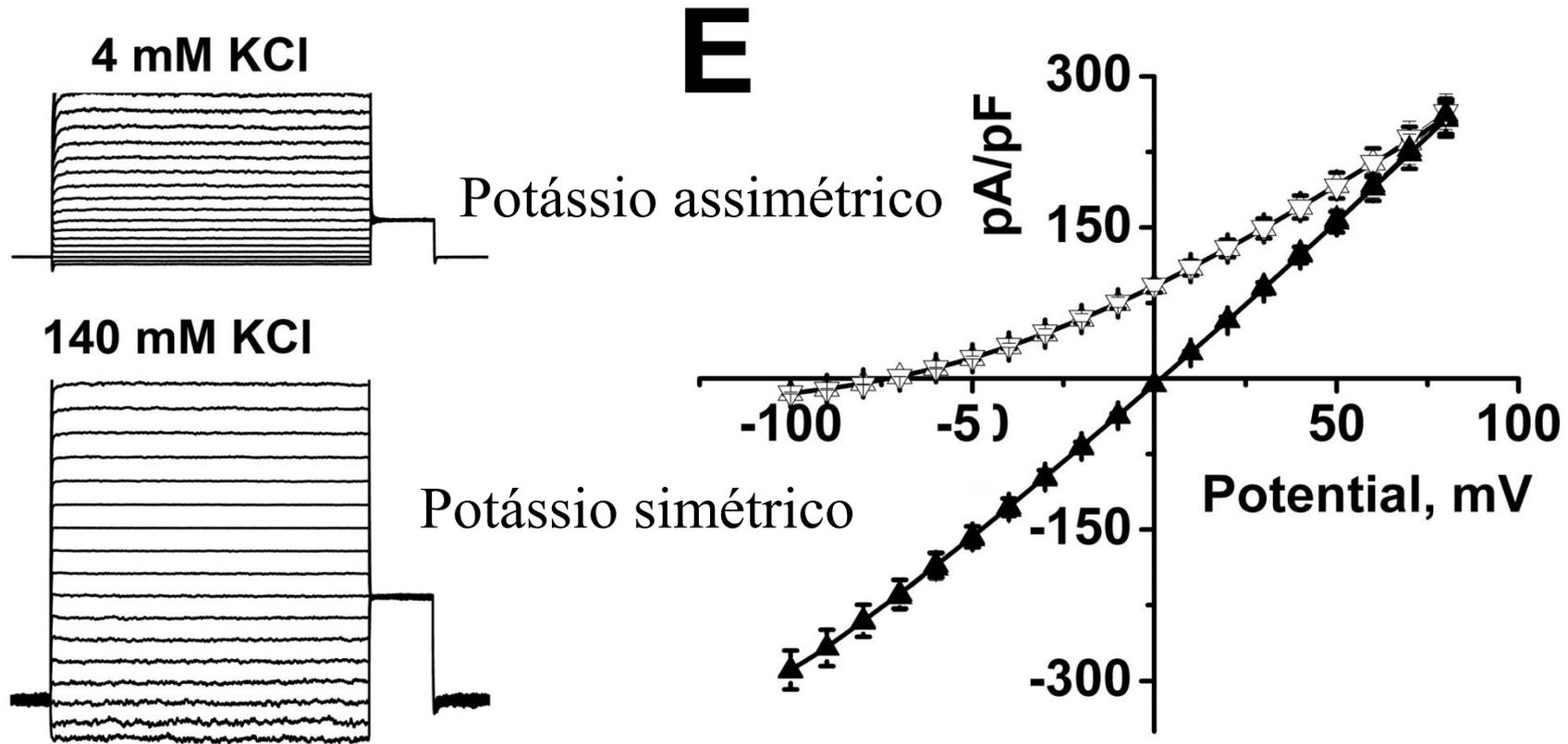
A a



Canais sem dependência de voltagem (de vazamento de potássio K_2P)



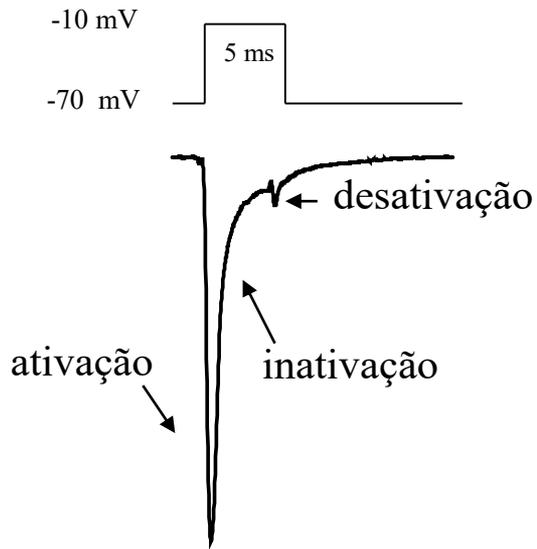
Canais sem dependência de voltagem (de vazamento de potássio K_{2P})



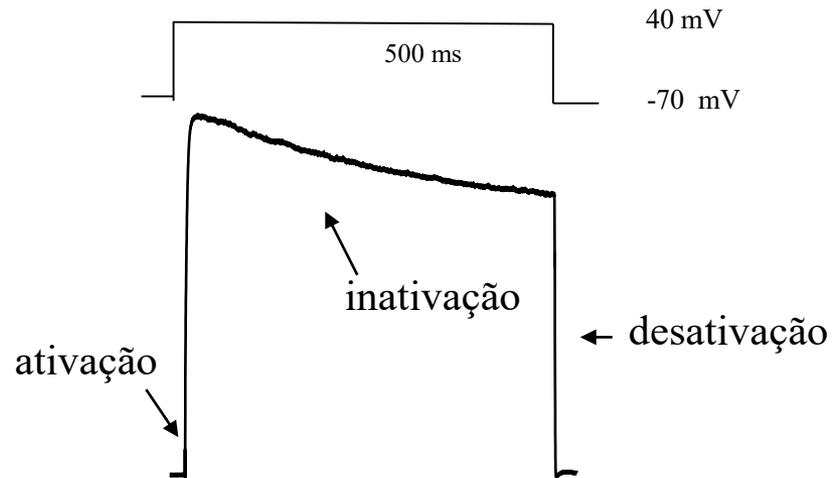
Caracterização biofísica de canais iônicos dependentes de voltagem

ativação/inativação/desativação

corrente de sódio dependente de voltagem



corrente de potássio dependente de voltagem



Caracterização biofísica de canais iônicos

dependentes de voltagem

registros de canais unitários

canais unitários de sódio de músculo esquelético registrados em *cell-attached*

Probabilidade de abertura (P_o)

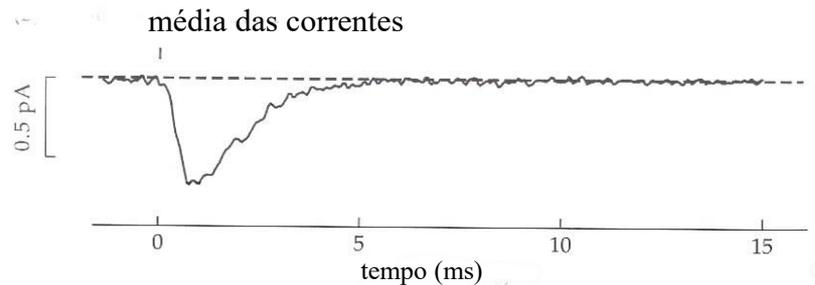
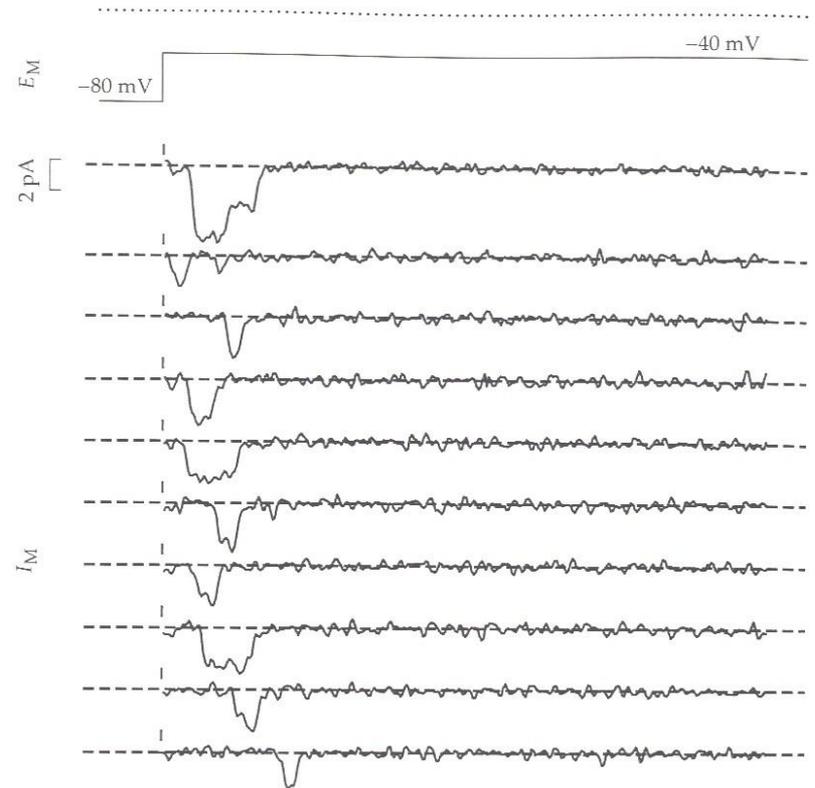
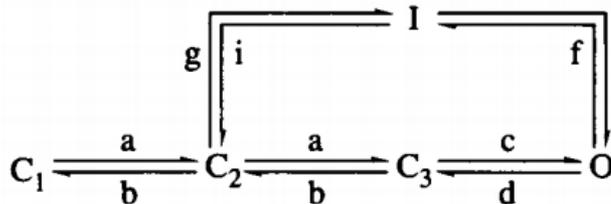
modelo cinético



C = fechado

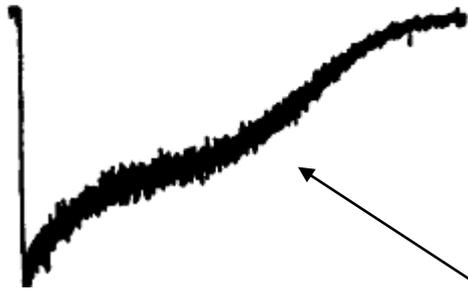
O = aberto

I = inativado



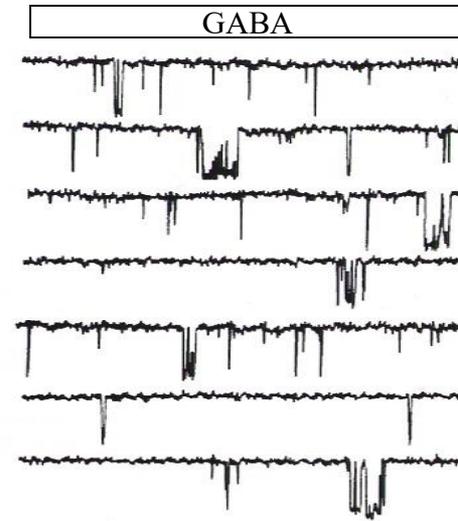
Caracterização biofísica de canais iônicos ativados por ligantes

GABA, 50 μM

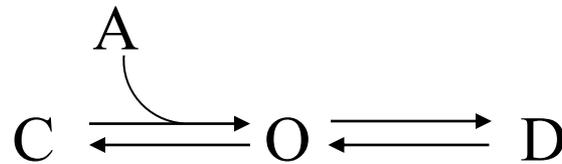


dessensibilização

whole cell



outside-out



A = agonista

C = fechado

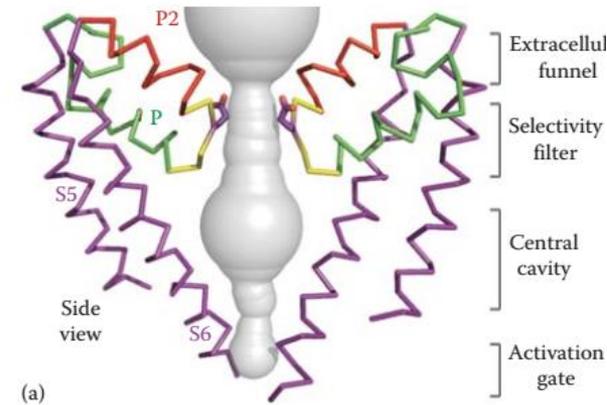
O = aberto

D = dessensibilizado

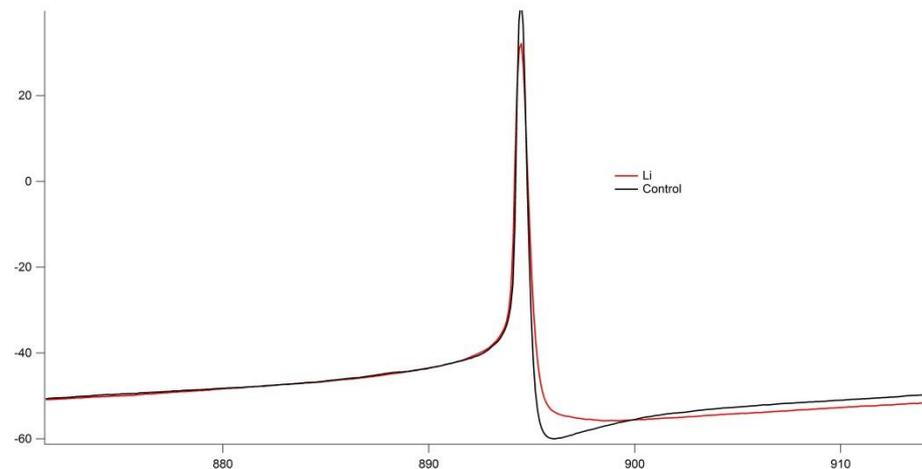
Seletividade iônica

O filto de seletividade pode funcionar como um funil

Li^+ (0.60) 60	Be^{2+} (0.31) 31	O^{2-} (1.40) 140	F^- (1.36) 136
Na^+ (0.95) 95	Mg^{2+} (0.65) 65	S^{2-} (1.84) 184	Cl^- (1.81) 181
K^+ (1.33) 133	Ca^{2+} (0.99) 99	Se^{2-} (1.98) 198	Br^- (1.95) 195
Rb^+ (1.48) 148	Sr^{2+} (1.13) 113	In^{3+} (0.81) 81	Te^{2-} (2.21) 221
		Sn^{4+} (0.71) 71	I^- (2.16) 216
		Sb^{5+} (0.62) 62	



Potencial de ação de Lítio



Seletividade iônica

A seletividade não é necessariamente por efeito funil

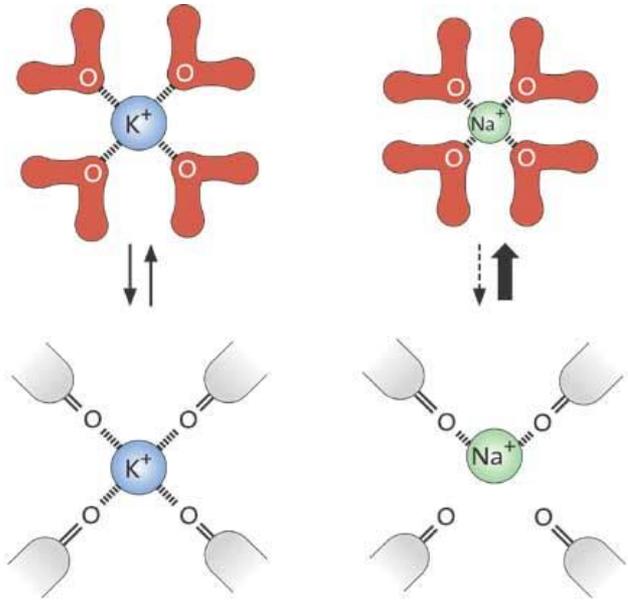
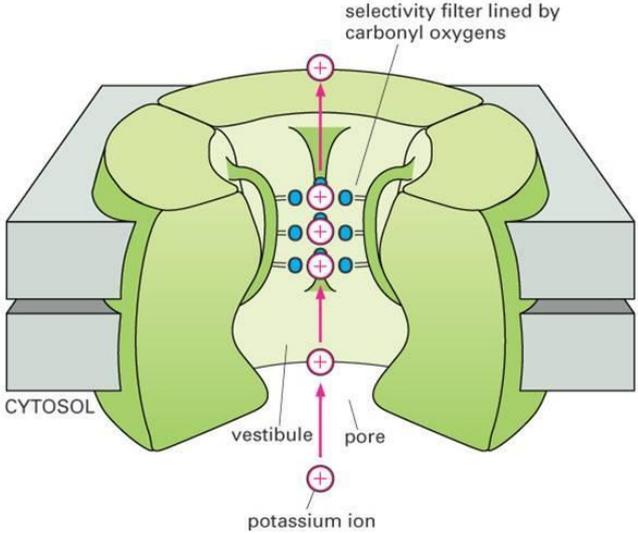
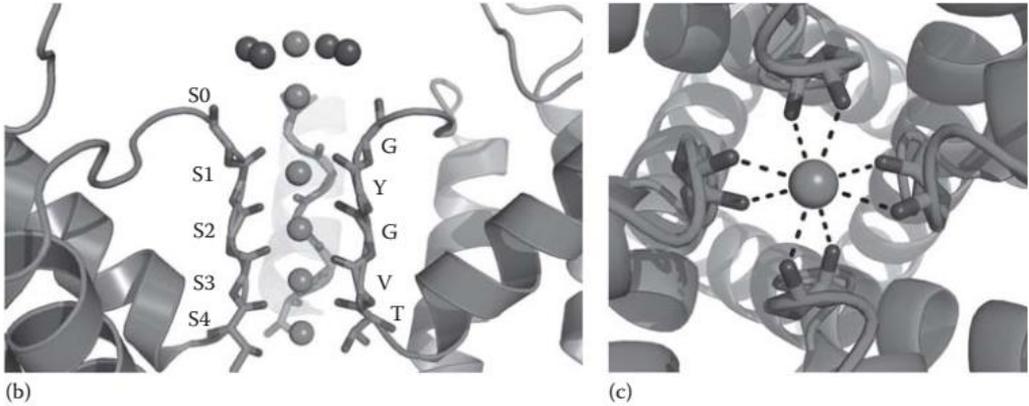
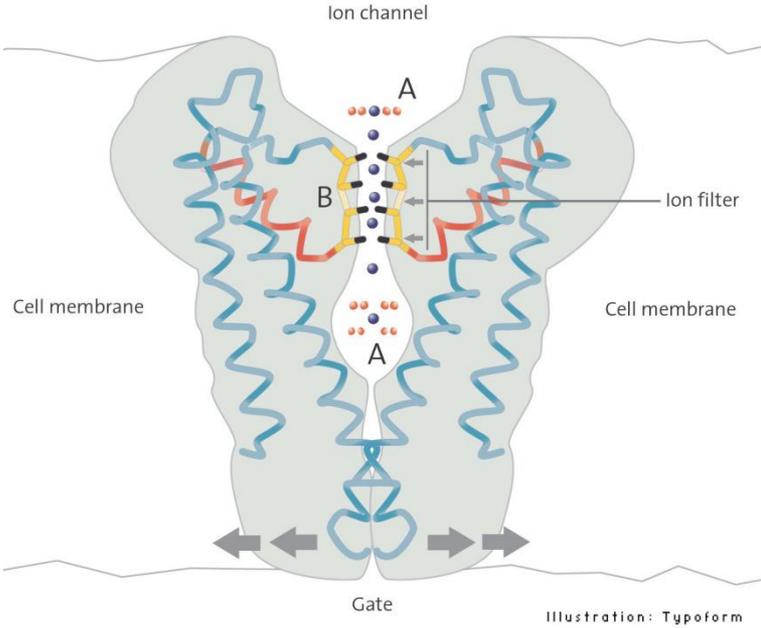


Li ⁺ (0.60) 60	Be ²⁺ (0.31) 31	O ²⁻ (1.40) 140	F ⁻ (1.36) 136			
Na ⁺ (0.95) 95	Mg ²⁺ (0.65) 65	Al ³⁺ (0.50) 50	S ²⁻ (1.84) 184	Cl ⁻ (1.81) 181		
K ⁺ (1.33) 133	Ca ²⁺ (0.99) 99	Ga ³⁺ (0.62) 62	Se ²⁻ (1.98) 198	Br ⁻ (1.95) 195		
Rb ⁺ (1.48) 148	Sr ²⁺ (1.13) 113	In ³⁺ (0.81) 81	Sn ⁴⁺ (0.71) 71	Sb ⁵⁺ (0.62) 62	Te ²⁻ (2.21) 221	I ⁻ (2.16) 216

Porque o sódio não permeia o canal de potássio?

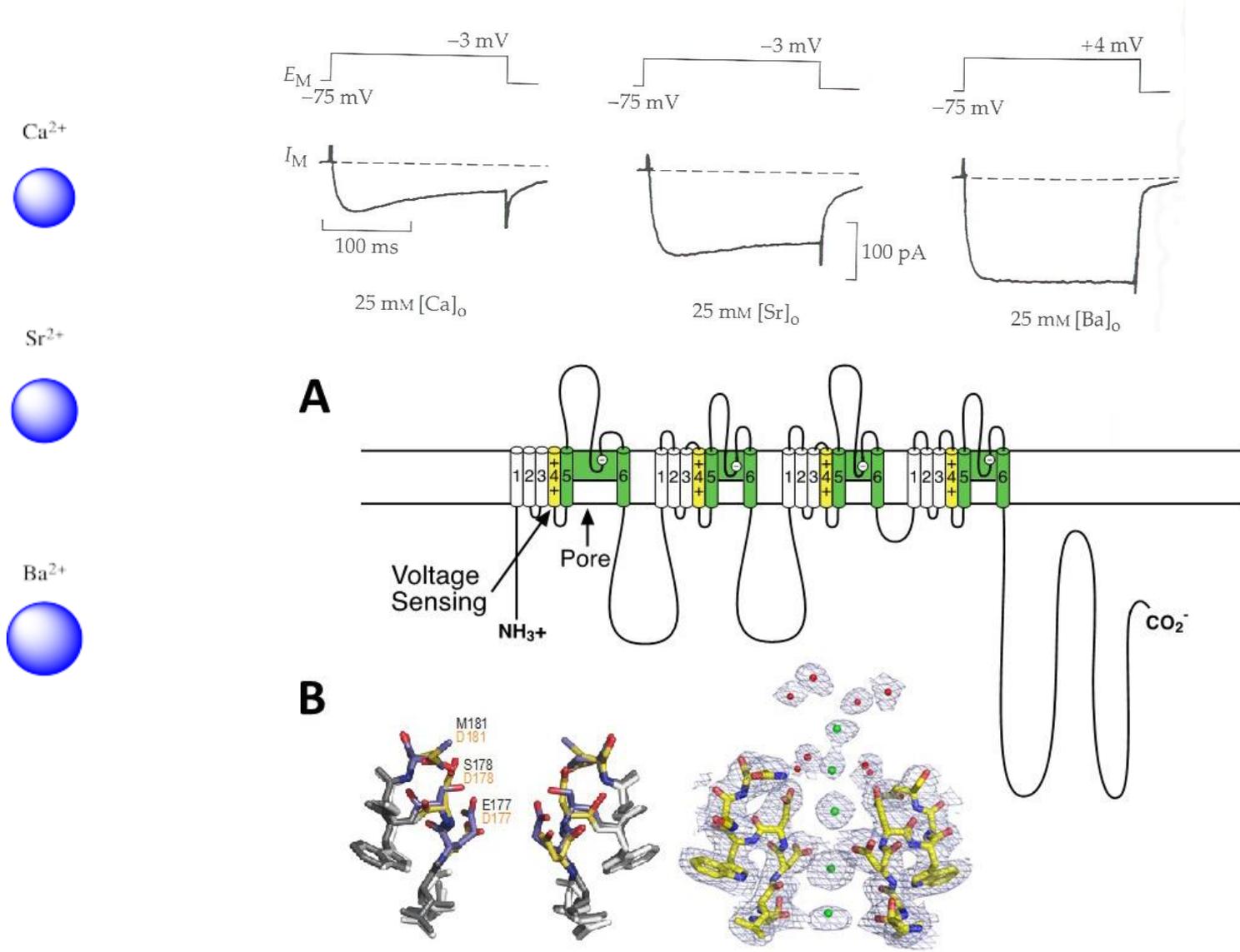
Interação do íon potássio com a parede do canal.

Filtro de seletividade



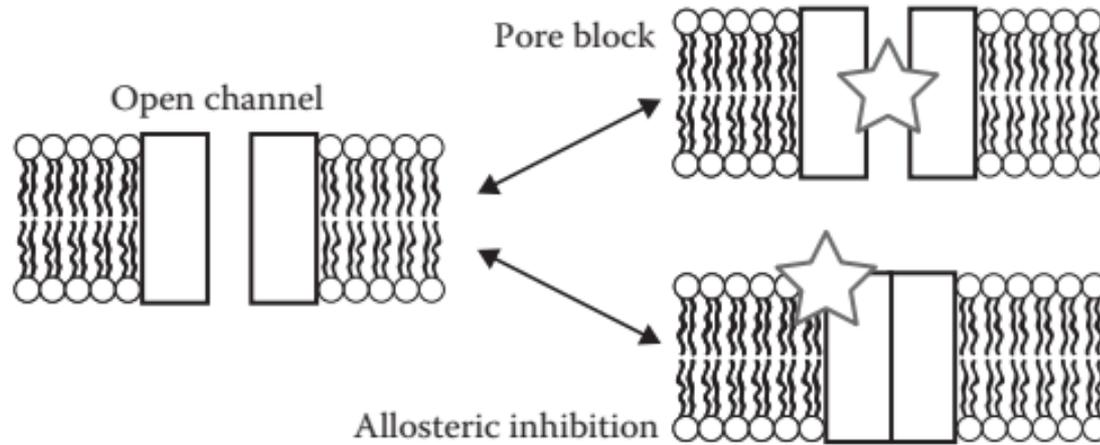
Seletividade e permeabilidades iônicas

Na ausência de cálcio, bário e estrôncio permeiam melhor o canal de cálcio



Caracterização farmacológica

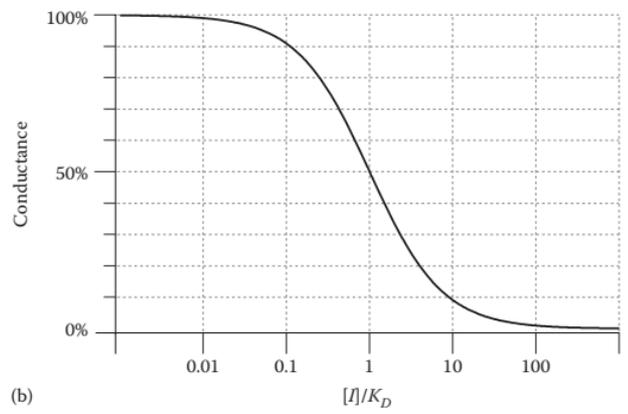
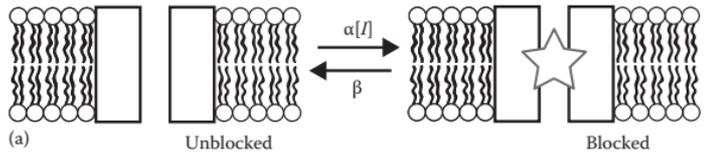
Antagonistas



Bloqueio dos canais de potássio KcsA

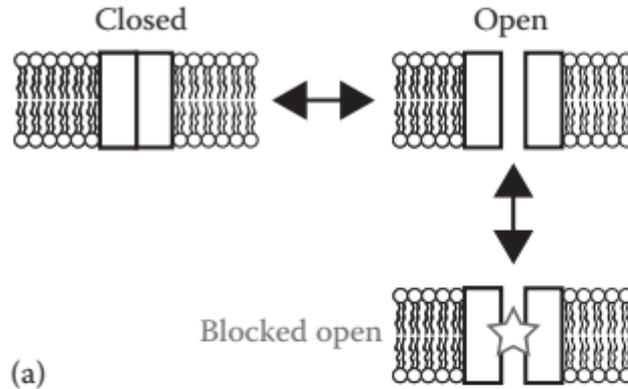


(a) Tetrabutylamonio
 (b) Carbidotoxina
 (c) Bário

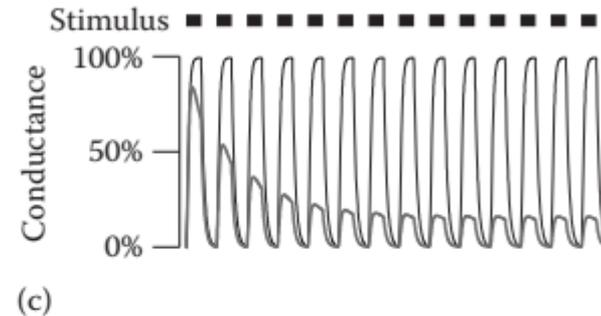


$$\text{Conductance} = \frac{f_{unblocked}}{f_{unblocked} + f_{blocked}} = \frac{1}{1 + ([I]/K_D)}$$

Bloqueio de canal aberto (dependente de uso)

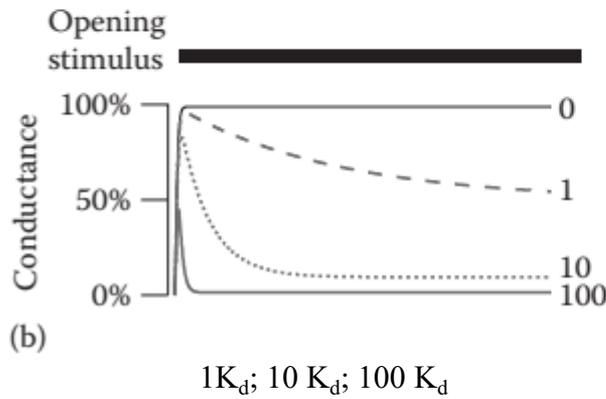


(a)

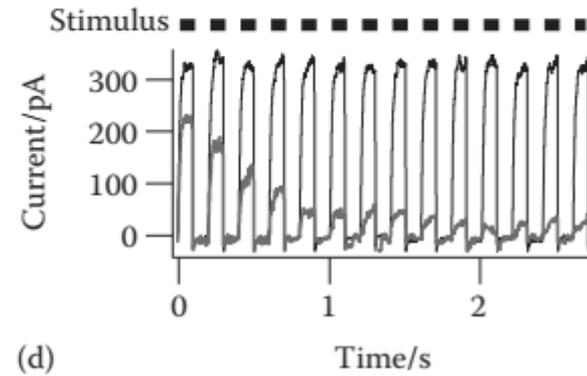


(c)

modelo



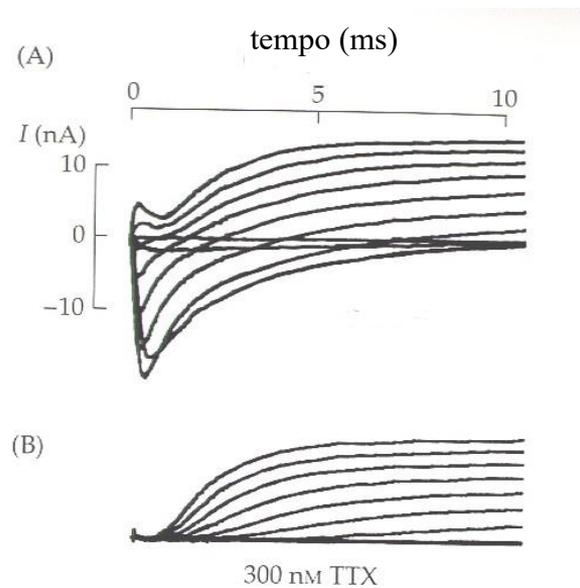
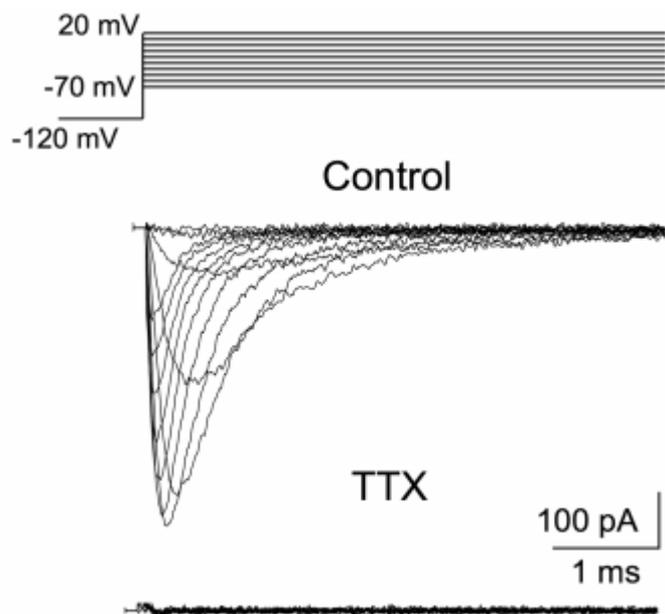
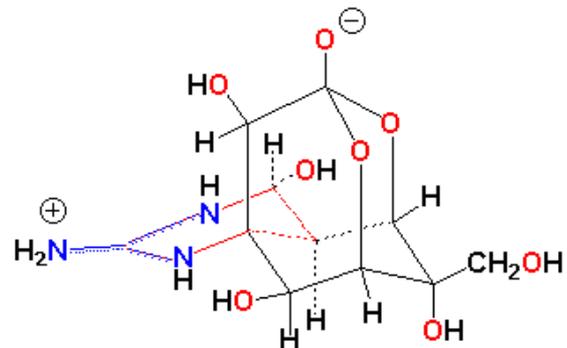
(b)



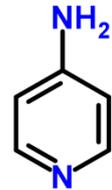
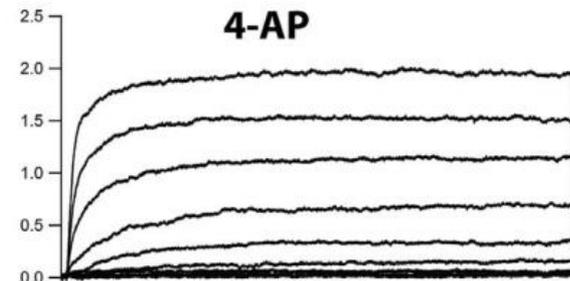
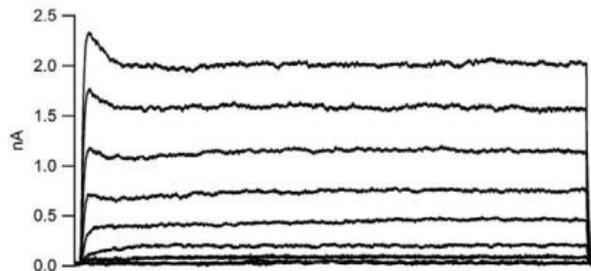
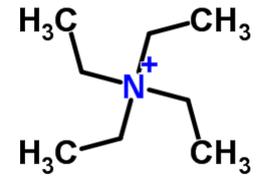
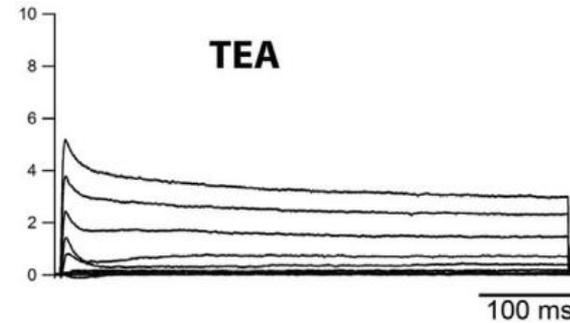
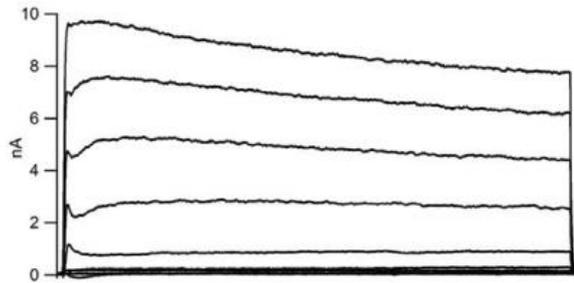
(d)

real

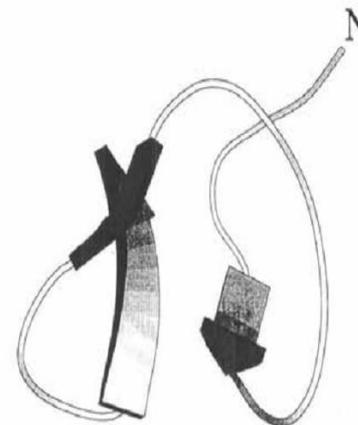
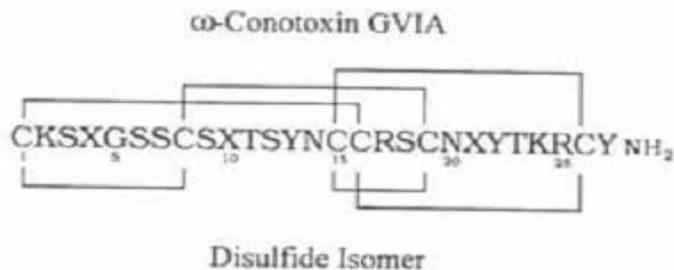
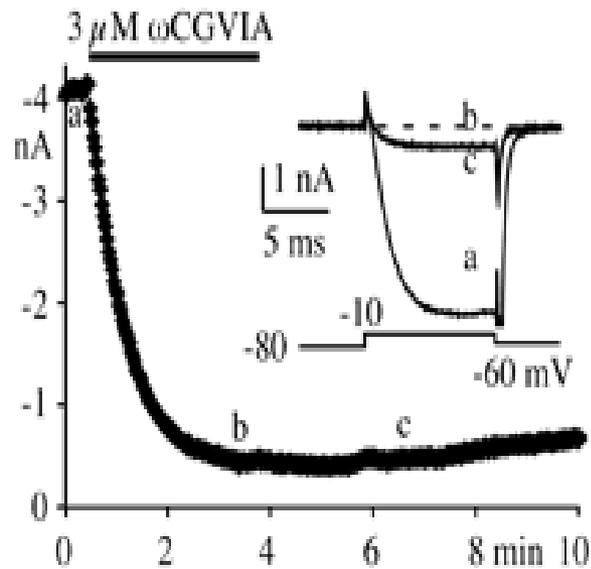
Bloqueio de canais de sódio dependentes de potencial pela tetrodotoxina (TTX)



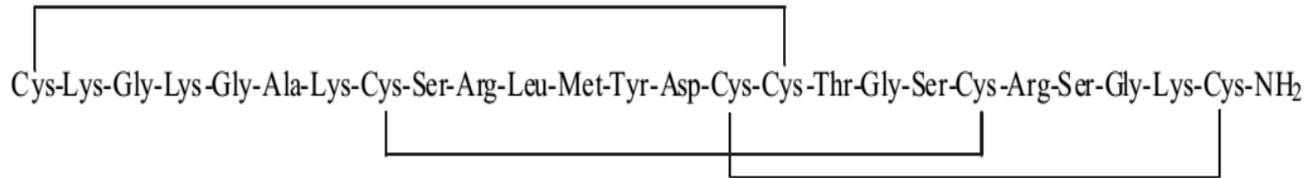
Bloqueio dos canais de potássio dependentes de potencial pelo tetraetilamônio (TEA) externo e 4-Aminopiridina (4-AP)



As omega-conotoxinas, presentes no veneno dos moluscos do genero *Conus*, inibem vários canais de cálcio voltagem-dependentes



Ziconotide (SNX-111), é a forma sintética da omega conotoxina MVIIA que é usada clinicamente para tratamento de dor crônica resistente a morfina



Current Medicinal Chemistry, 2004, 11, 3029-3040

3029

Ziconotide: Neuronal Calcium Channel Blocker for Treating Severe Chronic Pain

G.P. Miljanich*

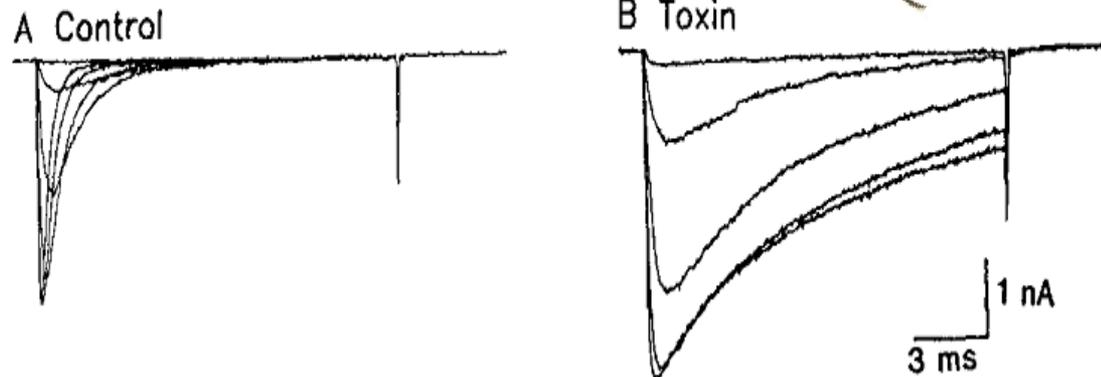
Elan Pharmaceuticals, Inc., 7475 Lusk Boulevard, San Diego, CA, 92121, USA



As toxinas alfa de escorpião inibem a inativação dos canais de sódio voltage-dependentes

Modification of Na Channel Gating
by an α Scorpion Toxin
from *Tityus serrulatus*

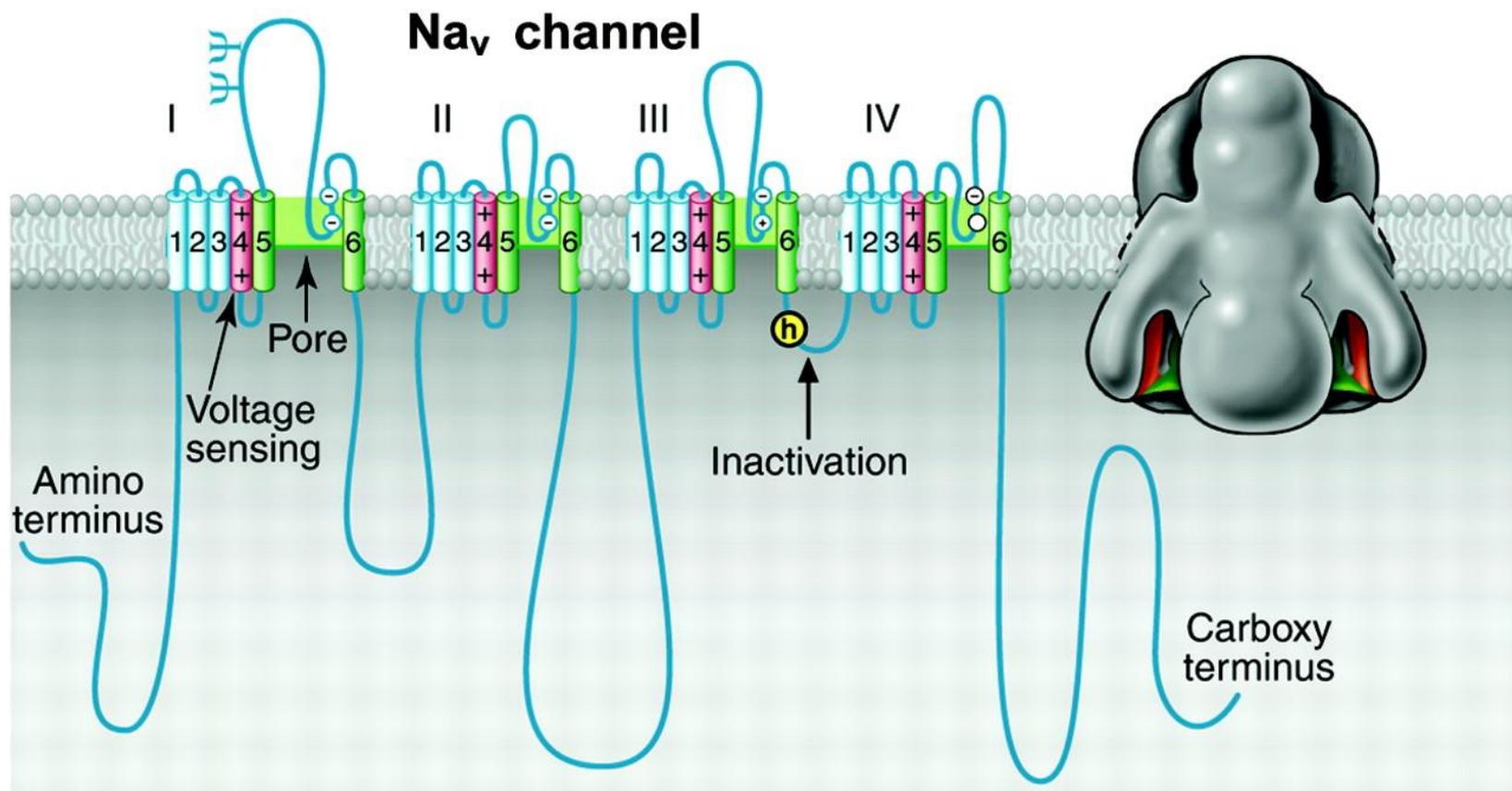
G. E. KIRSCH, A. SKATTEBØL, L. D. POSSANI, and A. M. BROWN



Caracterização bioquímica

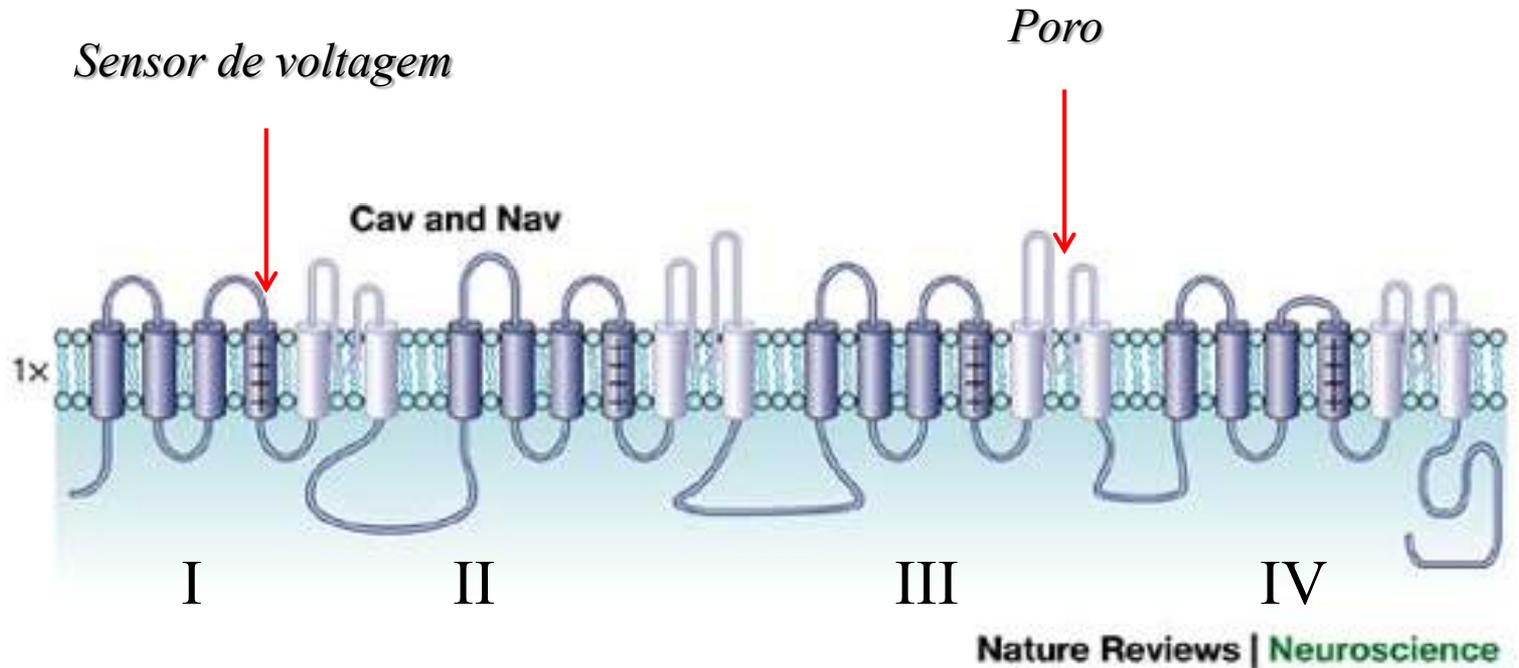
- Purificação e identificação das subunidades
- Reconstrução das subunidades em membranas lipídicas artificiais
 - registro eletrofisiológico
- Sequenciamento do DNA
 - determinação da sequência de aminoácidos
 - determinação do perfil hidropático e das possíveis estruturas transmembrana
 - identificação de sítios de fosforilação, sialização
- Expressão do DNA em sistemas heterólogos
 - oócitos de *Xenopus* (injeção de mRNA)
 - células de mamíferos (expressão de plasmídeos)
 - registro eletrofisiológico
- Mutagênese sítio-dirigida

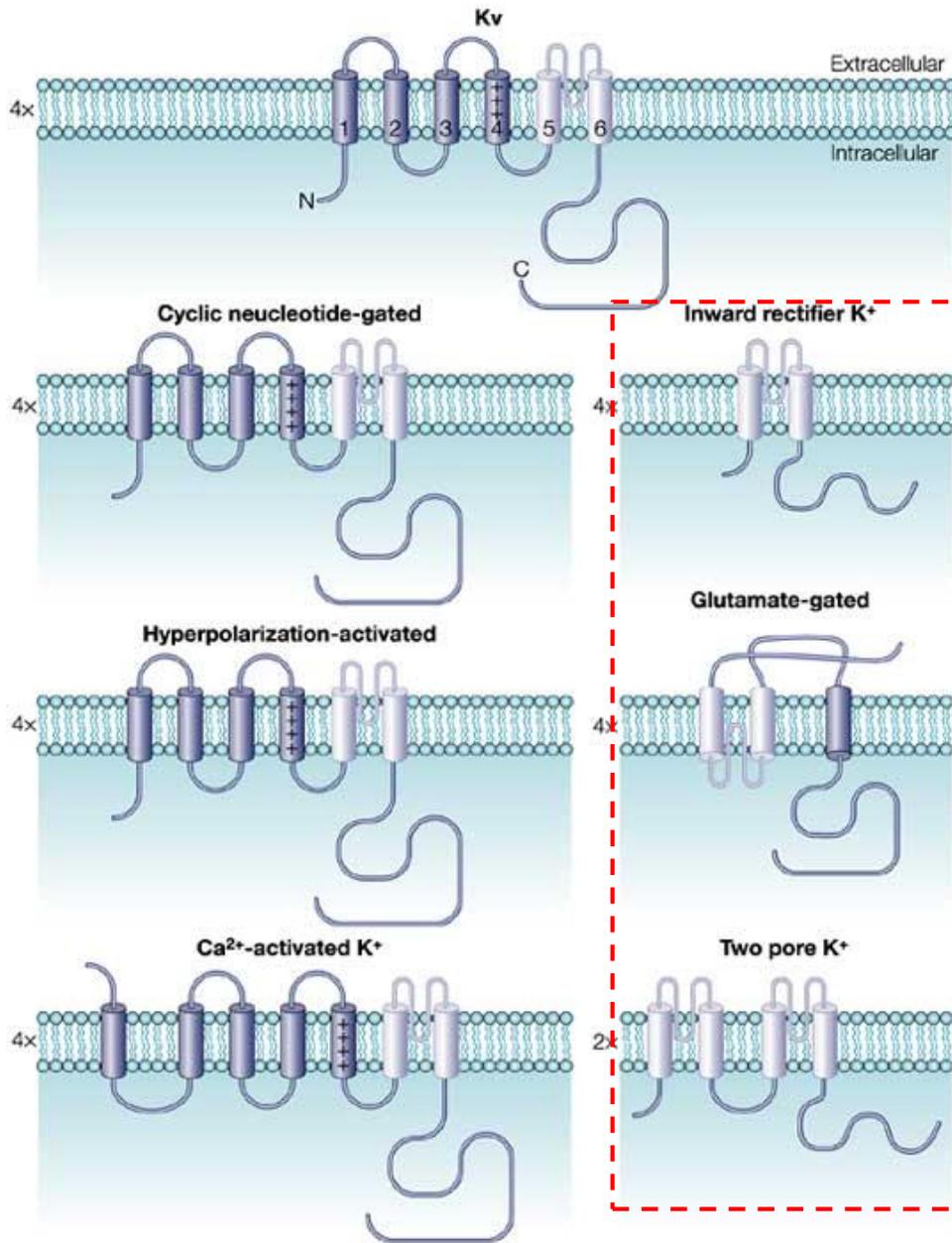
Estrutura do Na_v



Estrutura dos canais iônicos

Canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem possuem 4 domínios com 6 segmentos transmembrana



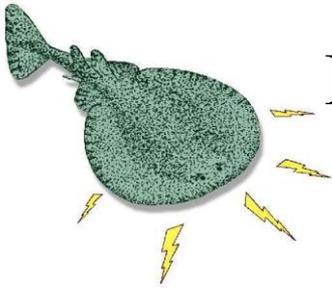


Outros canais iônicos possuem 1 domínio com 6 ou menos segmentos transmembrana, e formam tetrâmeros ou dímeros (K2P)

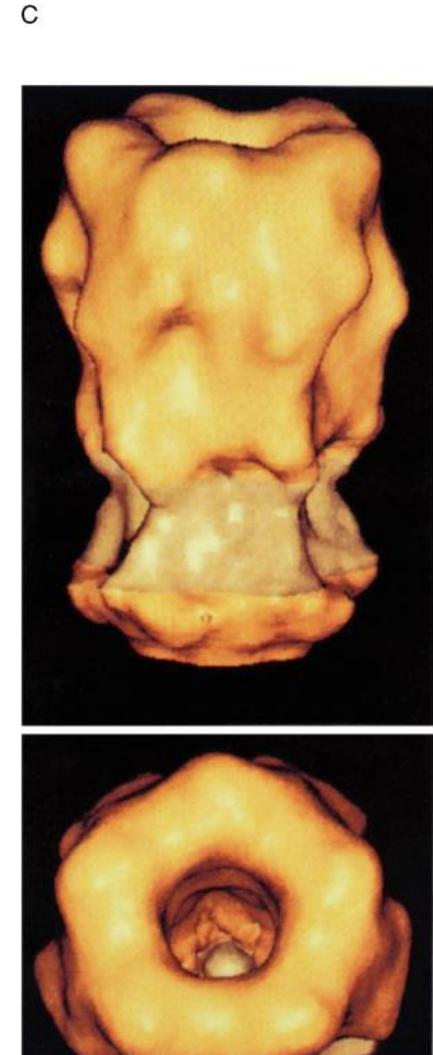
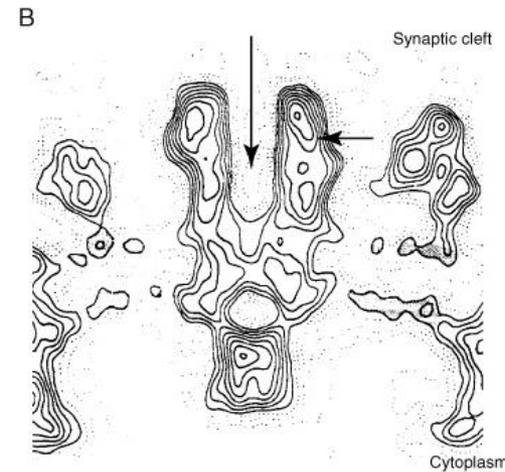
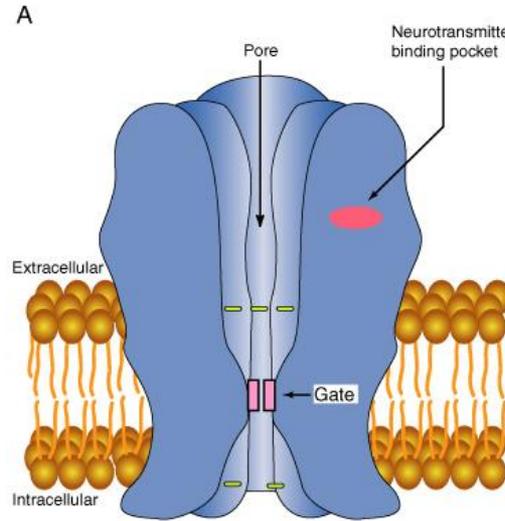
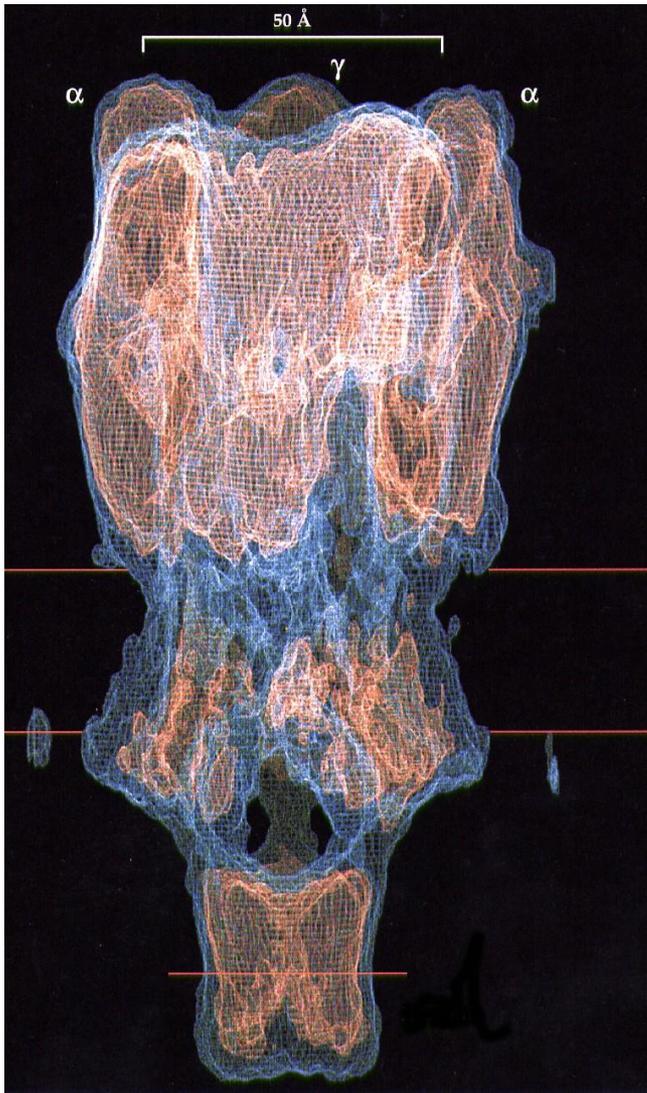
Canais sem dependência de potencial

Determinação da estrutura da proteína

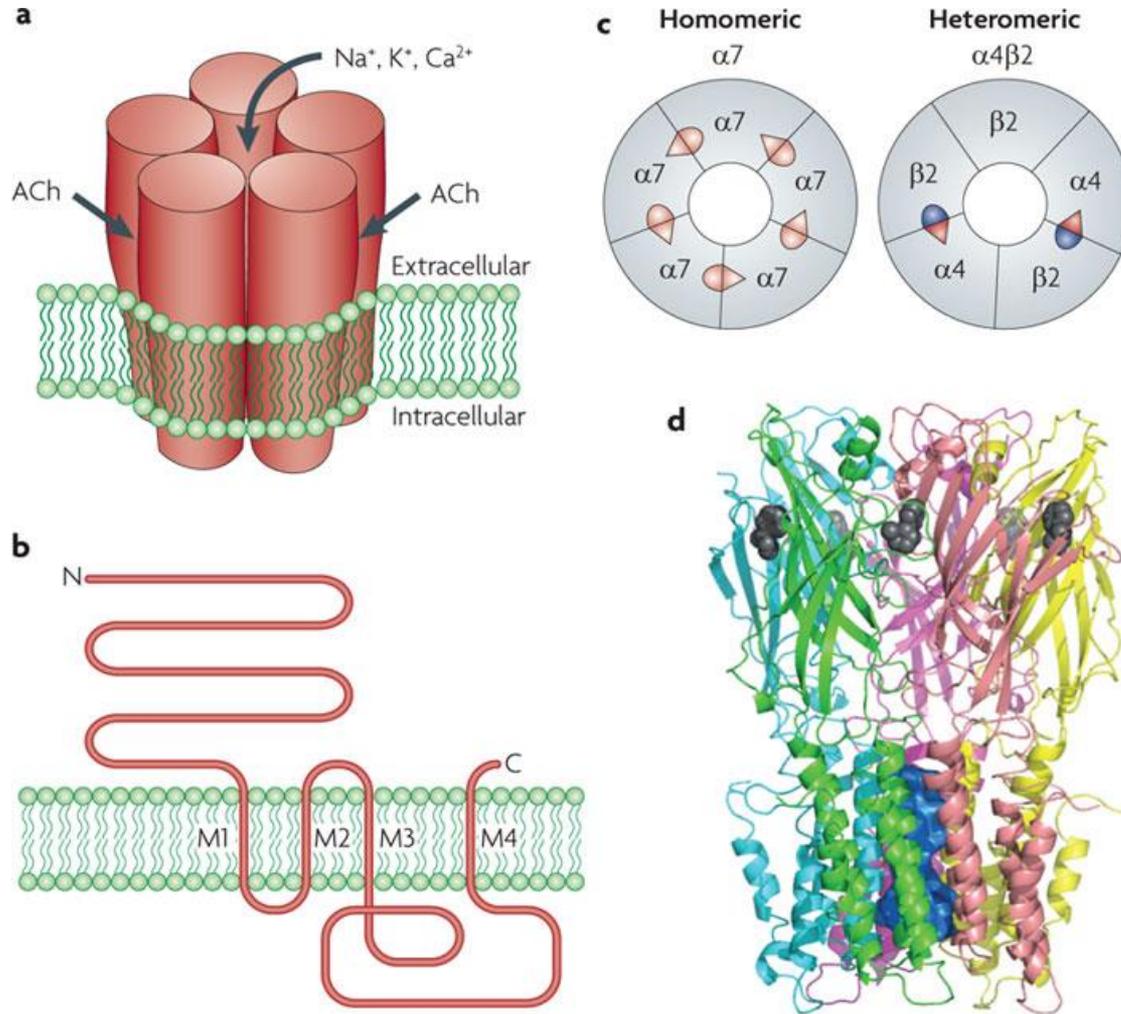
- Cristalografia e determinação da estrutura por difração de raios-X
 - KcsA e mThK- canais de potássio bacterianos
 - MscL - canal mecanossensitivo bacteriano
 - NaVb- canal de sódio bacteriano
 - Kv1.2 – canal de potássio sensível a voltagem de mamíferos
 - GIRK – canal de potássio ativado por proteínas G
- Microscopia eletrônica
 - receptor nicotínico de acetilcolina
 - Canal de sódio dependente de voltagem
 - HCN1 – canal de cátions ativado por hiperpolarização.



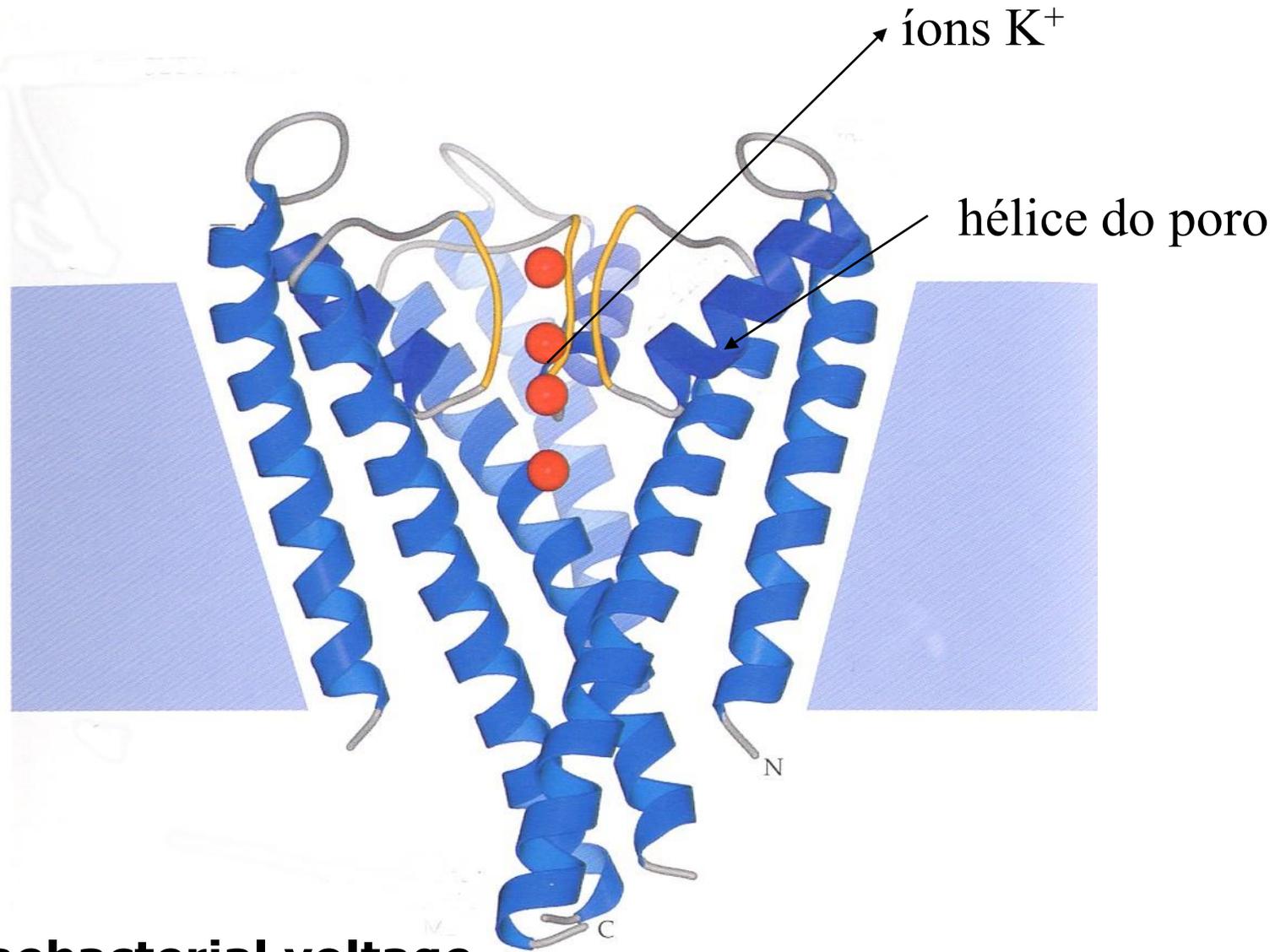
Reconstrução do receptor nicotínico de acetilcolina por microscopia eletrônica



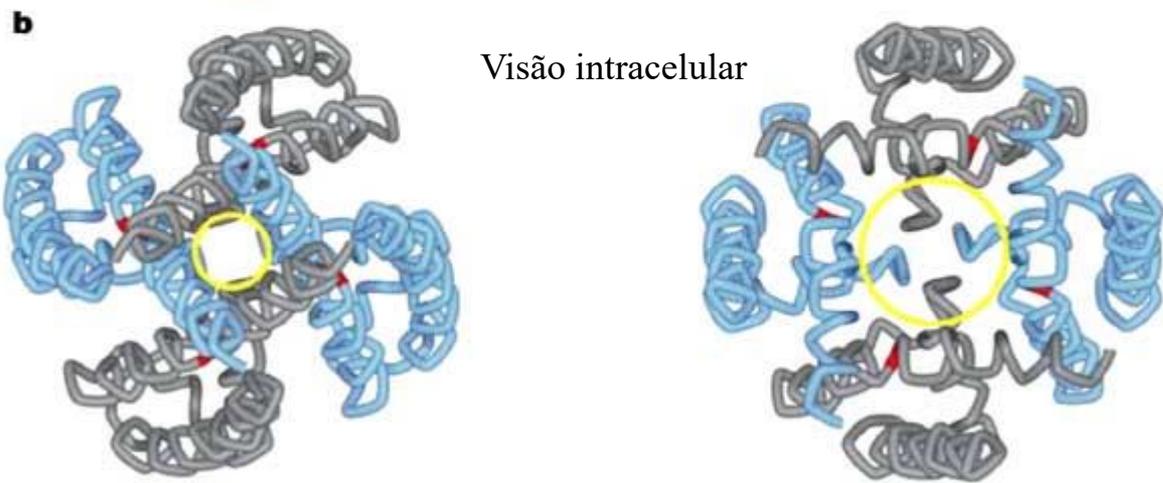
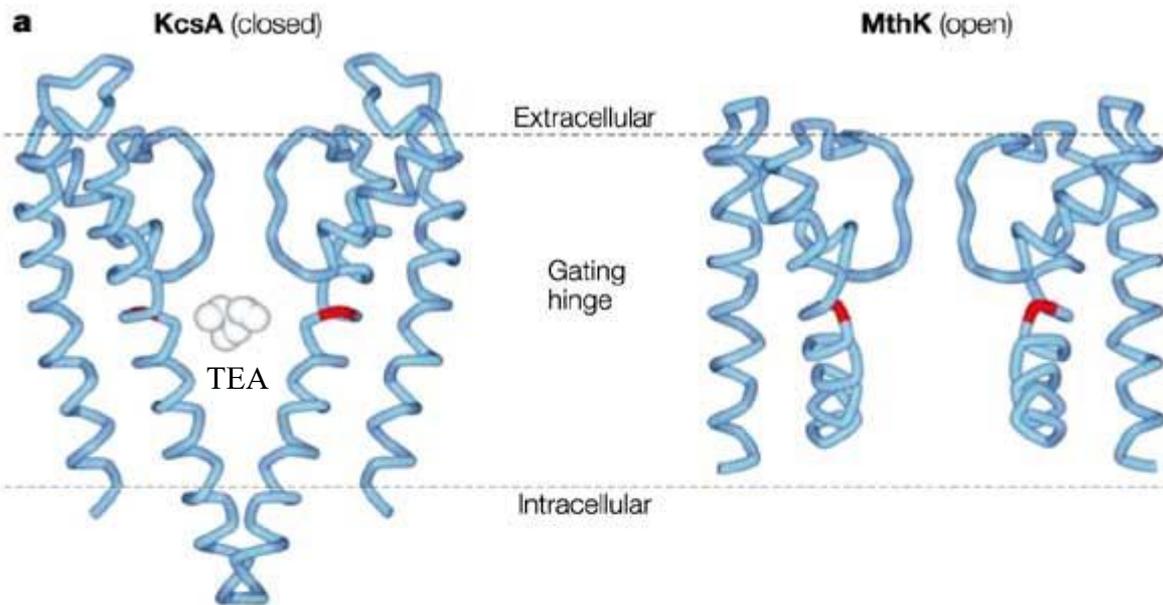
O receptor colinérgico é um pentâmero homo ou heteromérico



Estrutura do KcsA



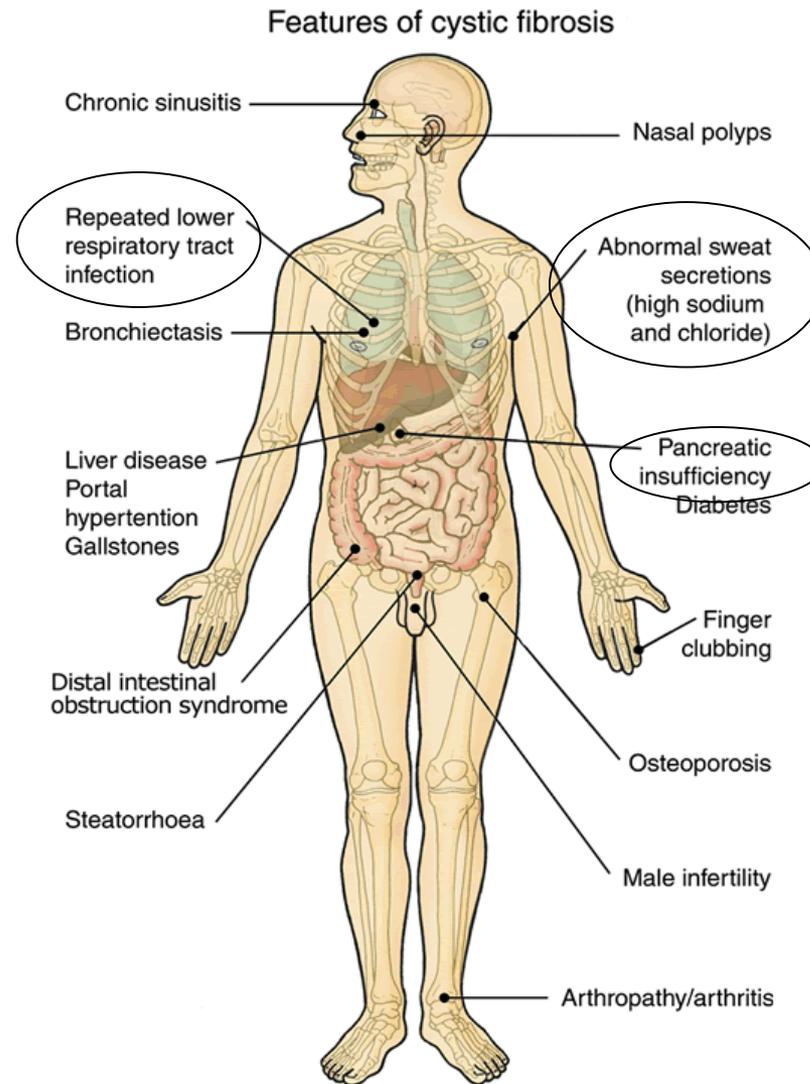
archaeobacterial voltage-activated K^+ (Kv) channel



Canalopatias

Patologias relacionadas a mutações
em canais iônicos

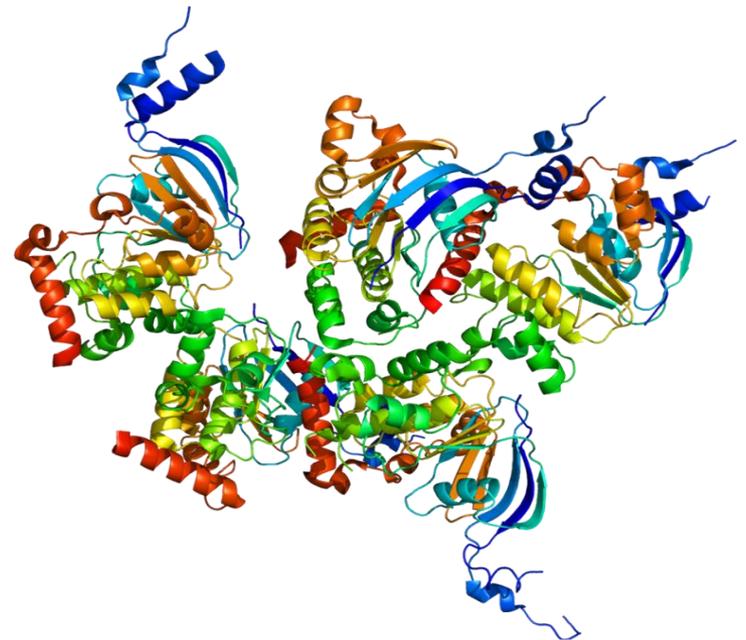
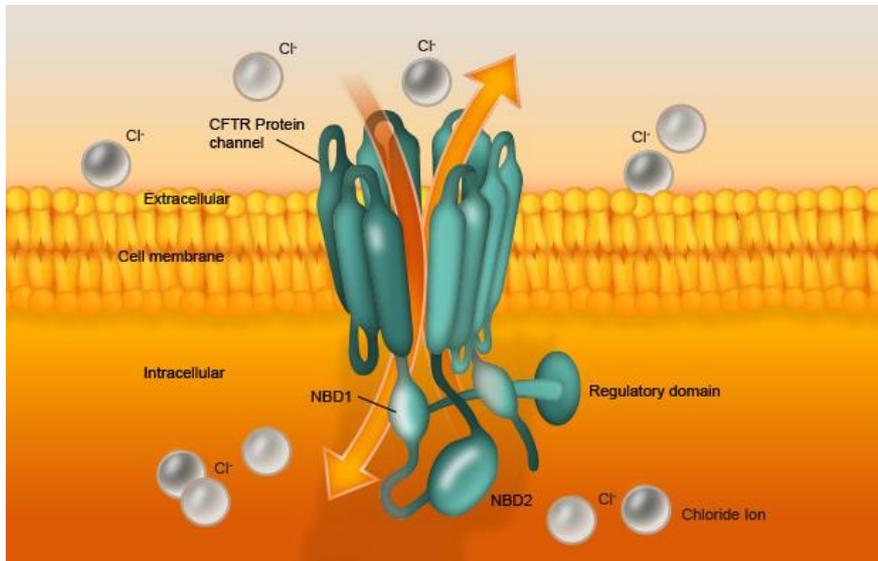
A FIBROSE CÍSTICA É UMA CANALOPATIA



A FIBROSE CÍSTICA É CAUSADA POR UM DEFEITO EM UM CANAL PARA CLORETO EPITELIAL.

Foi a primeira canalopatia de origem genética a ser identificada.

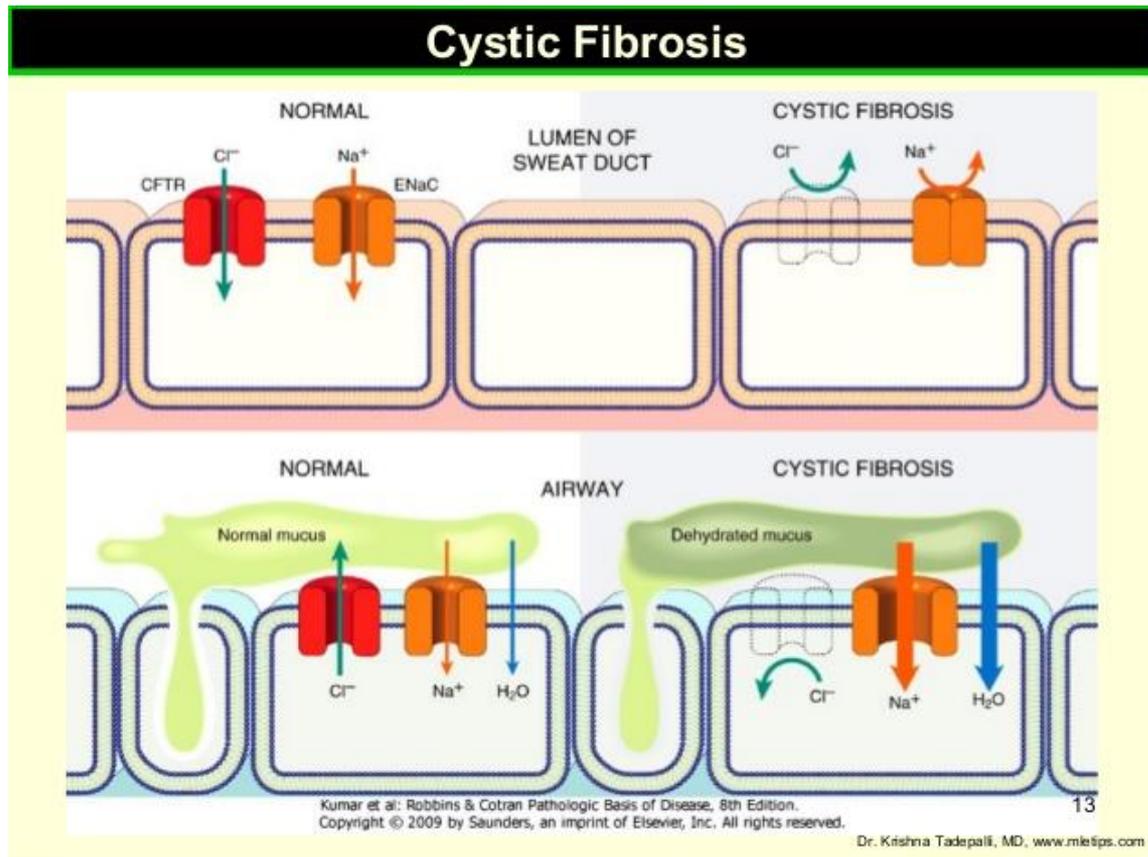
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)



A FIBROSE CÍSTICA É CAUSADA POR UM DEFEITO EM UM CANAL PARA CLORETO EPITELIAL.

Foi a primeira canalopatia de origem genética a ser identificada.

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)



Muitas canalopatias afetam o Sistema Nervoso e Neuromuscular

1824

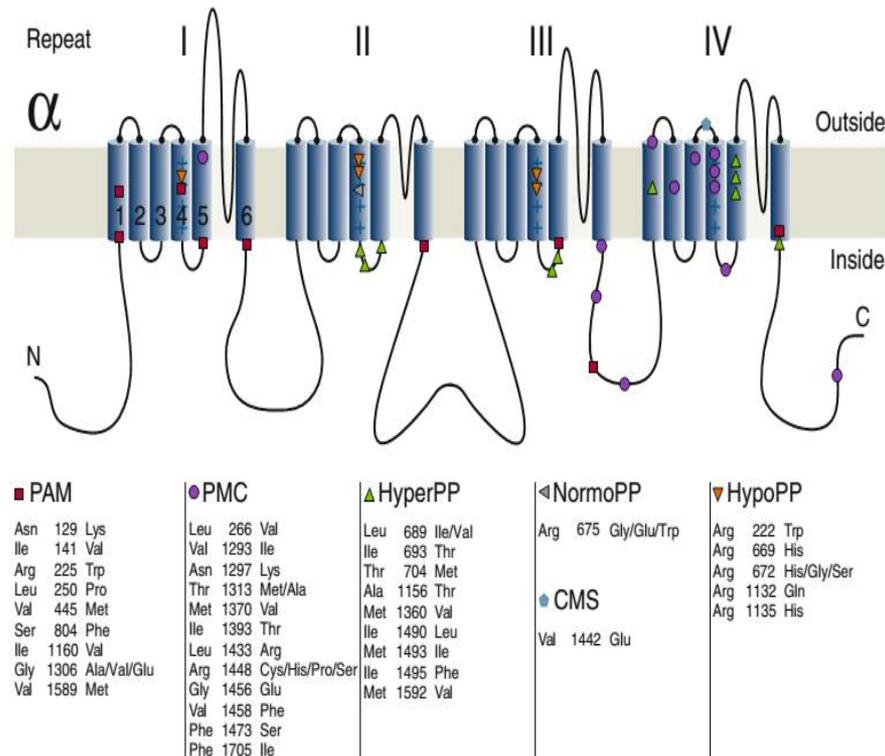
D. M. Kullmann and S. G. Waxman

J Physiol 588.11

Table 1. The neurological channelopathies

		Gene	Channel subunit	Disease
CNS	Sodium channels	<i>SCN1A</i>	α subunit of Nav1.1	Epilepsy, migraine
		<i>SCN1B</i>	β 1	Epilepsy
		<i>SCN2A</i>	α subunit of Nav1.2	Epilepsy
	Potassium channels	<i>KCNQ2</i>	Kv7.2	Epilepsy
		<i>KCNQ3</i>	Kv7.3	Epilepsy
		<i>KCNMA1</i>	BK	Epilepsy with dyskinesia
		<i>KCNA1</i>	Kv1.1	Episodic ataxia
		<i>KCNC3</i>	Kv3.3	Ataxia
	Calcium channels	<i>CACNA1H</i>	α 1H subunit of Cav3.2	Epilepsy
		<i>CACNA1A</i>	α 1A subunit of Cav2.1	Episodic or progressive ataxia, migraine, epilepsy
	GABA _A receptors	<i>GABRA1</i>	α 1	Epilepsy
		<i>GABRB3</i>	β 3	Epilepsy
		<i>GABRG2</i>	γ 2	Epilepsy
	Nicotinic ACh receptors	<i>CHRNA2</i>	α 2	Epilepsy
		<i>CHNRA4</i>	α 4	Epilepsy
<i>CHRNB2</i>		β 2	Epilepsy	
Glycine receptors	<i>GLRA1</i>	α 1	Hyperekplexia	
	<i>GLRB</i>	β	Hyperekplexia	
Peripheral nerve	Sodium channel	<i>SCN9A</i>	α subunit of Nav1.7	Excessive pain, insensitivity to pain
Muscle	Sodium channel	<i>SCN4A</i>	α subunit of Nav1.4	Periodic paralysis, myotonia
	Potassium channels	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	Periodic paralysis
		<i>KCNJ18</i>	Kir2.6	Periodic paralysis
	Calcium channel	<i>CACNA1S</i>	α 1S subunit of CaV1.1	Periodic paralysis
	Chloride channel	<i>CLCN1</i>	CLC-1	Myotonia
	Nicotinic ACh receptors	<i>CHRNA1</i>	α 1	Congenital myasthenic syndromes
		<i>CHRNB1</i>	β 1	Congenital myasthenic syndromes
		<i>CHRNG</i>	γ	Congenital myasthenic syndromes
		<i>CHRND</i>	δ	Congenital myasthenic syndromes
<i>CHRNE</i>		ϵ	Congenital myasthenic syndromes	

Mutações nos canais de sódio $Na_v1.4$ musculares levam a várias canalopatias



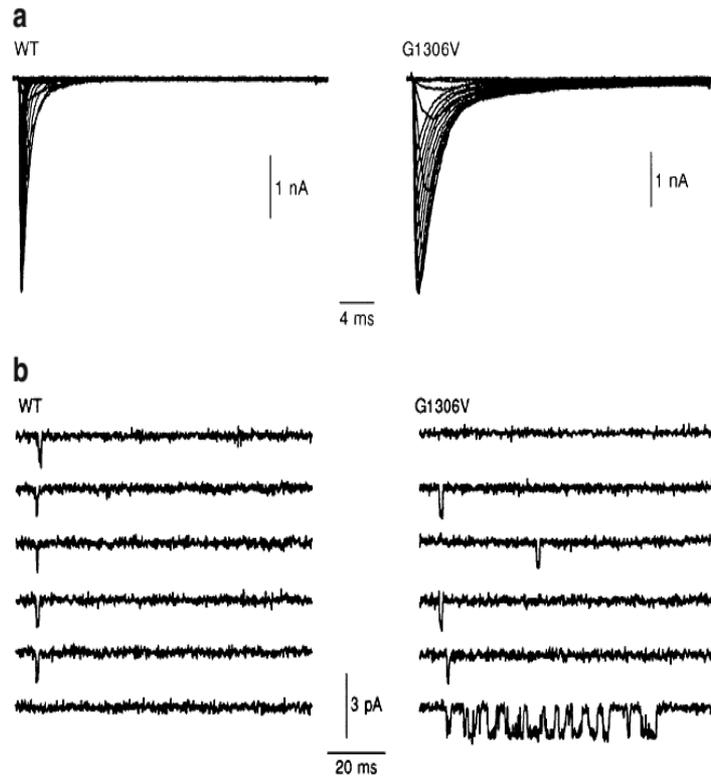
PAM = miotonia agravada pelo potássio HypoPP = paralisia periódica hipocalêmica

PMC = paramiotonia congênita

CMS = síndrome miastênica congênita

HyperPP = paralisia periódica hipercalêmica

Exemplo de uma mutação causadora de miotonia*

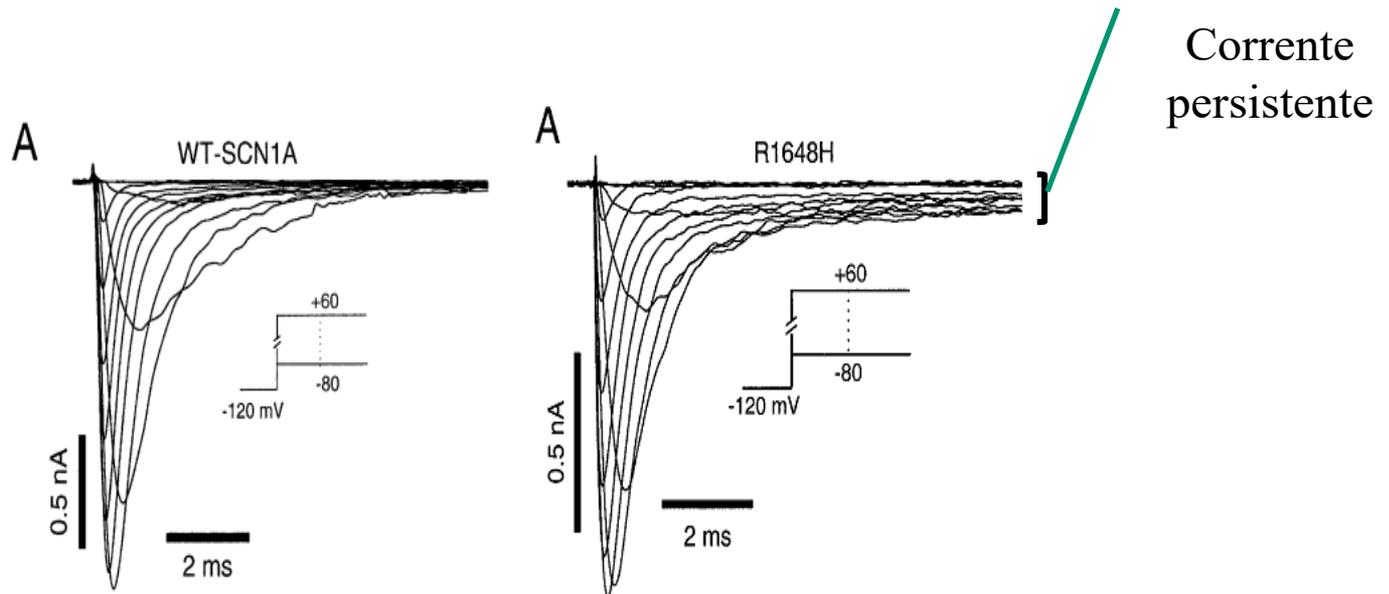


*miotonia = contração prolongada do músculo

Mutações nos canais de sódio $Na_v1.1$ (SCN1A) neuronais estão relacionadas a síndromes epilépticas

Neuron, Vol. 34, 877-884, June 13, 2002, Copyright ©2002 by Cell Press

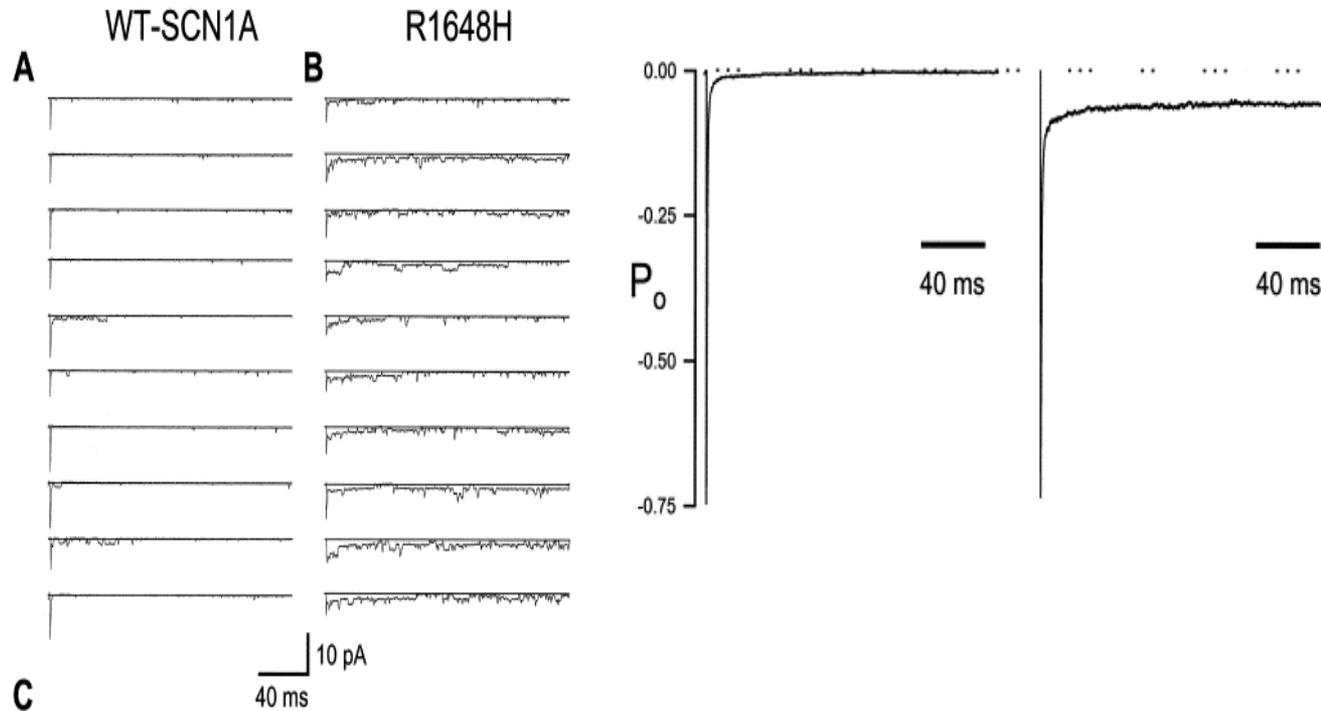
Molecular Basis of an Inherited Epilepsy



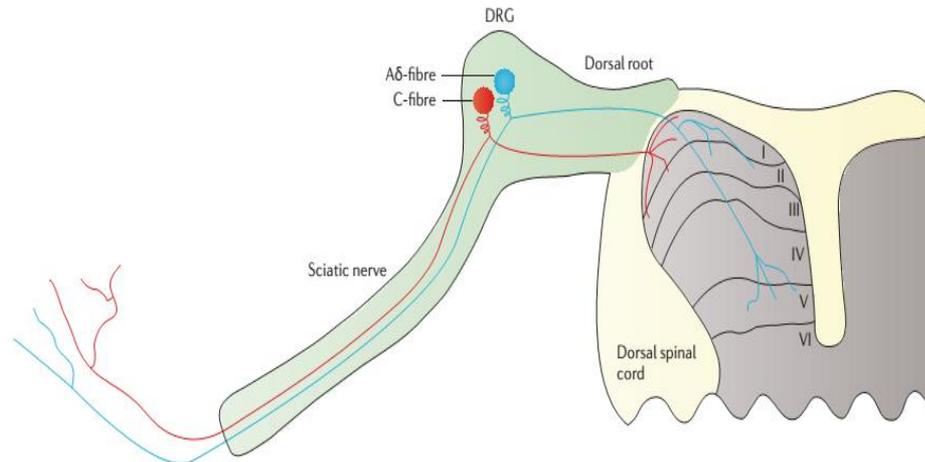
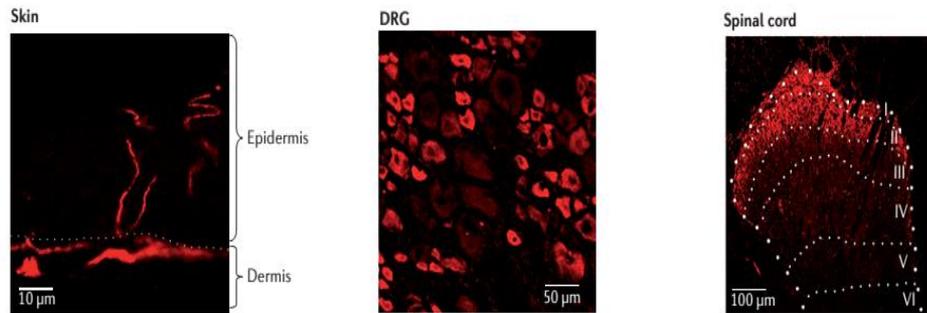
Mutações nos canais de sódio $\text{Na}_v1.1$ (SCN1A) neuronais estão relacionadas a síndromes epilépticas

Neuron, Vol. 34, 877-884, June 13, 2002, Copyright ©2002 by Cell Press

Molecular Basis of an Inherited Epilepsy



Canais de sódio dependentes de potencial $Na_v1.7$ (SCN9A) estão presentes nas vias nociceptivas



Ausência dos canais de sódio dependentes de potencial $\text{Na}_v1.7$ (SCN9A) provocam analgesia total

nature

Vol 444 | 14 December 2006 | doi:10.1038/nature05413

ARTICLES

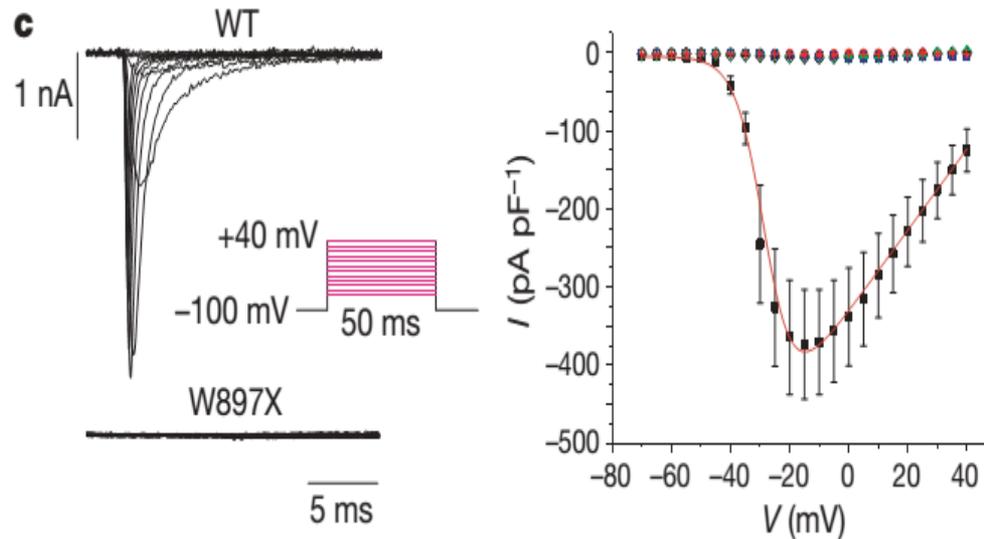
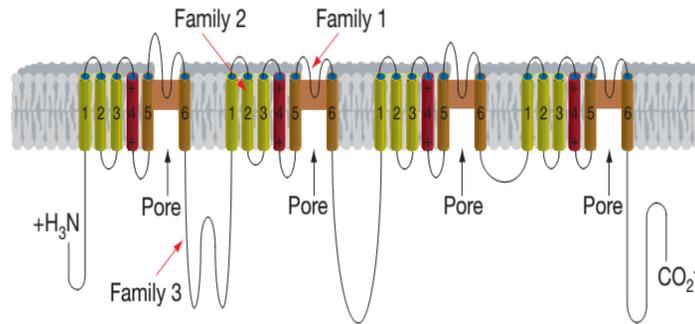
An *SCN9A* channelopathy causes congenital inability to experience pain

James J. Cox^{1*}, Frank Reimann^{2*}, Adeline K. Nicholas¹, Gemma Thornton¹, Emma Roberts³, Kelly Springell³, Gulshan Karbani⁴, Hussain Jafri⁵, Jovaria Mannan⁶, Yasmin Raashid⁷, Lihadh Al-Gazali⁸, Henan Hamamy⁹, Enza Maria Valente¹⁰, Shaun Gorman¹¹, Richard Williams¹², Duncan P. McHale¹², John N. Wood¹³, Fiona M. Gribble² & C. Geoffrey Woods¹

Ausência dos canais de sódio dependentes de potencial $\text{Na}_v1.7$ (SCN9A) provocam analgesia total

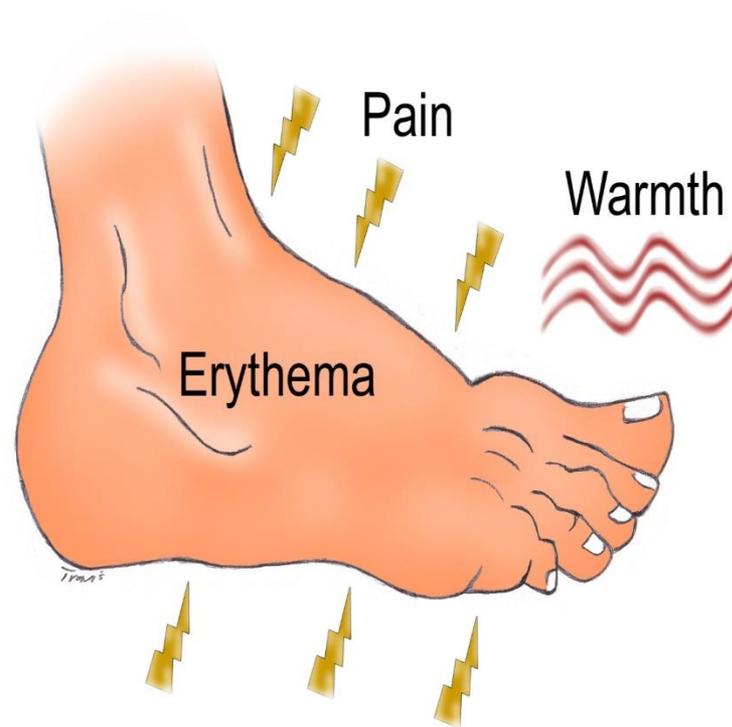


Ausência dos canais de sódio dependentes de potencial $\text{Na}_v1.7$ (SCN9A) provocam analgesia total

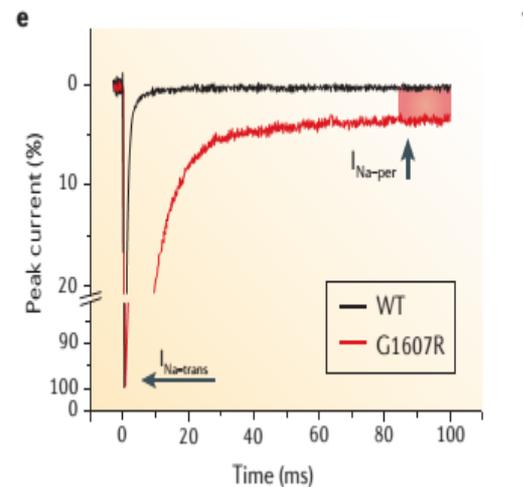
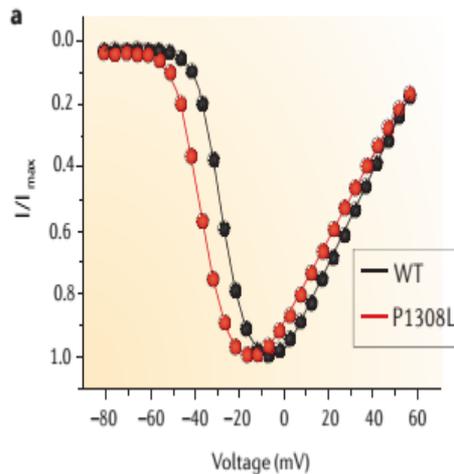
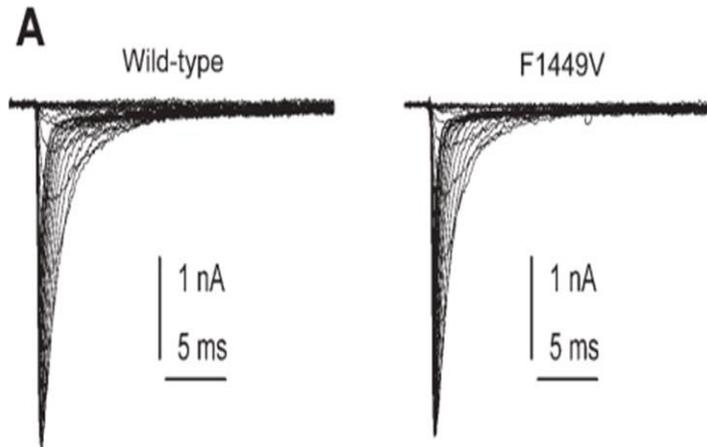


Eritromegalia herdada é uma patologia relacionada a mutações nos canais de sódio dependentes de potencial $\text{Na}_v1.7$ (SCN9A)

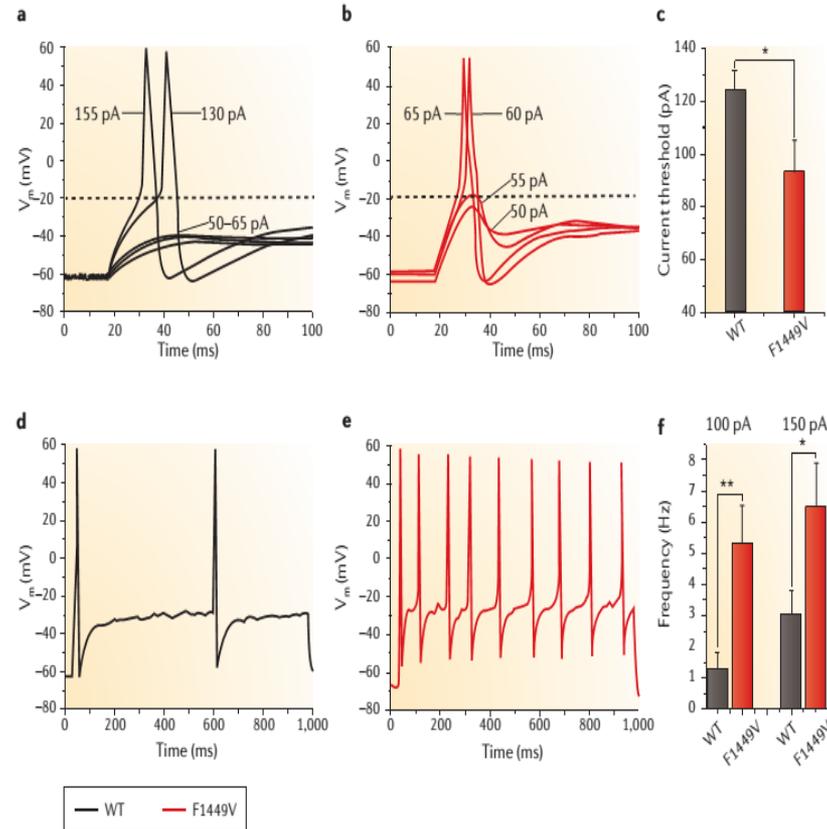
The Cardinal Symptoms of Erythromelalgia



Os canais $\text{Na}_v1.7$ mutantes da eritromegalia herdada possuem ativação em potencial mais hiperpolarizados e menor inativação



Os canais $Na_v1.7$ mutantes da eritromegalia herdada diminuem o limiar do potencial de ação dos neurônios nociceptivos e aumentam sua excitabilidade



Movimentos de carga do sensor de voltagem

