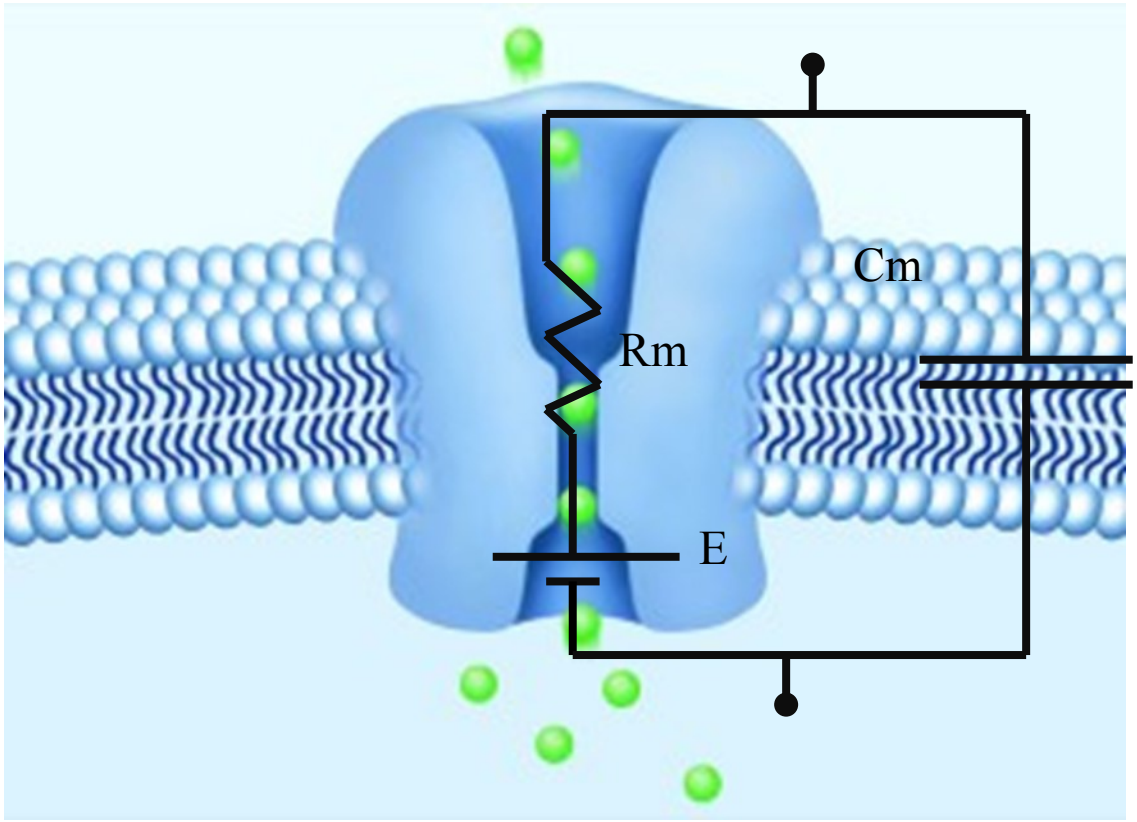
Os Canais Iônicos

Prof. Ricardo M. Leão
FMRP-USP

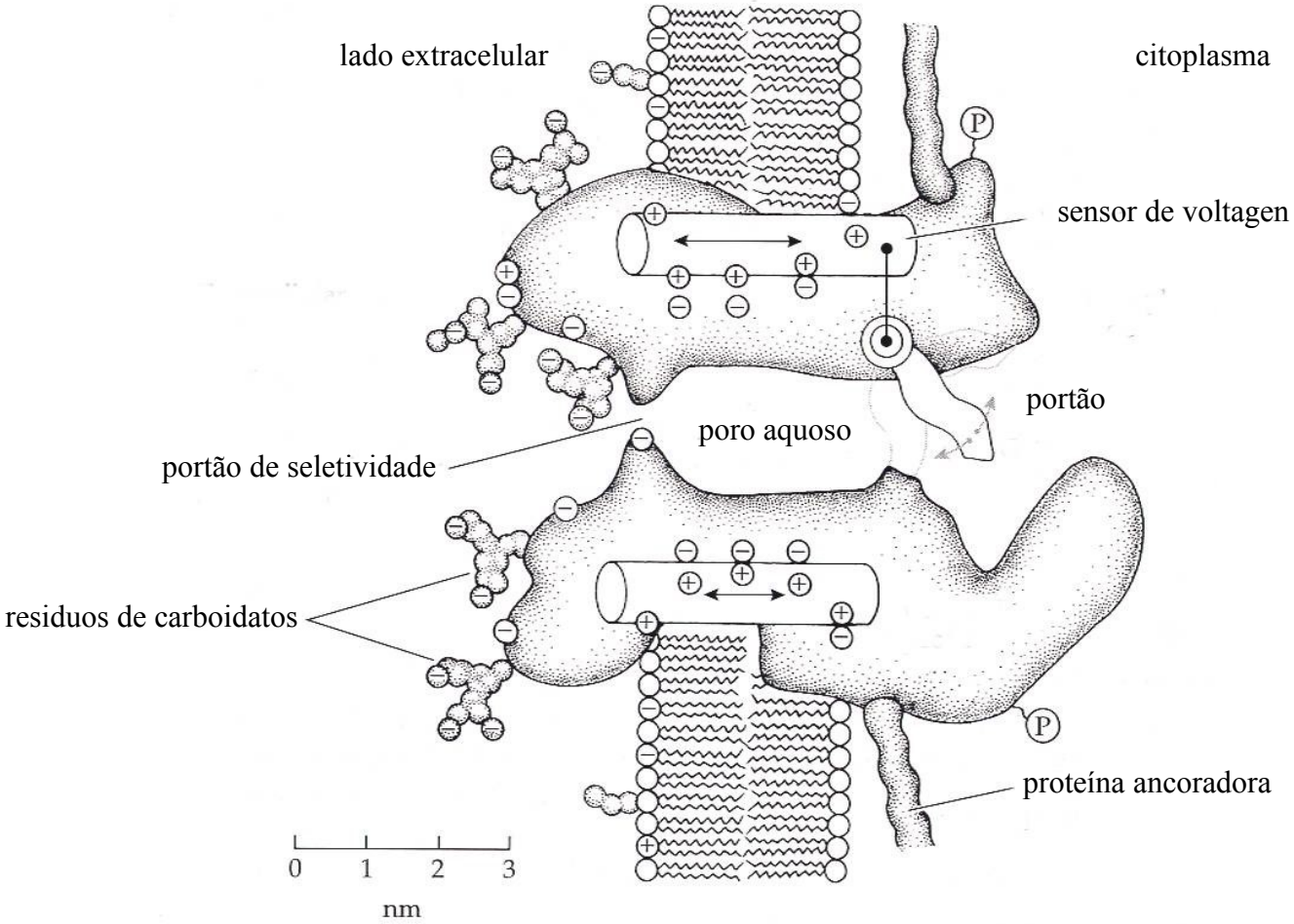
O que é um canal iônico?

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



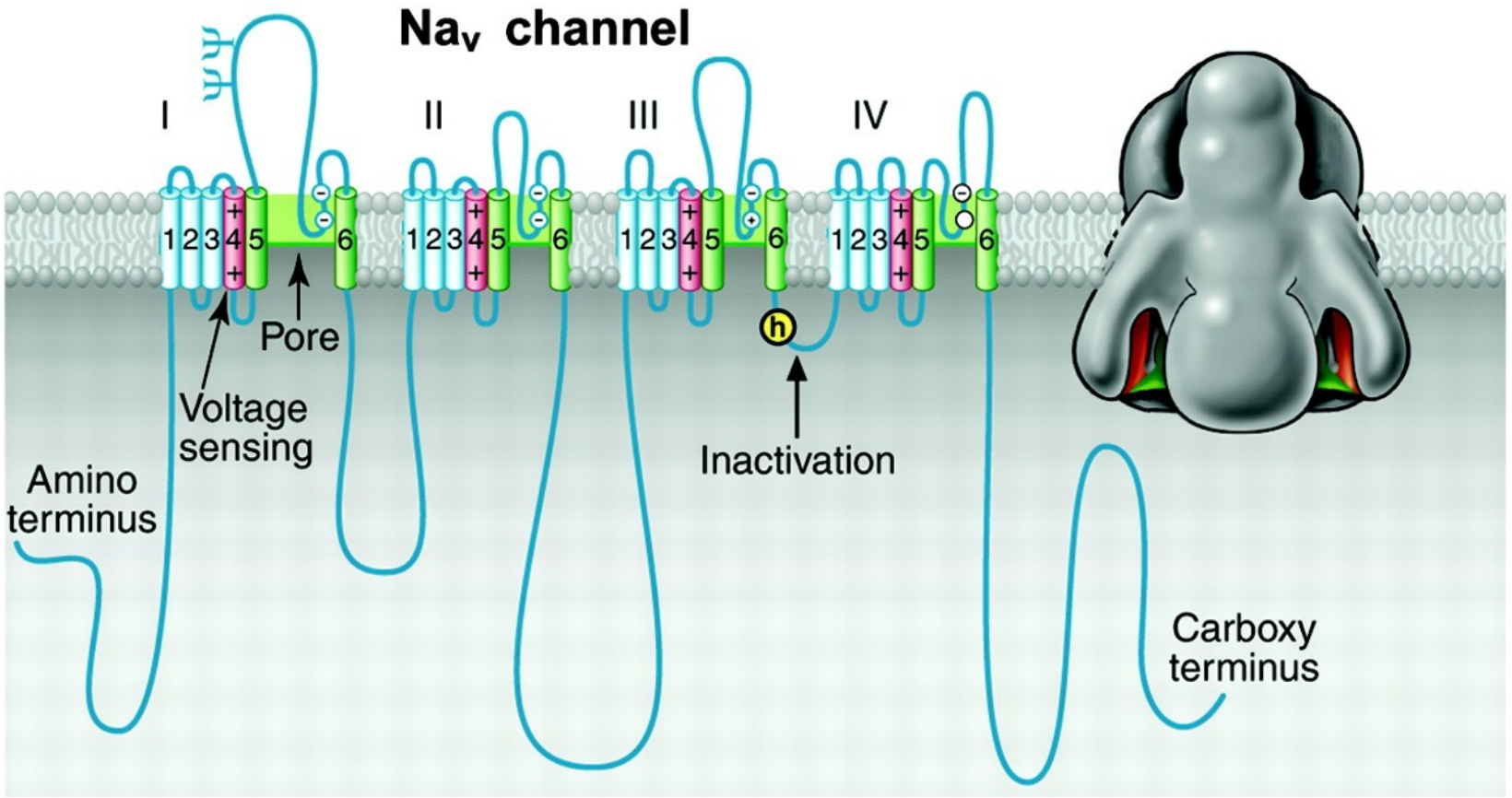
Canais iônicos

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



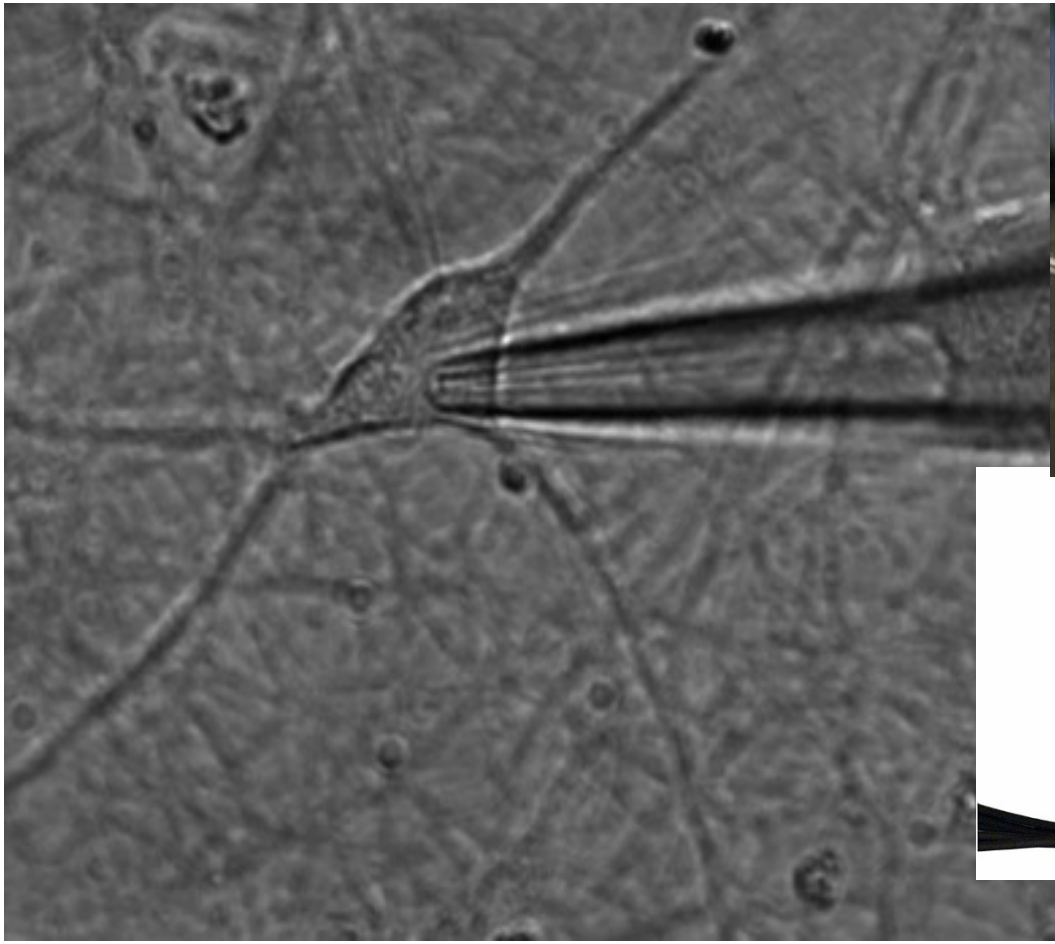
Modelo clássico de canal iônico sensível a voltagem (Hille, 1992)

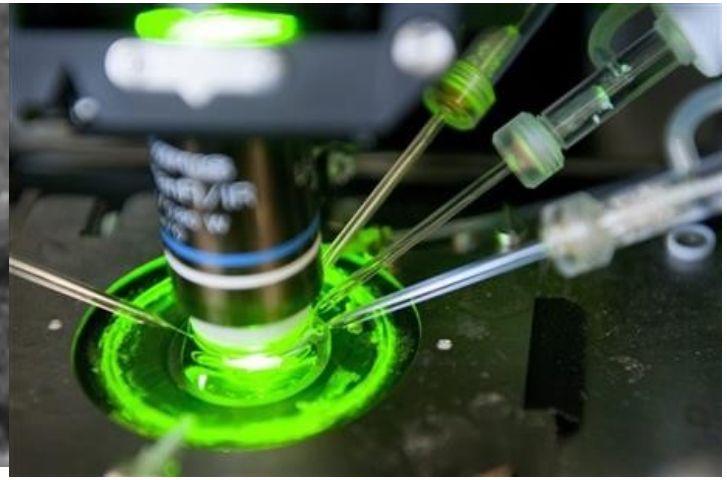
Um modelo moderno de canal de sódio voltage-dependente

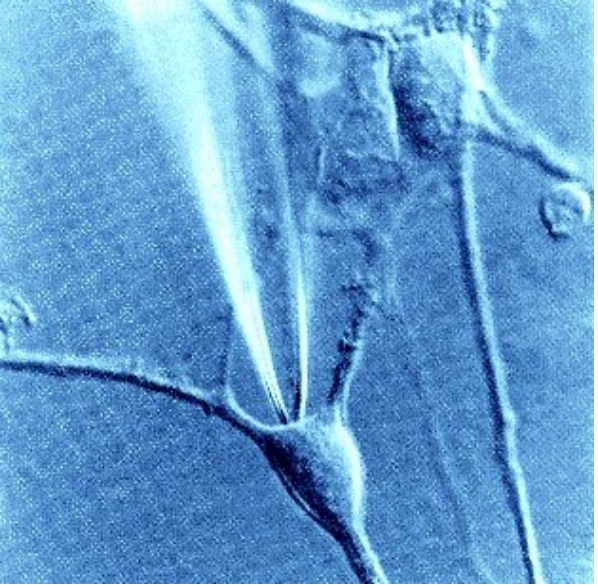


KEEP CALM AND PATCH CLAMP

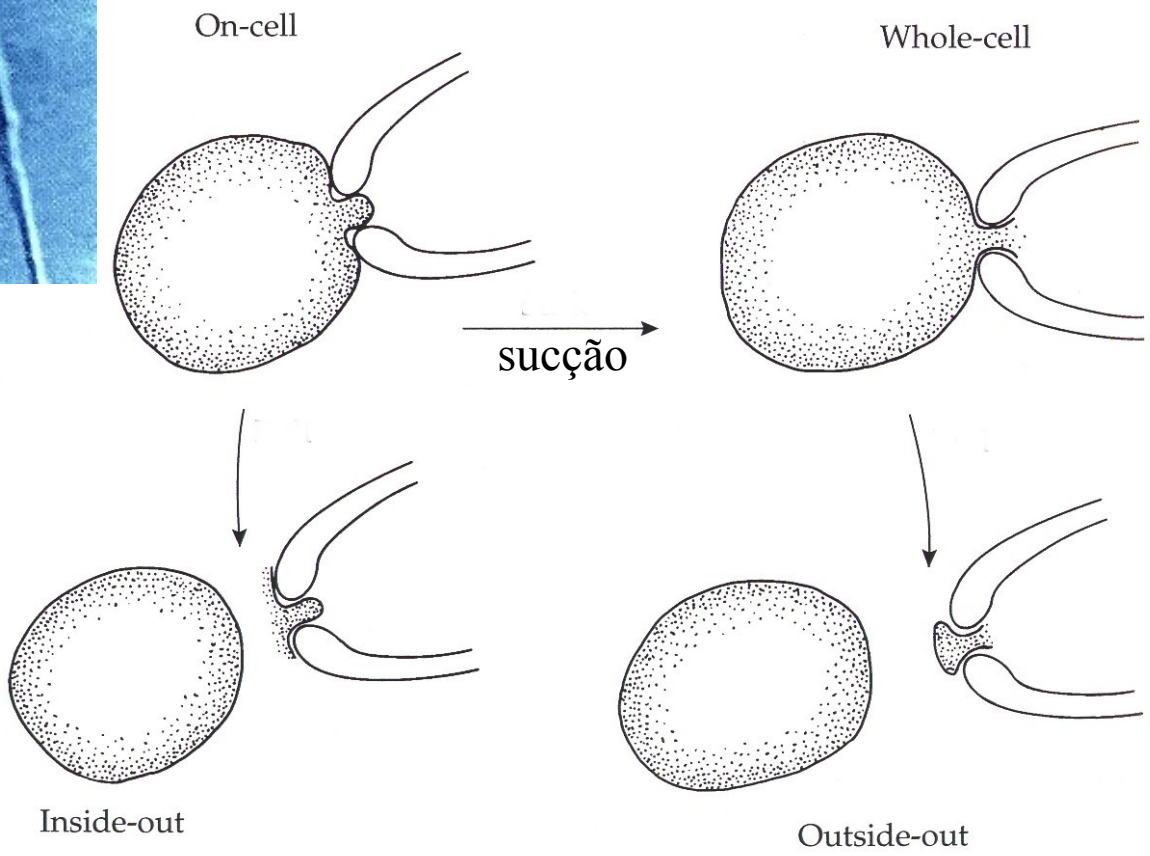
patch-clamp

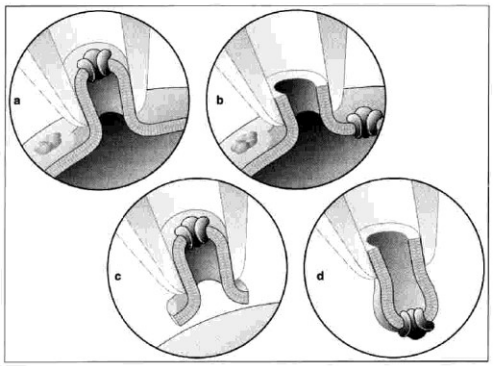




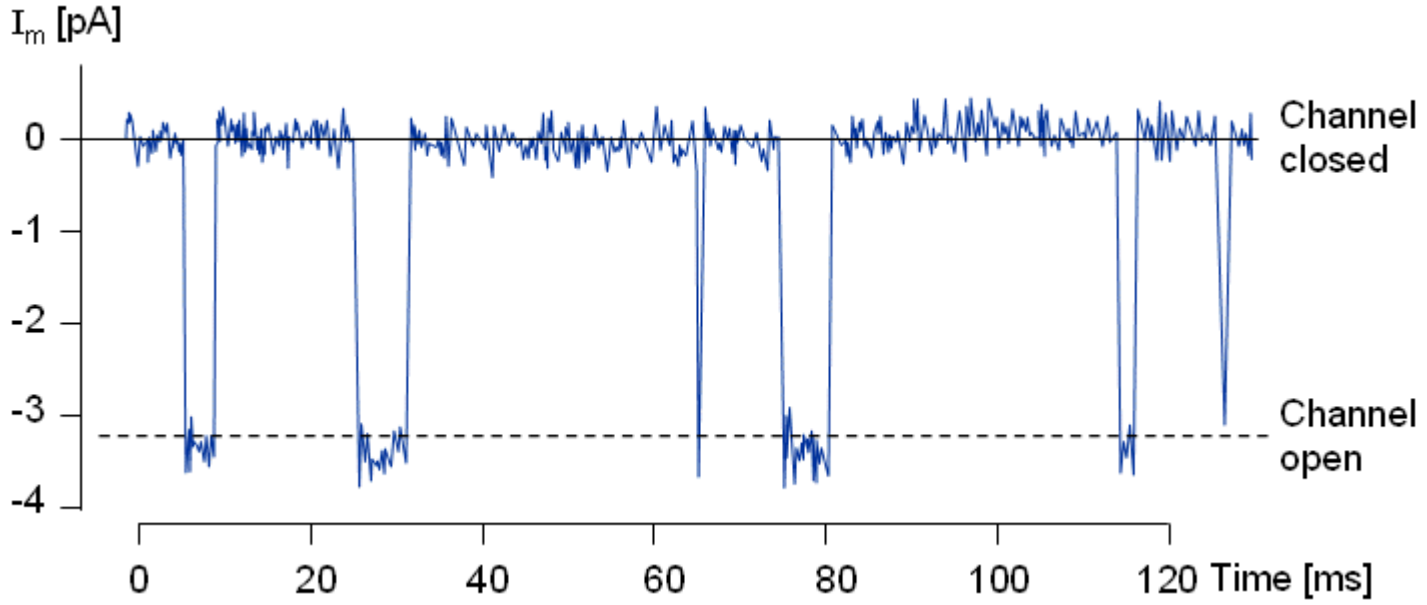


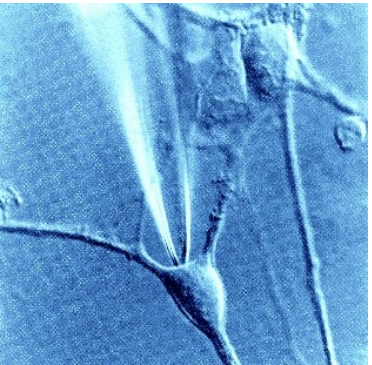
patch-clamp





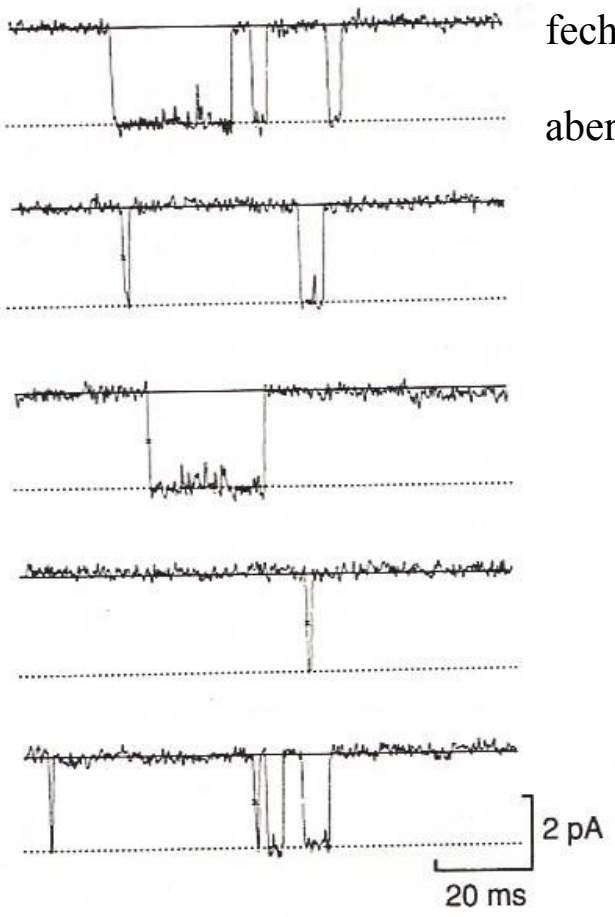
Single-channel recording





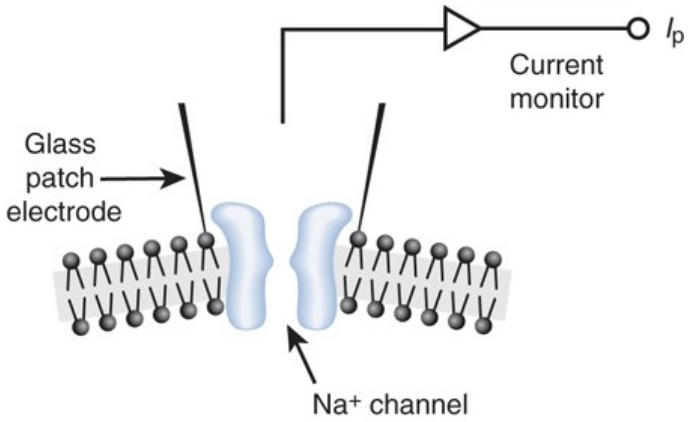
Single-channel recording

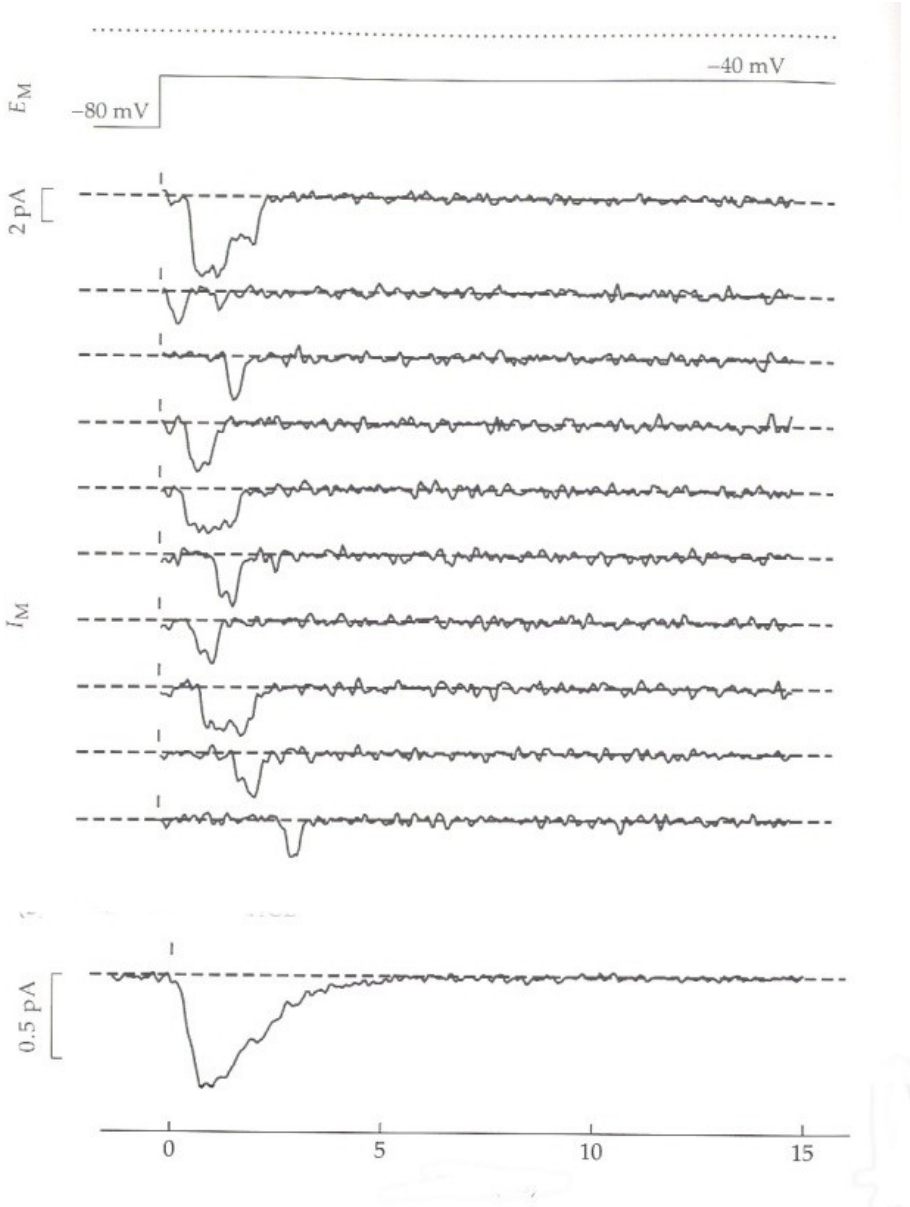
Receptor nicotínico de acetilcolina



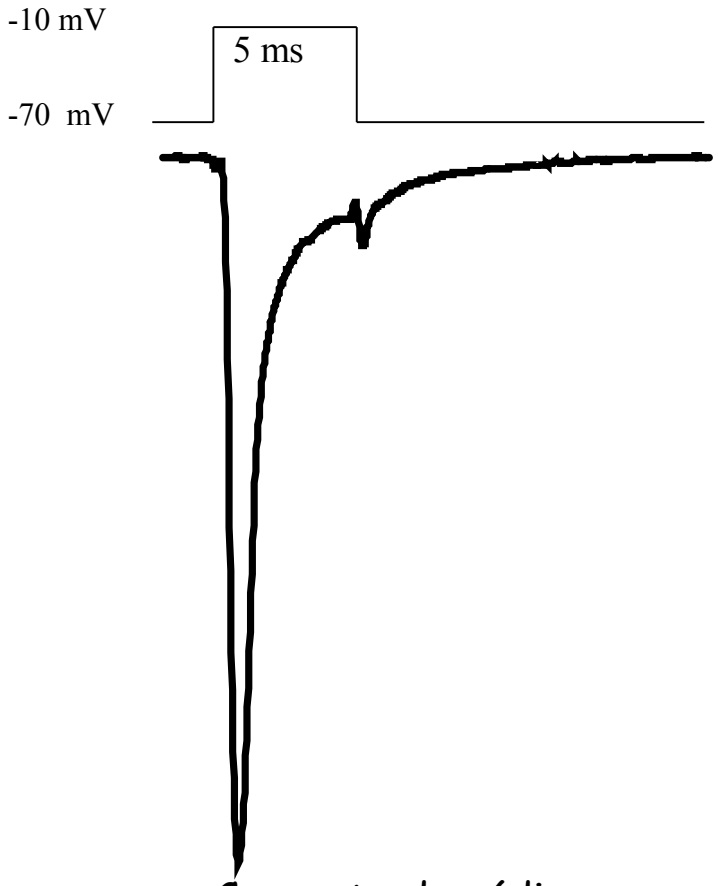
Correntes unitárias = *single channel*

Correntes de sódio unitárias





Correntes macroscópicas = *whole-cell*



Corrente de sódio macroscócpica

Tipos de canais iônicos

- Sensíveis a voltagem
    - Canais de sódio, potássio e cálcio das células excitáveis
- Sensíveis a ligantes
    - Receptores de neurotansmissores (glutamato, GABA, acetilcolina, etc…)
    - Sensores químicos (pH, oxigênio, etc…)
    - Outros (canais ativados por cGMP dos fotoreceptores)
  - 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

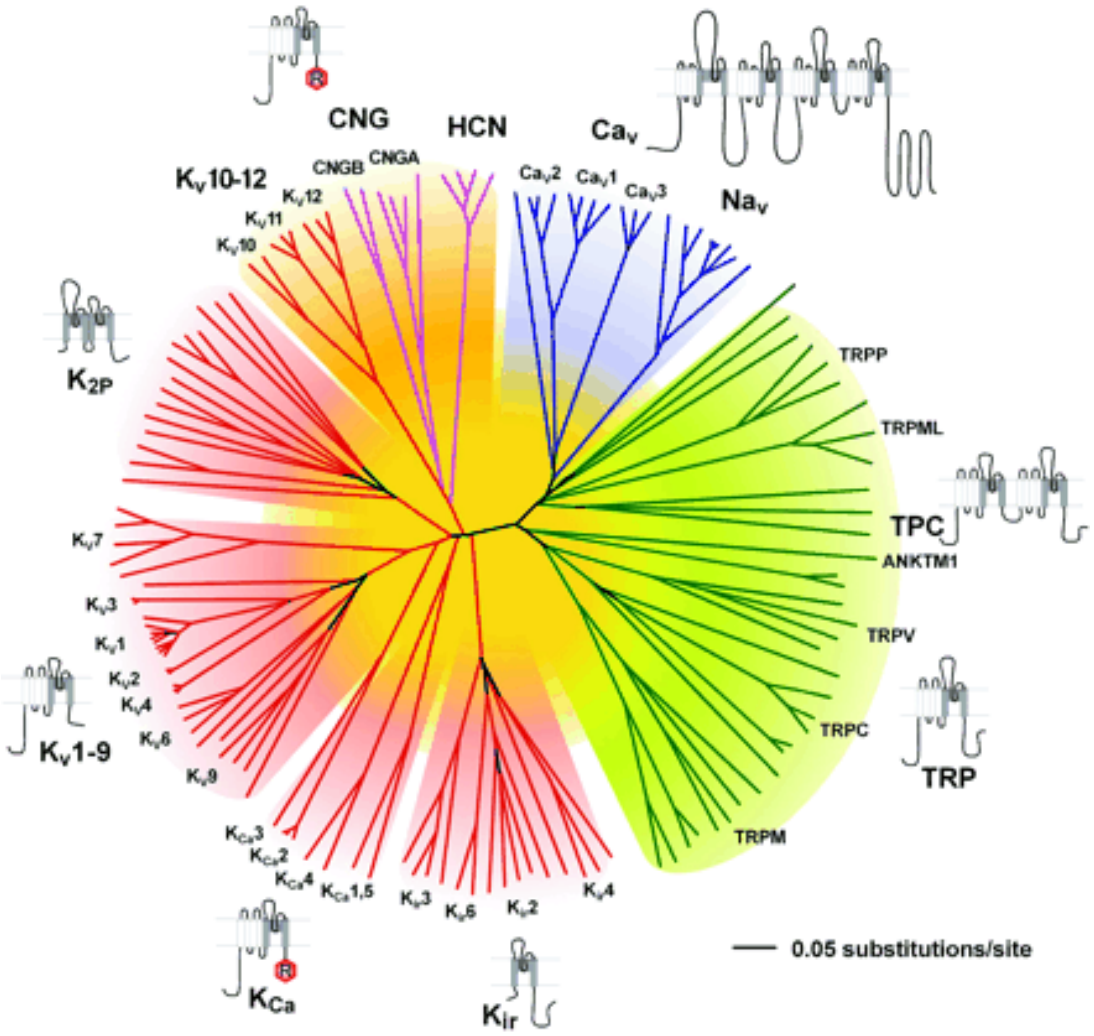
Funções fisiológicas dos canais iônicos

- Sensíveis a voltagem
  - Sódio: geração do potencial de ação (PA_, aumento da excitabilidade cellular
  - Potássio: repolarização do PA; controle do disparo dos Pas, controle da excitabilidade cellular.
  - Cálcio: secreção de neurotransmissores e hormônios; contração muscular, sinalização intracellular
  - Catiônicos: controle da excitabilidade cellular (canais tipo HCN)
- Sensíveis a ligantes
  - Catiônicos; neurotransmissão excitatória; sinalizção de dor e dano celular; (canais TRPV) transdução de sinal nos fotoreceptores; controle da excitabilidade cellular (canais de K sensiveis 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 cellular (canais de cloreto
  - Transdução do sinal acústico na cóclea.
- Canais de vazamento
  - Controle do potencial de repouso da membrana.
  - Controle da excitabilidade celular.
  - Transporte de íons em epitélios.
  - Controle do volume cellular (canais de cloreto).

Diversidade de canais iônicos



Relação filogenética dos aminoácidos dos 146 genes de canais iônicos de mamíferos

Diversidade dos canais de sódio dependentes de voltagem

Table 1. Mammalian sodium channel α subunits

Type	Gene symbol	Chromosomal location	Primary tissues
$Na_v1.1$	*SCN1A*	Mouse 2 Human 2q24	CNS neurons
$Na_v1.2$	*SCN2A*	Mouse 2 Human 2q23–24	CNS neurons
$Na_v1.3$	*SCN3A*	Mouse 2 Human 2q24	CNS neurons
$Na_v1.4$	*SCN4A*	Mouse 11 Human 17q23–25	SkM
$Na_v1.5$	*SCN5A*	Mouse 9 Human 3p21	Uninnervated SkM, heart
$Na_v1.6$	*SCN8A*	Mouse 15 Human 12q13	CNS neurons
$Na_v1.7$	*SCN9A*	Mouse 2 Human 2q24	PNS neurons
$Na_v1.8$	*SCN10A*	Mouse 9 Human 3p22–24	DRG neurons
$Na_v1.9$	*SCN11A*	Mouse 9 Human 3p21–24	DRG neurons
Na_x	*SCN7A* *SCN6A*	Mouse 2 Human 2q21–23	uterus, astrocytes, hypothalamus

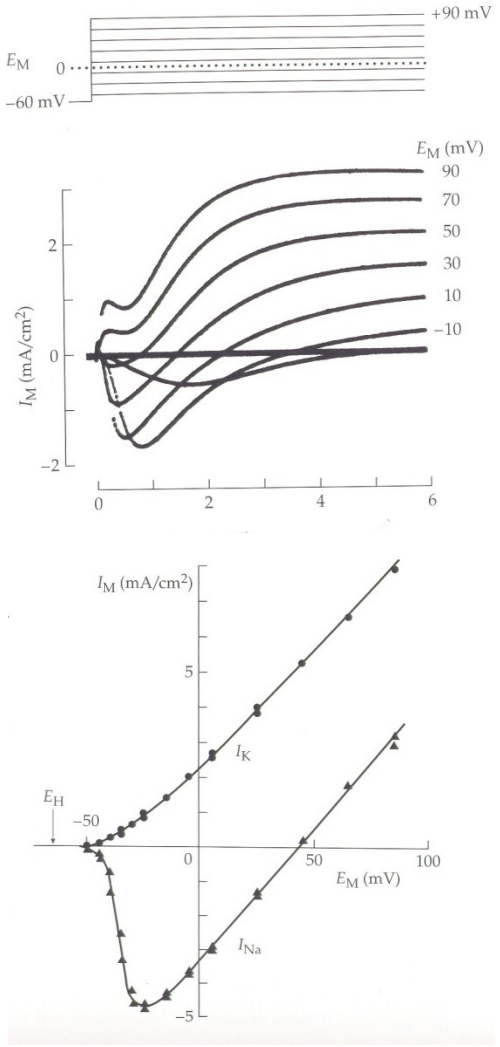
Caracterização dos canais iônicos

- 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
  - biofisica
    - inativação de canais iônicos específicos
    - Retificação
    - Reversão das correntes

Caracterização biofísica de canais iônicos dependentes de voltagem

dependência de voltagem

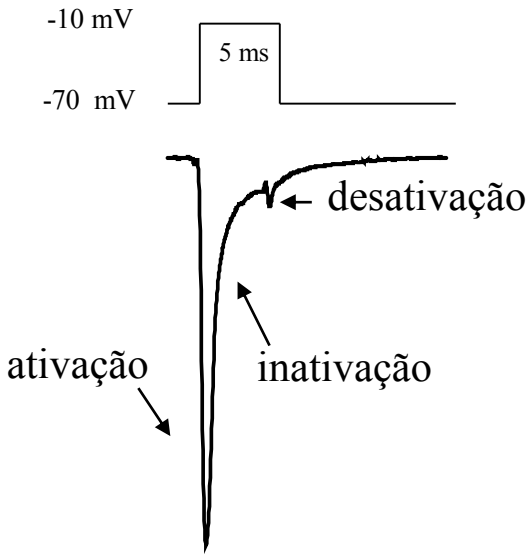


condutância = I/V

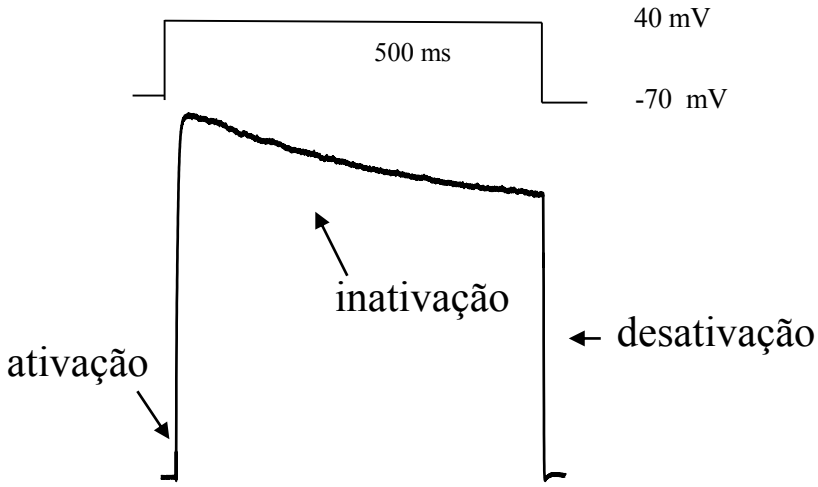
Caracterização biofísica de canais iônicos dependentes de voltagem

ativação/inativação/desativação

corrente de sódio dependente de voltagem



corrente de potássio dependente de voltagem

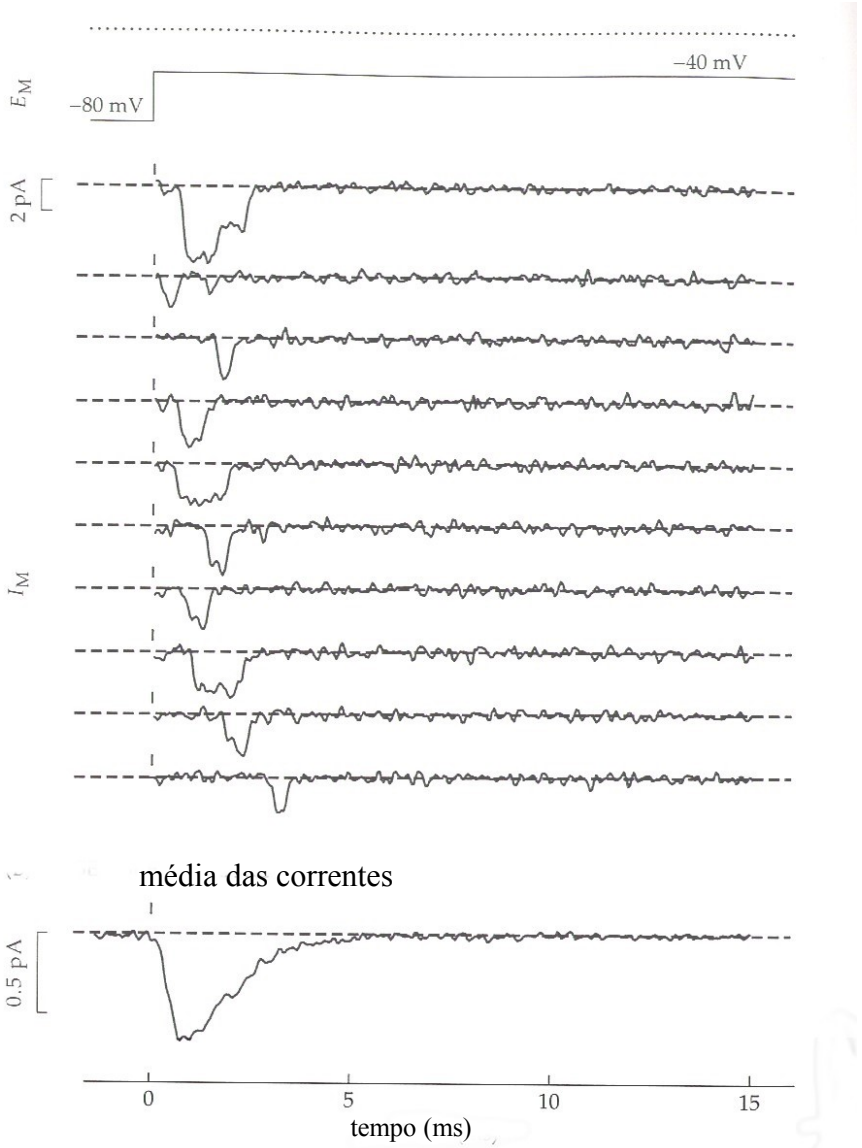


Caracterização biofísica de canais iônicos dependentes de voltagem

registros de canais unitários

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

Probabilidade de abertura (P_o)

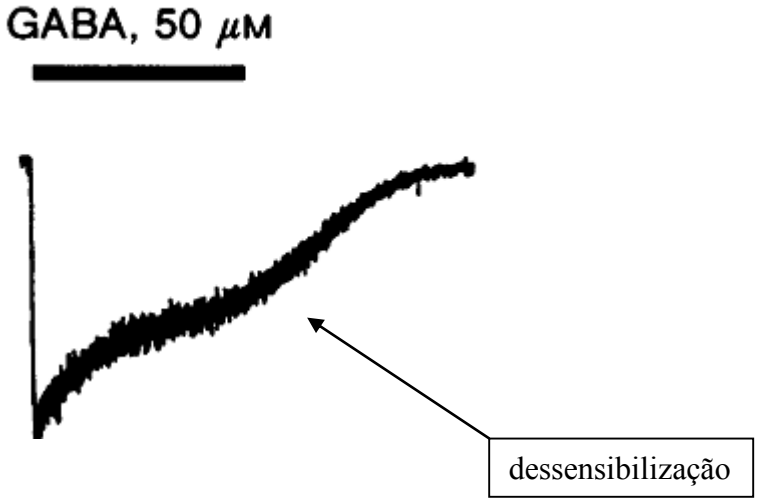


modelo cinético

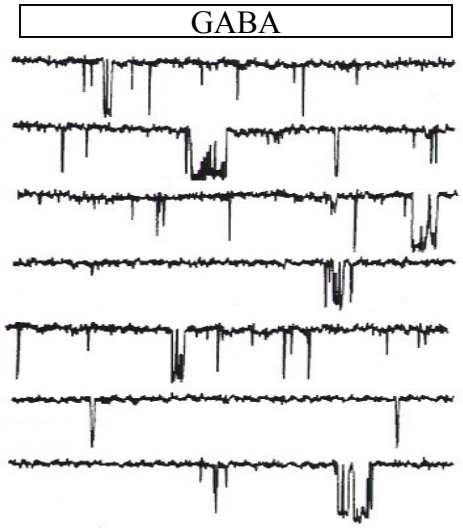
$$C \rightleftharpoons O \rightleftharpoons I$$

C = fechado
O = aberto
I = inativado

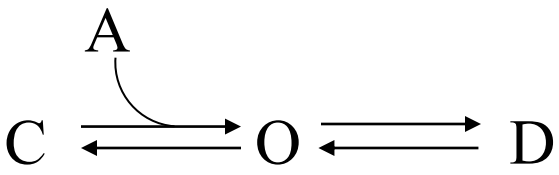
Caracterização biofísica de canais iônicos ativados por ligantes



whole cell

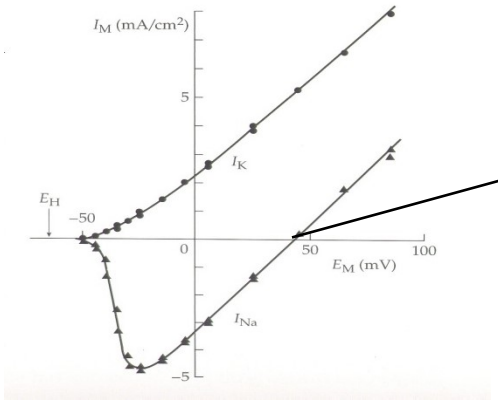


outside-out



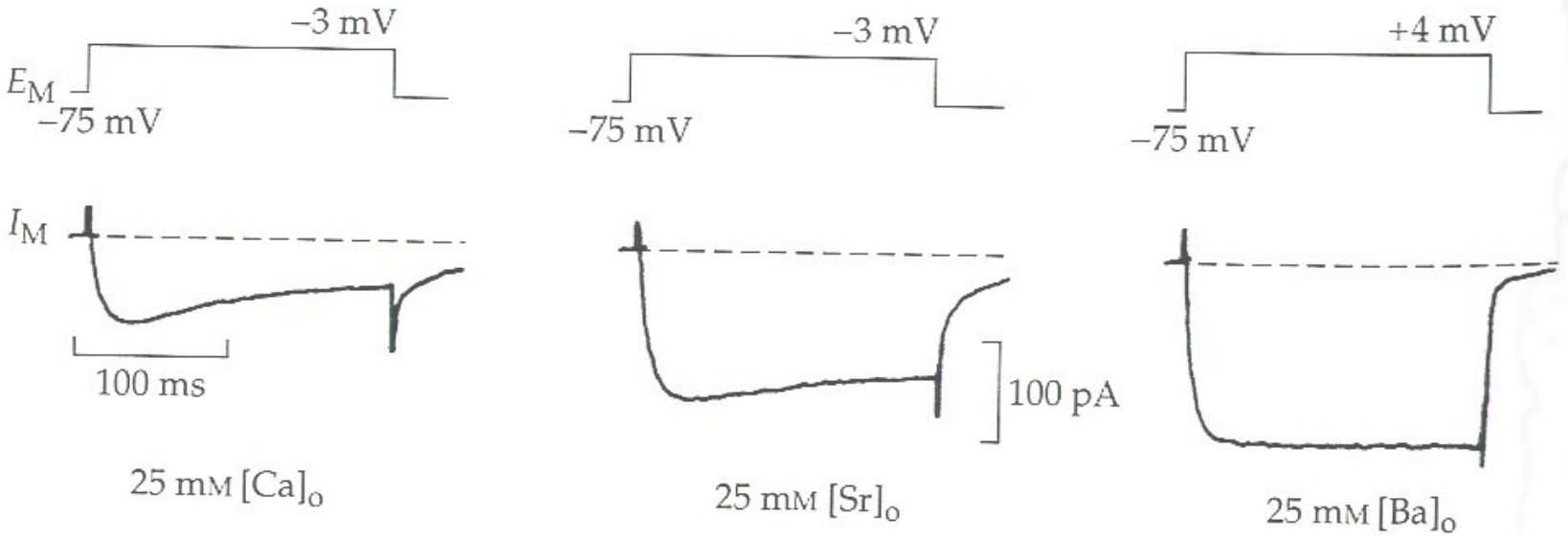
A = agonista
C = fechado
O = aberto
D = dessensibilizado

Seletividade e permeabilidades iônicas

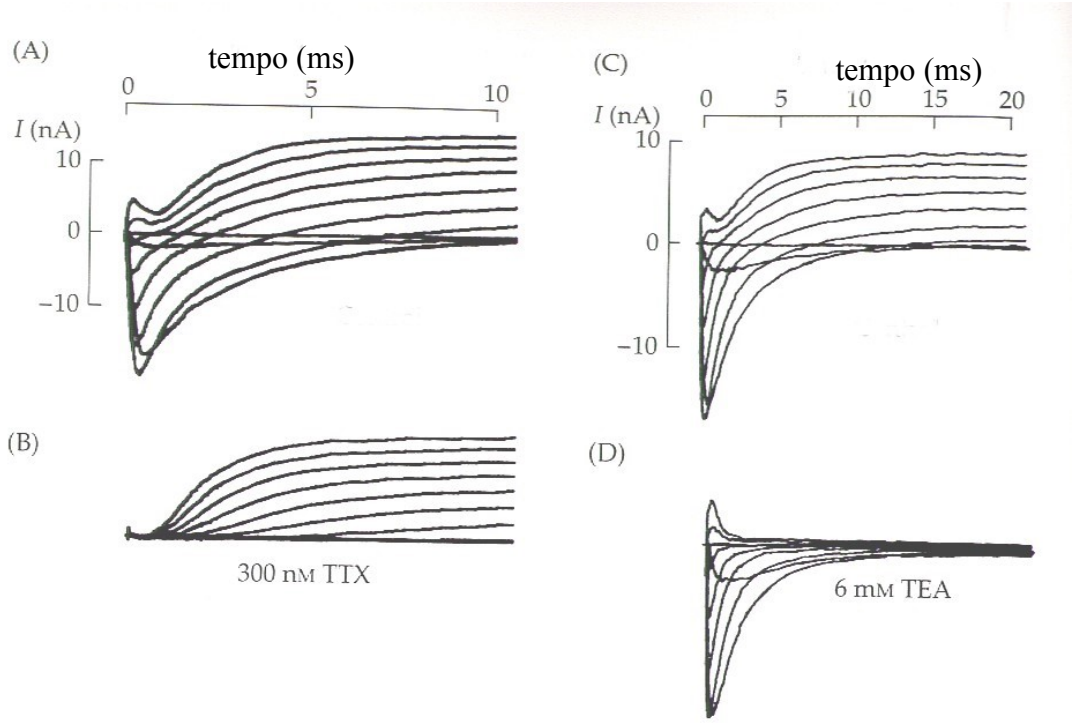


potencial de reversão

Diferentes permeabilidades do canal de cálcio a diferentes íons



Isolamento farmacológico



bloqueadores de canais de sódio

tetrodotoxina, saixitoxina

bloqueadores de canais de potássio

tetraetilamonio, césio (interno), 4-aminopiridina

bloqueadores de canais de cálcio

cádmio, cobalto, ω-conotoxinas, dihidropiridinas

Caracterização farmacológica
exemplos

Agonistas

NMDA, AMPA, kainato

atuam em diferentes tipos de receptores glutamatérgicos

Antagonistas

Bucuculina, picrotoxina

antagonistas dos receptores GABA

CNQX

antagonista dos receptores glutmatérgicos AMPA/kainato

MK-801

antagonista de "canal aberto" do receptor glutamatérgico NMDA

Modificadores

bezodiazepinas

aumentam a afinidade de certos receptores de GABA ao GABA

barbituratos

aumentam o tempo de abertura dos receptores de GABA

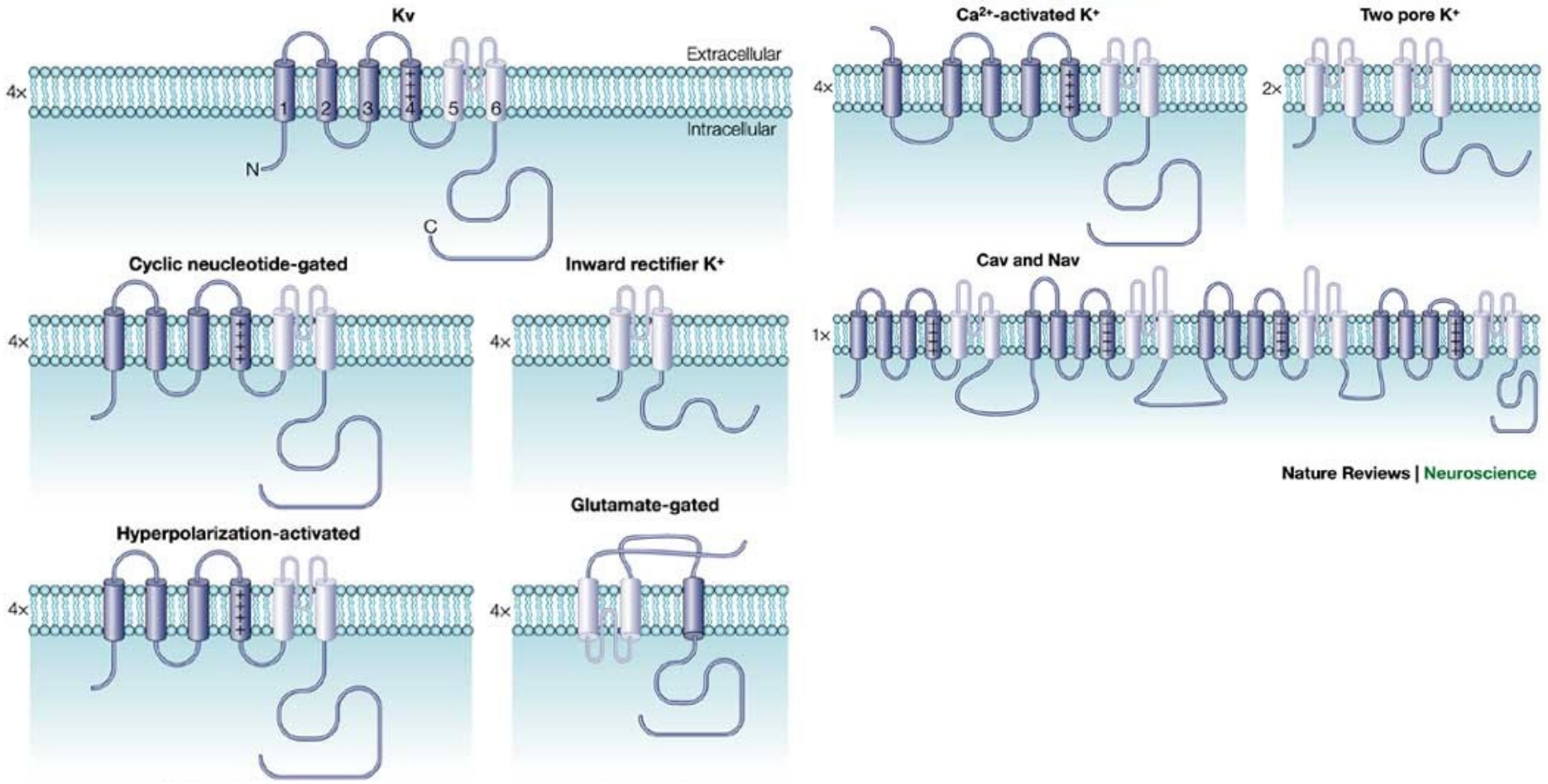
veratridina, batracotoxina

modificam várias propriedades cinéticas e de seletividade dos canais de sodio

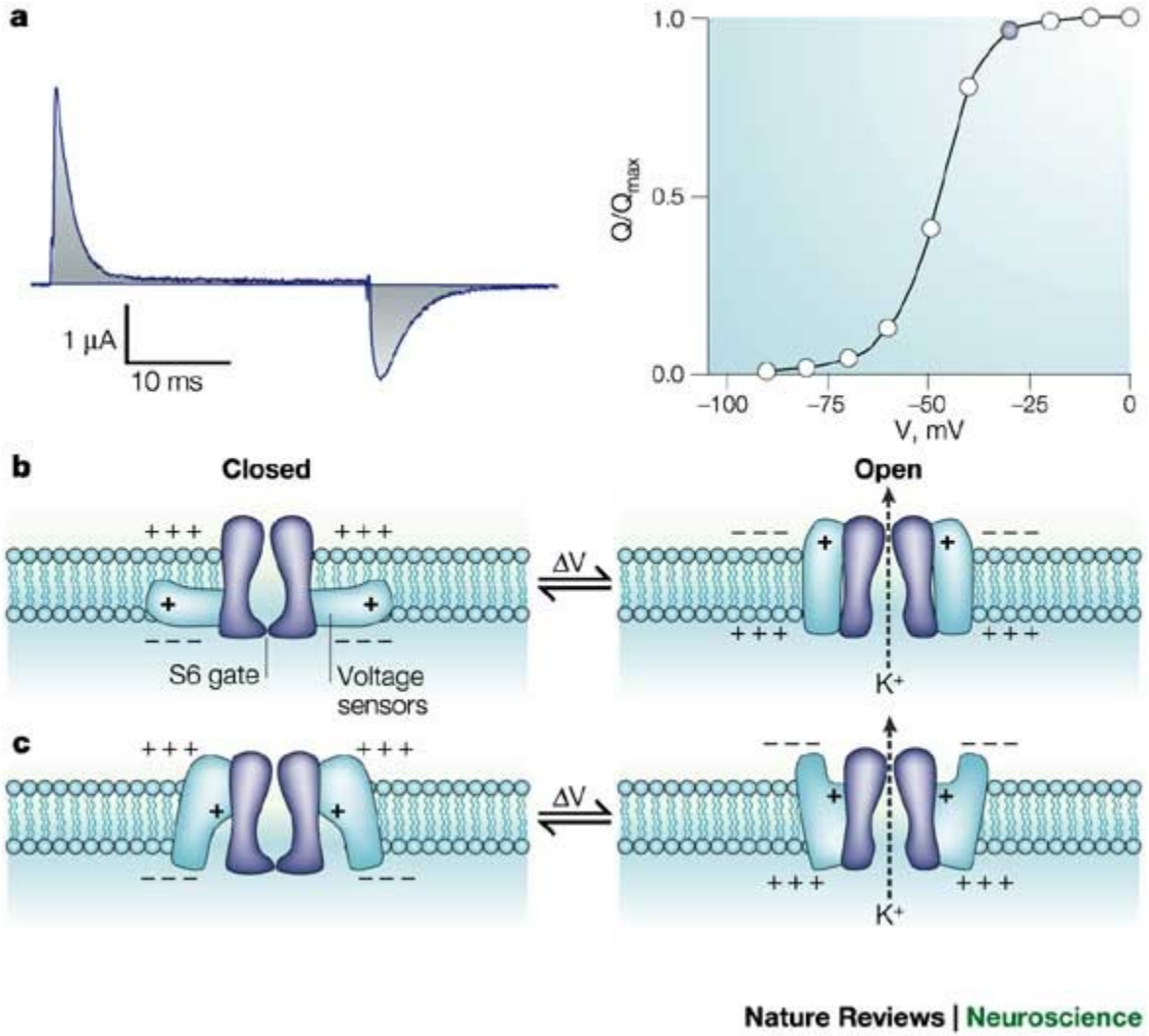
Caracterização bioquímica

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

Estrutura dos canais iônicos



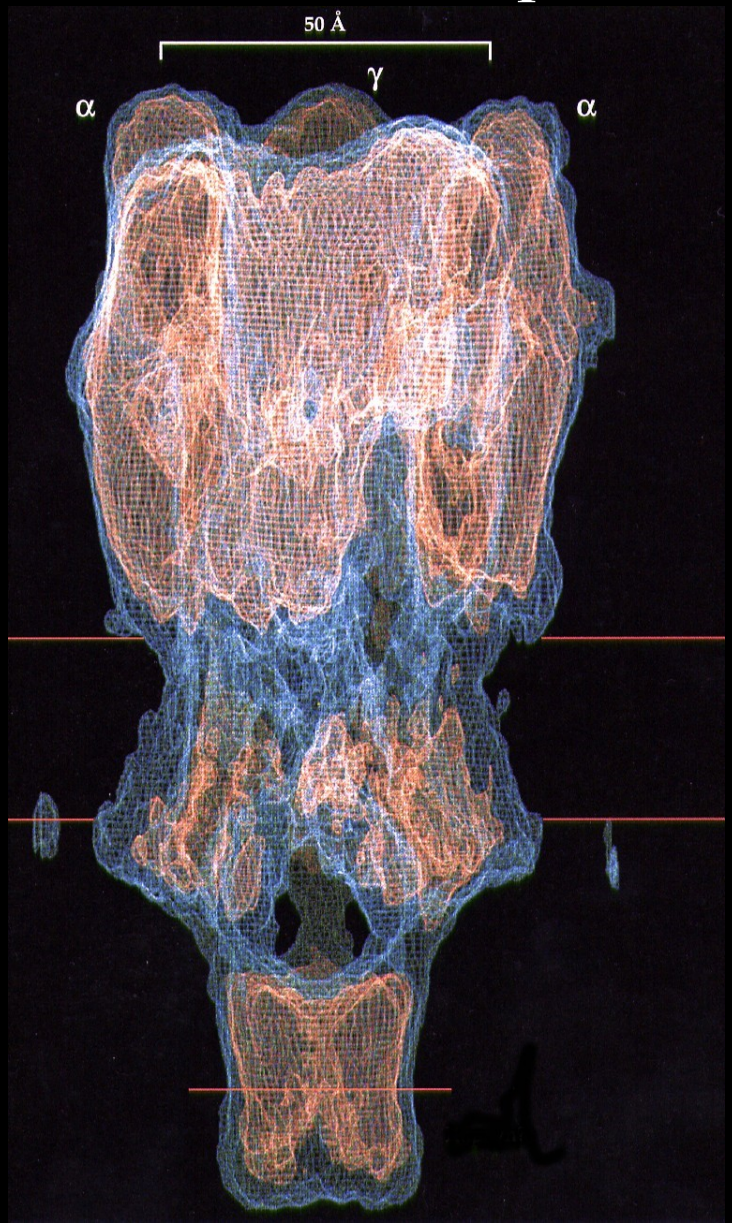
Movimentos de carga do sensor de voltagem

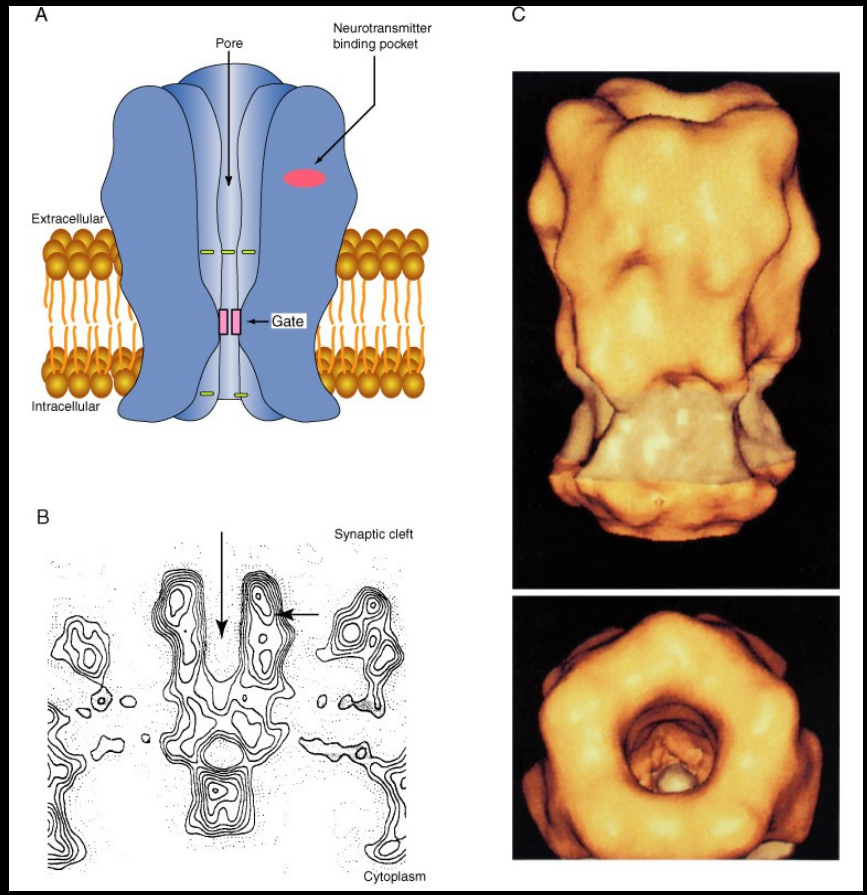


Determinação da estrutura da proteína

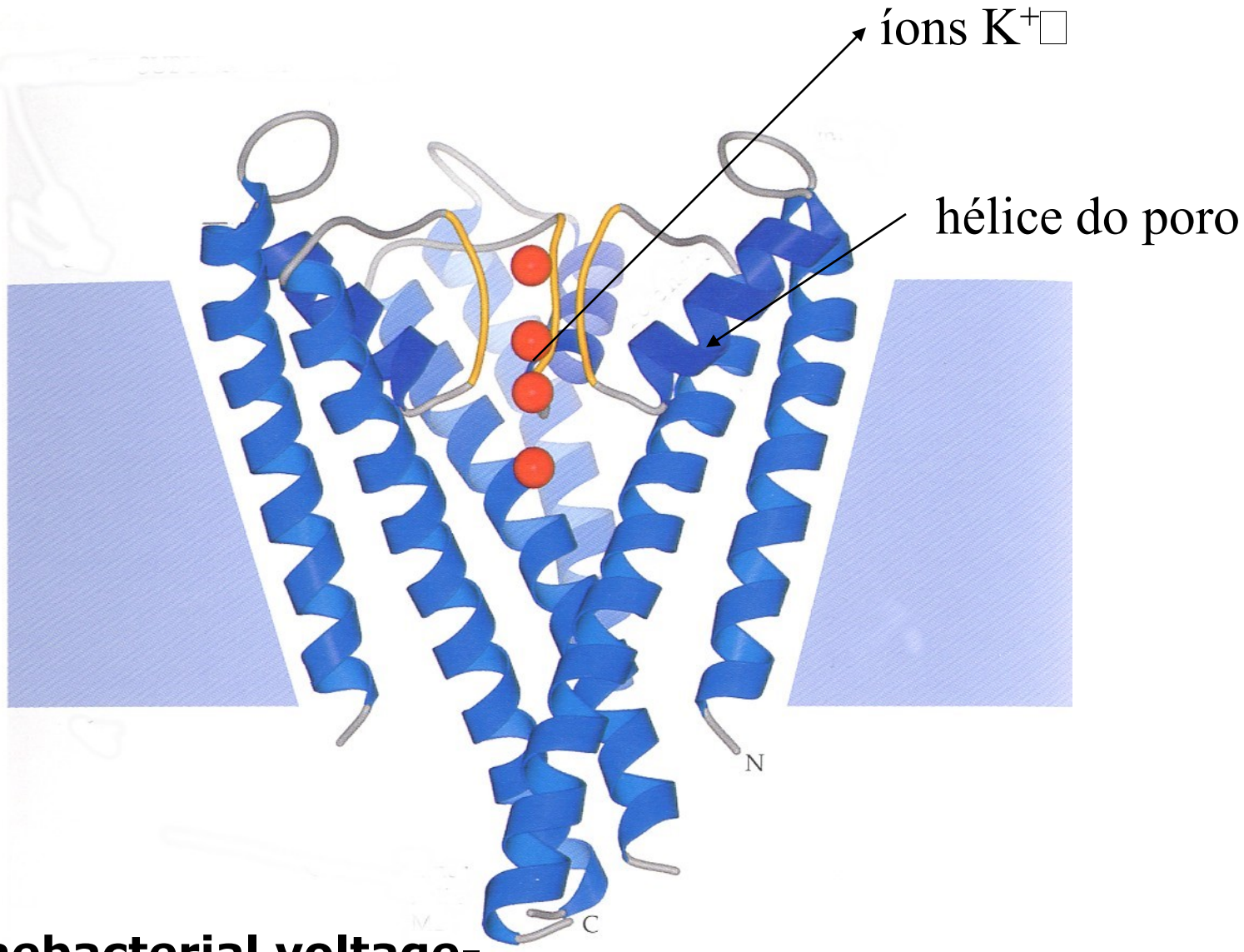
- Cristalografia e determinação da estrutura por difração de raios-X
  - KcsA e mThK- canais de potássio bacterianoa
  - MscL - canal mecanossenssitivo bacteriano
  - NaVb- canal de sódio bacteriano
  - Kv1.2 – canal de potássio sensível a voltage de mamíferos
  - GIRK – canal de potássio ativado por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

Reconstrução do receptor nicotínico de acetilcolina por microscopia eletrônica

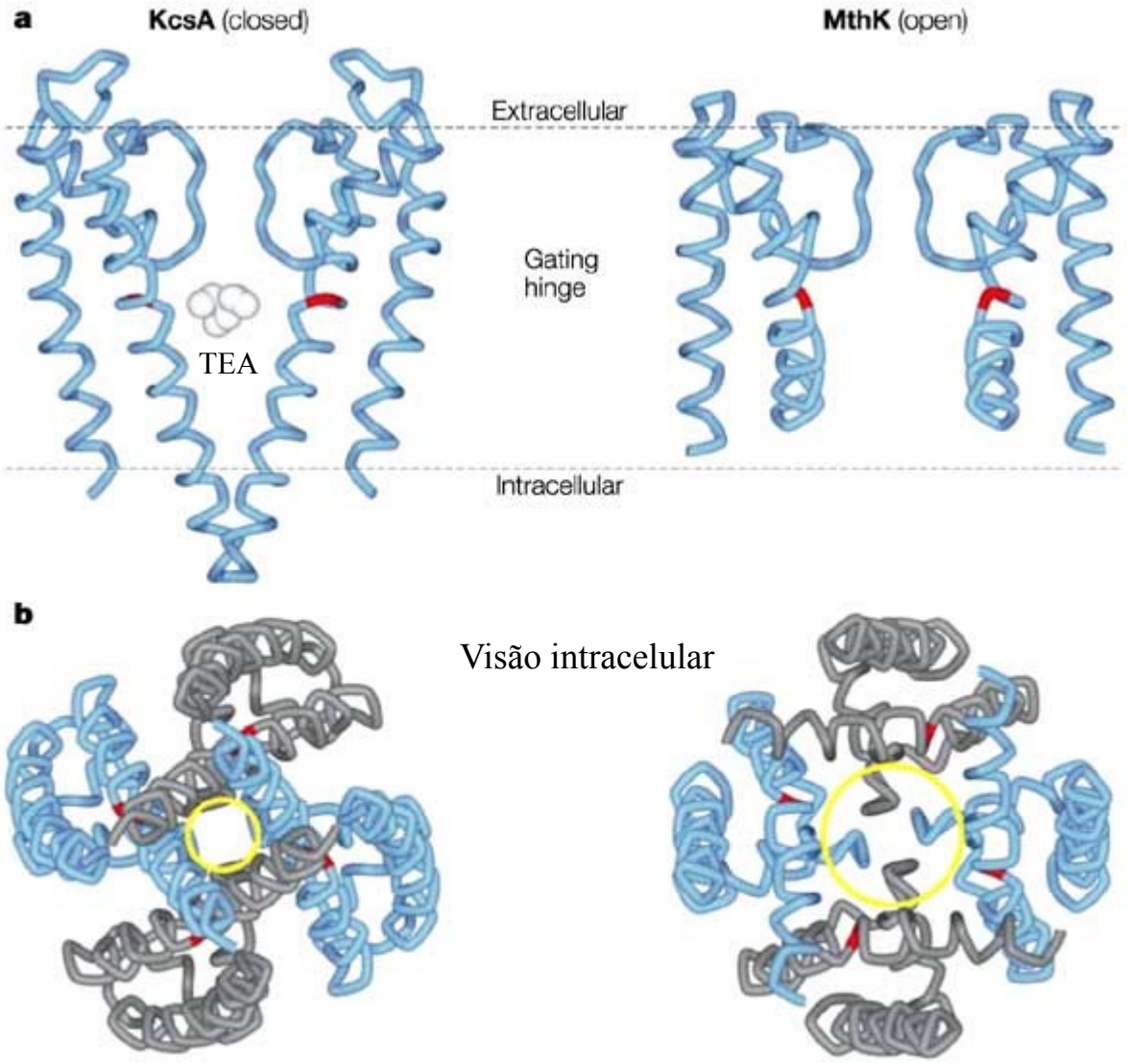




Estrutura do KcsA

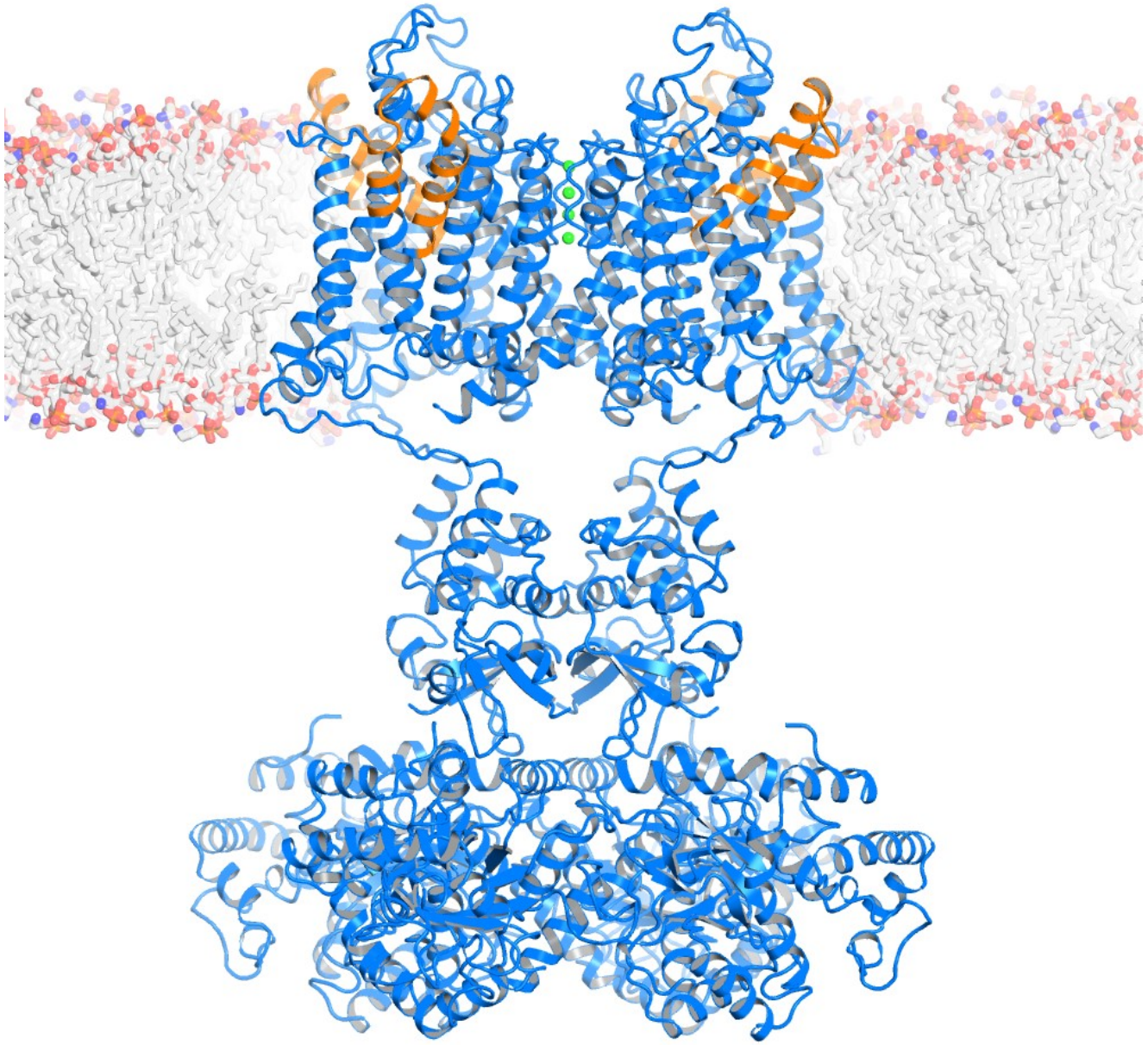


archaebacterial voltage-activated K^+ (Kv) channel


a
KcsA (closed)
MthK (open)
Extracellular
Gating
hinge
TEA
Intracellular
b
Visão intracelular
Nature Reviews | Neuroscience

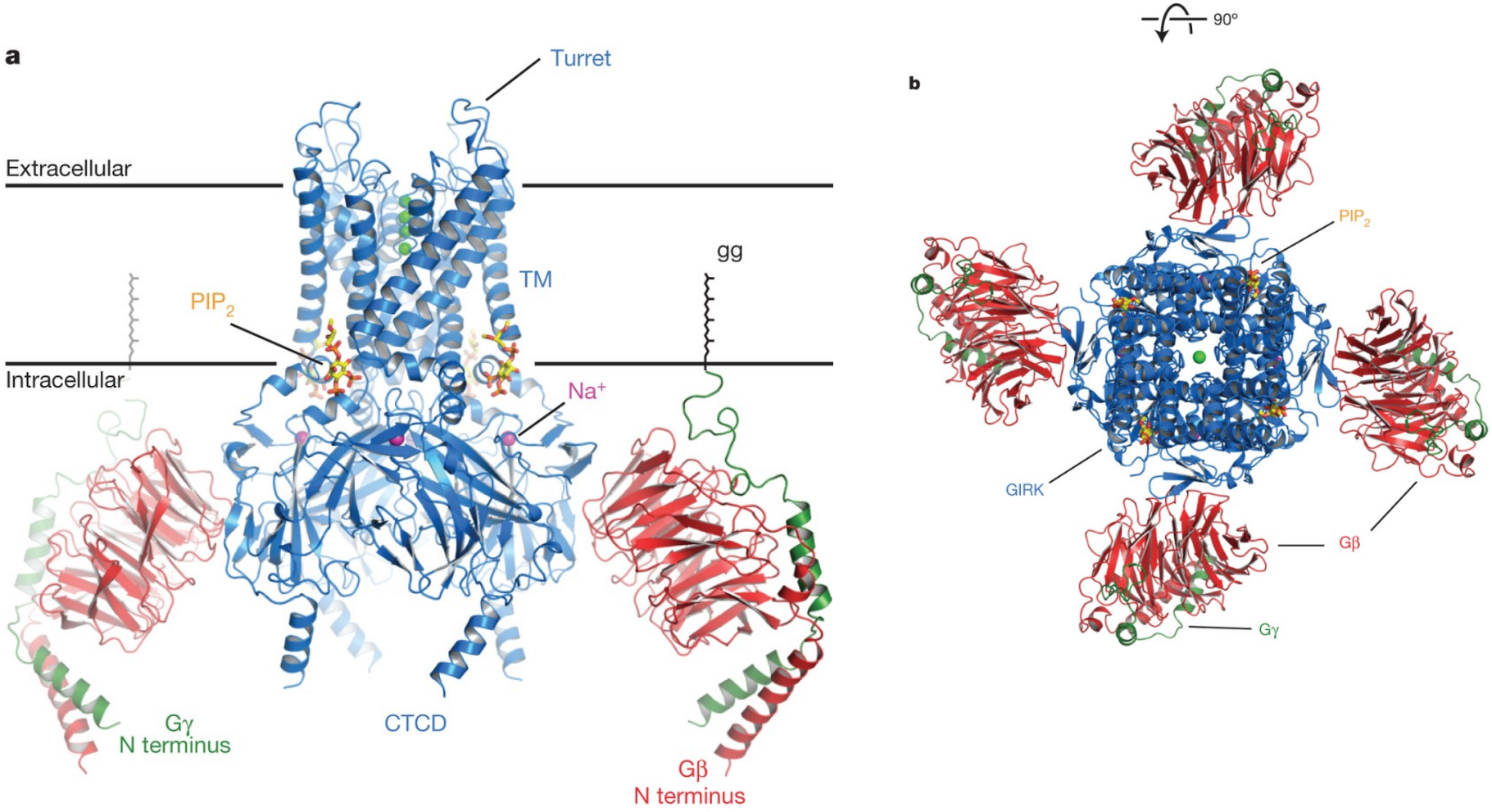
http://lab.rockefeller.edu/mackinnon/

Estrutura do canal $K_{v1.2}$

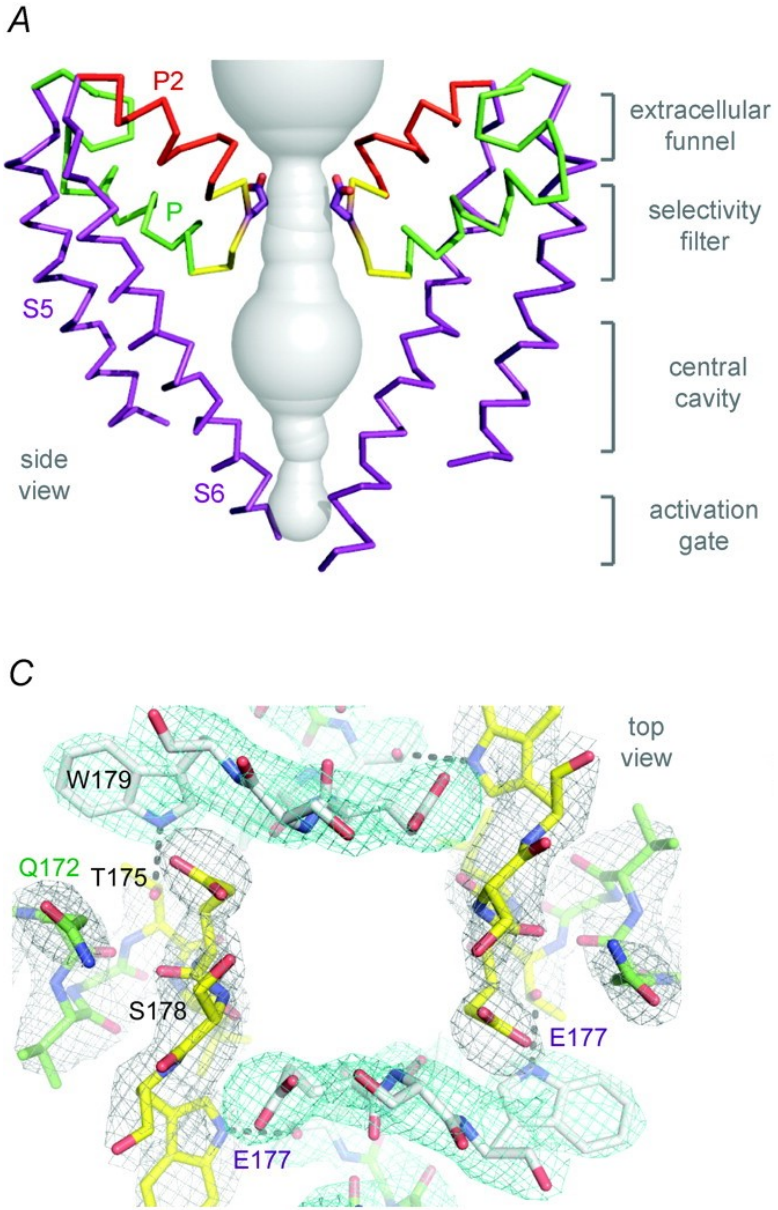
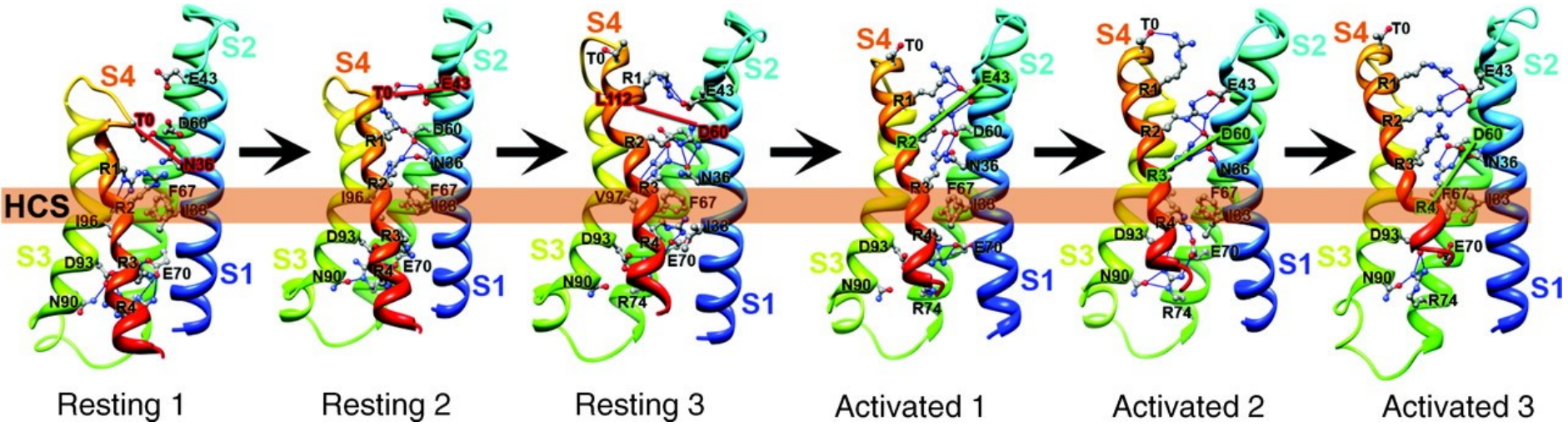


http://lab.rockefeller.edu/mackinnon/

Estrutura dos canais GIRK



Filtro de seletividade do Na_vb



Movimento do sensor de voltage do canal Na_vb