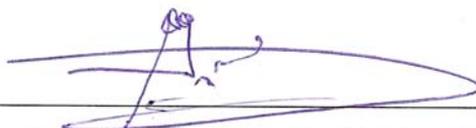


MODELO E SIMULAÇÃO DO COMPLEXO PALITOXINA-BOMBA DE Na/K

Antônio Márcio Rodrigues

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Aprovada por:



Prof. Antonio Fernando Catelli Infantosi, Ph.D.



Prof. Antônio Carlos Guimarães de Almeida, Ph. D.



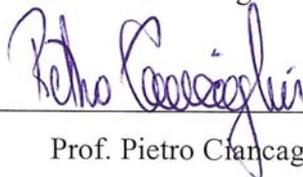
Prof. Jurandir Nadal, Ph. D.



Prof. Newton Gonçalves Castro, Ph. D.



Prof. José Wilson Magalhães Bassani, Ph. D.



Prof. Pietro Ciancaglini, Ph. D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

DEZEMBRO DE 2007

RODRIGUES, ANTÔNIO MÁRCIO

Modelo e Simulação do Complexo
Palitoxina-Bomba de Na/K [Rio de Janeiro]
2007

X, 147 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc.,
Engenharia Biomédica, 2007)

Tese – Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Modelagem de Fenômenos Biológicos

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

*Aos meus Pais Mateus e Auxiliadora e Irmãos
Eli, Regina e Fernando, que foram
imprescindíveis para a minha formação,
sempre dando apoio e acreditando em mim.*

*À minha Esposa Lucélia, por todo o carinho,
apoio e compreensão.*

*Aos meus Padrinhos Antônio-Carlos e Rosane
e o Filho Tom, cujas contribuições vão muito
além da realização deste trabalho.*

Agradecimentos

Aos meus orientadores Prof. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida e Prof. Antonio Fernando Catelli Infantosi, os quais foram fundamentais para a conclusão deste trabalho e para minha formação.

Aos amigos Mário, Hewerson, Simone, Gilcélío e Emerson, que sempre me auxiliaram quando precisei.

Aos amigos do LANECS, que sempre contribuíram para um ambiente de amizade e companheirismo no laboratório.

Às minhas cunhadas Rosângela e Lúcia e sobrinhas Bruna, Camila e Letícia, que completam e alegram minha família.

Aos pais de minha esposa, Nereo e Maria Helena, por compreenderem os dias que dediquei ao desenvolvimento desse trabalho na casa deles.

Ao Programa de Engenharia Biomédica (PEB/COPPE/UFRJ) e ao Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional (LANEC/DEPEB/UFSJ), por propiciarem as condições necessárias para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo indispensável auxílio financeiro.

...e agradeço a Deus, pela constante e fundamental presença em minha vida.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D. Sc.)

MODELO E SIMULAÇÃO DO COMPLEXO PALITOXINA-BOMBA DE Na/K

Antônio Márcio Rodrigues

Dezembro / 2007

Orientadores: Antonio Fernando Catelli Infantosi

Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Programa: Engenharia Biomédica

A bomba de Na/K é responsável pela manutenção dos gradientes iônicos transmembranar de Na^+ e K^+ , os quais são essenciais para várias funções celulares. Durante seu ciclo de transporte, a bomba promove o efluxo de 3 Na^+ , o influxo de 2 K^+ e a hidrólise de uma molécula de ATP. Descrevendo esse ciclo, o modelo de portas alternantes de Albers-Post considera a bomba como um canal iônico com duas portas, uma extra- e outra intracelular, que nunca se abrem simultaneamente. A palitoxina (PTX) induz canais iônicos na bomba de Na/K, para cátions monovalentes, permitindo os fluxos dissipativos de Na^+ e K^+ . Baseando no modelo de Albers-Post, foi proposto que a PTX causa a abertura simultânea das duas portas da bomba. Apesar das modificações causadas, evidências experimentais mostram que as reações de ATP, Na^+ e K^+ podem ocorrer mesmo para o complexo PTX-Na/K-ATPase. O objetivo deste trabalho é propor um modelo de reações para o complexo PTX-bomba de Na/K, com estrutura similar ao modelo de Albers-Post, para investigar o efeito da PTX sobre a Na^+/K^+ -ATPase. Utilizando um modelo matemático derivado a partir desse modelo de reações, foi possível simular manobras experimentais da literatura, contribuindo para a elucidação das interações da PTX com a bomba de Na/K e das interferências dos ligantes fisiológicos da bomba sobre essas interações. As simulações permitem inferir sobre os subestados e reações responsáveis pelo efeito da PTX reduzindo a fosforilação da enzima, aumento da afinidade da bomba à PTX promovido pela fosforilação e efeito inibidor do K^+ sobre a atuação da toxina. Além disso, o modelo foi usado para estudar o efeito da toxina durante a indução de atividades epileptiformes não-sinápticas, permitindo evidenciar a importância do efeito eletrogênico da bomba de Na/K durante esse tipo de atividade neuronal intensa.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D. Sc.)

MODEL AND SIMULATION OF THE Palytoxin-Na/K PUMP COMPLEX

Antônio Márcio Rodrigues

December / 2007

Advisors: Antonio Fernando Catelli Infantosi
Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Department: Biomedical Engineering

The Na/K pump is responsible for maintaining the Na^+ and K^+ ionic gradients through the cellular membrane, which are essential for several cell functions. During its transport cycle, the Na/K pump promotes the efflux of 3 Na^+ , the influx of 2 K^+ and ATP hydrolyzes. Describing this cycle, the alternating-gate model of the Albers-Post considers the Na/K pump as an ionic channel with two gates, one internal and other external, that never open simultaneously. The palytoxin (PTX) induces ionic channels through the Na/K pumps promoting the dissipative fluxes of monovalent cations such as Na^+ and K^+ . Regarding the Albers-Post's model, it was proposed that PTX causes the simultaneous aperture of the pump gates. Despite the structural modifications, experimental evidences show that ATP, Na^+ and K^+ reactions with the Na/K-ATPase can occur even when PTX is bound. The aim of this work is to propose a reaction model for the PTX-Na/K pump complex, with similar structure to the Albers-Post's model, to investigate the PTX effect on the Na/K-ATPase. Using a mathematical model derived from this reaction model, it was possible to simulate experimental maneuver from literature, aiming at contributing to elucidate the PTX interactions with the Na/K pump and the interferences of the physiological pump ligands on this interactions. The simulations allow inferring about the substates and reactions responsible for the PTX effect reducing the enzyme phosphorylation, affinity increase of the pump to PTX by phosphorylation and K^+ effect inhibiting the PTX action. Furthermore, the model was used to investigate the PTX action during non-synaptic epileptiform activity, allowing evidencing the importance of the electrogenic pump effect during this intense neuronal activity.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
I.1 - OBJETIVO	2
I.2 – MOTIVAÇÃO DO TRABALHO	2
I.3 – ESTRUTURA DO TRABALHO	3
CAPÍTULO II – A BOMBA DE NA/K	5
II.1 – CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA BOMBA DE NA/K	8
II.2 – CINÉTICA DAS REAÇÕES DO MODELO TEÓRICO DE ALBERS-POST	12
II.3 – SUBSTÂNCIAS QUE INTERFEREM NO FUNCIONAMENTO DA BOMBA DE NA/K	15
CAPÍTULO III – A PALITOXINA	18
III.1 – INTERAÇÕES ENTRE A PTX E A BOMBA DE NA/K	20
CAPÍTULO IV – INTERAÇÕES ENTRE O COMPLEXO PTX-BOMBA DE NA/K E OS ÍONS Na^+ E K^+	26
IV.1 - MÉTODOS	27
IV.1.1 – <i>Modelo de reações de Albers-Post</i>	27
IV.1.2 – <i>Modelo de reações para o complexo PTX-bomba de Na/K</i>	28
IV.1.3 – <i>Modelo Matemático</i>	29
IV.1.4 – <i>Implementação do modelo e simulação</i>	32
IV.2 - RESULTADOS	33
IV.2.1 – <i>Ativação da corrente induzida pela PTX</i>	33
IV.2.2 – <i>Decaimento da corrente induzida pela PTX na presença de K^+ extracelular</i>	35
IV.2.3 – <i>Decaimento da corrente induzida pela PTX na presença de Na^+ extracelular</i>	37
IV.2.4 – <i>Decaimento da corrente induzida pela PTX durante trocas de soluções de perfusão contendo Na^+ e K^+</i>	40
IV.3 - DISCUSSÃO	42
IV.3.1 – <i>Subestados da bomba de Na/K aos quais a PTX se liga</i>	43
IV.3.2 – <i>Influência do K^+ sobre as interações entre PTX e a bomba</i>	43
IV.3.3 – <i>Influência do Na^+ sobre as interações entre PTX e a bomba</i>	44
CAPÍTULO V – FOSFORILAÇÃO E DESFOSFORILAÇÃO DO COMPLEXO PTX-BOMBA DE NA/K	46
V.1 - MÉTODOS	46
V.1.1 – <i>Modelo de reações de Albers-Post</i>	46
V.1.2 – <i>Modelo de reações para a fosforilação e desfosforilação do complexo PTX-bomba de Na/K</i>	47
V.1.3 – <i>Modelo matemático</i>	49
V.1.4 – <i>Métodos e parâmetros do modelo</i>	51
V.2 - RESULTADOS	53
V.2.1 – <i>Efeito da PTX sobre a fosforilação da enzima Na/K-ATPase</i>	53
V.2.2 – <i>Aumento promovido pelo ATP da corrente induzida pela PTX</i>	56
V.2.3 – <i>Ativação da corrente induzida pela PTX na presença de ATP</i>	61
V.3 - DISCUSSÃO	65

CAPÍTULO VI – EFEITO INIBIDOR DO K⁺ SOBRE OS CANAIS INDUZIDOS PELA PTX	71
VI.1 - MÉTODOS	71
VI.1.1 – <i>Reações do modelo de Albers-Post</i>	72
VI.1.2 – <i>Modelo de reações para o complexo PTX-bomba de Na/K</i>	72
VI.1.3 – <i>Modelo matemático</i>	74
VI.1.4 – <i>Métodos e parâmetros do modelo</i>	76
VI.1.5 – <i>Análise de sensibilidade dos parâmetros</i>	77
VI.2 - RESULTADOS	79
VI.3 - DISCUSSÃO	87
CAPÍTULO VII – EFEITOS SIMULTÂNEOS DE K⁺ E DA FOSFORILAÇÃO SOBRE OS CANAIS INDUZIDOS PELA PTX.....	93
VII.1 - MÉTODOS.....	93
VII.1.1 – <i>Modelo de reações de Albers-Post</i>	94
VII.1.2 – <i>Modelo de reações para o complexo PTX-bomba</i>	94
VII.1.3 – <i>Modelo matemático</i>	96
VII.1.4 – <i>Métodos e parâmetros do modelo</i>	98
VII.2 - RESULTADOS.....	100
VII.2.1 – <i>Ativação da corrente induzida nas presenças de Na⁺ extracelular e K⁺ e ATP intracelular</i>	100
VII.2.2 – <i>Decaimento da corrente induzida promovido por K⁺ extracelular</i>	104
VII.3 – <i>Ativação da corrente induzida nas presenças de K⁺ extracelular e Na⁺ e ATP intracelular</i>	109
VII.3 - DISCUSSÃO	112
CAPÍTULO VIII – EFEITO DA PTX DURANTE A INDUÇÃO DE ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO-SINÁPTICAS.....	116
VIII.1 – <i>MODELO MATEMÁTICO PARA ATIVIDADES EPILEPTIFORMES SUSTENTADA POR CONEXÕES NÃO-SINÁPTICAS</i>	119
VIII.2 - MÉTODOS	124
VIII.2.1 - <i>Inclusão do efeito da PTX no modelo matemático para atividades epileptiformes não-sinápticas</i>	124
VIII.2.2 – <i>Parâmetros do modelo e simulações</i>	127
VIII.3 - RESULTADOS	129
VIII.4 - DISCUSSÃO	136
CAPÍTULO IX – CONCLUSÃO	138
TRABALHOS PUBLICADOS.....	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
PTX	Palitoxina
Kd_w	Constante de dissociação da substância w (mM)
ATP_bE2	Enzima com a porta intracelular aberta e ligada a ATP por meio de sítios de baixa afinidade
E1	Enzima livre com a porta intracelular aberta
ATP_aE1	Enzima com a porta intracelular aberta e ligada a ATP por meio de sítios de alta afinidade
Na^+_3E1	Enzima com a porta intracelular aberta e ligada a 3 Na^+
ATP_bPE2	Enzima fosforilada, ligada a ATP por meio de sítios de baixa afinidade e com a porta extracelular aberta
ATP_bPE1	Enzima fosforilada, ligada a ATP por meio de sítios de baixa afinidade e com a porta intracelular aberta
PE2	Enzima fosforilada com a porta extracelular aberta
$(K^+)_2E2$	Enzima com as duas portas fechadas e contendo 2 K^+ oclusos
$(Na^+)_2E2$	Enzima com as duas portas fechadas e contendo 2 Na^+ oclusos
E2	Enzima livre com a porta extracelular aberta
$ATP_b(K^+)_2E2$	Enzima com as duas portas fechadas, contendo 2 K^+ oclusos e ligada a ATP por meio de sítios de baixa afinidade
PTXE	Complexo PTX-Na/K-ATPase
PTXE*	Complexo PTX-Na/K-ATPase afinidade à PTX maior do que PTXE
PTXATP _b E*	Complexo PTX-Na/K-ATPase ligado a ATP por meio de sítios de baixa afinidade
PTXATP _a E	Complexo PTX-Na/K-ATPase ligado a ATP por meio de sítios de alta afinidade
PTXATP _b PE	Complexo PTX-Na/K-ATPase fosforilado e ligado a ATP por meio de sítios de baixa afinidade
PTXPE	Complexo PTX-Na/K-ATPase fosforilado
PTX(K^+) ₂ E	Complexo PTX-Na/K-ATPase com 2 K^+ oclusos
PTX(Na^+) ₂ E	Complexo PTX-Na/K-ATPase com 2 Na^+ oclusos

Símbolo	Descrição
$PTXATP_b(K^+)_2E2$	Complexo PTX-Na/K-ATPase com as duas portas fechadas, contendo 2 K^+ oclusos e ligada a ATP por meio de sítios de baixa afinidade
$[w]$	Concentração de w
α_j	Constante da taxa do sentido direto da reação j
β_j	Constante da taxa do sentido reverso da reação j
P_{ion}^{PTX}	Permeabilidade dos canais induzidos pela PTX, em cm/s, para o ion (Na^+ ou K^+)
γ	Constante de proporcionalidade (cm/s)
$P_{o,n}$	Probabilidade de abertura do canal induzido no subestado $n = 1$ (PTXE), 2 (PTXATP _a E), 3 (PTXPE), 4 (PTXE*), 5 (PTXATP _b PE) ou 6 ((PTXATP _b E*).
z_{ion}	Valência do ion
F	Constante de Faraday (96,487 C/mMol)
R	Constante universal dos gases (8,314 mV.C/(K.mMol))
T	Temperatura absoluta (K)
V_m	Potencial transmembranar (mV)
J	Densidade de corrente (mA/cm ²)
Δt	Passo de iteração (1×10^{-5} s)

Capítulo I – Introdução

Os gradientes iônicos através da membrana celular são necessários para as atividades celulares, pois provêm energia para várias funções celulares essenciais, tais como os transportes ativos secundários de aminoácidos, açúcares, neurotransmissores, íons, além da regulação de volume e outras. A bomba de Na/K (Na/K-ATPase) é um dos responsáveis pelo estabelecimento e manutenção desses gradientes eletroquímicos em células animais. Essa enzima, ligada à membrana plasmática, transporta 3 Na⁺, a partir do meio intracelular, e 2 K⁺, a partir do meio extracelular, através da membrana, utilizando para tal a energia liberada da hidrólise de uma molécula de ATP (POST *et al.*, 1972; RAKOWSKI *et al.*, 1989; CORNELIUS; 1999).

Atualmente, o entendimento da cinética da bomba de Na/K é traduzido pelo modelo de portas alternadas do ciclo de Albers-Post (ALBERS *et al.*, 1963; POST *et al.*, 1965; POST *et al.*, 1972; TANIGUCHI e POST, 1975; LAÜGER, 1979). De acordo com esse modelo, o transporte de Na⁺ e K⁺ de forma acoplada resulta da reação desses íons com a Na/K-ATPase. De forma resumida, é suposta a existência de uma porta externa e outra interna, uma em cada face da cavidade em que se encontram os sítios de ligação de Na⁺ e K⁺. Essas duas portas devem abrir e fechar alternadamente, evitando fluxos dissipativos de Na⁺ e K⁺. A enzima Na/K-ATPase alterna entre dois estados conformacionais principais: E1 e E2. No primeiro estado, com a porta interna aberta e o ATP ligado a seu sítio de alta afinidade, a ligação de 3 íons Na⁺ induz a hidrólise da ATP. Assim, a enzima é fosforilada e ocorre a oclusão dos 3 Na⁺. Espontaneamente, a enzima transita para o estado E2, ocorrendo a abertura da porta extracelular e a liberação dos íons Na⁺. Em seguida, 2 K⁺ são ocluídos e a enzima é desfosforilada. Também por mudança espontânea, facilitada pela reação de ATP, a porta interna se abre e os 2 K⁺ são liberados no citoplasma. A ciclicidade deste mecanismo bombeia Na⁺ para o meio extracelular e K⁺ para o meio intracelular. Esse modelo prevê também o funcionamento de forma reversa da bomba de Na/K.

A hipótese de que a bomba de Na/K poderia ser vista como um canal iônico com duas portas alternantes, proposta por LAÜGER (1979), começou a ser suportada experimentalmente desde a descoberta da ação da palitoxina (PTX) sobre a bomba de Na/K. Essa toxina, extraída de corais do gênero *Palythoa*, é capaz de induzir um canal iônico não seletivo, para cátions monovalentes (tais como Na⁺, K⁺, Cs⁺, etc.), através da

bomba de Na/K (HABERMAN, 1989). De acordo com ARTIGAS e GADSBY (2004) e HORISBERGER (2004), o entendimento das interações entre a PTX e a Na/K-ATPase auxiliará nos estudos da estrutura dessa enzima e dos mecanismos das portas da bomba que alternadamente causam a oclusão e desocclusão dos íons transportados através da membrana.

Apesar das modificações causadas pela PTX na bomba de Na/K, evidências experimentais mostram que as reações de ATP, Na⁺ e K⁺ podem ocorrer mesmo para o complexo PTX-Na/K-ATPase (ISHIDA *et al.*, 1983; GREEL *et al.*, 1988; WANG e HORISBERGER, 1997). Além disso, foi demonstrado que a afinidade da PTX em relação a Na/K-ATPase é influenciada pela fosforilação da enzima e pela oclusão de K⁺. Em contrapartida, a PTX também interfere no subestado fosforilado e na afinidade do K⁺ (TOSTESON *et al.*, 2003; ARTIGAS e GADSBY, 2002, 2003a, 2003b, 2004). Contudo, as reações envolvidas na fosforilação do complexo PTX-Na/K-ATPase e em suas interações com Na⁺ e K⁺ ainda não estão bem estabelecidas e é razoável esperar que essas reações devem constituir um sistema complexo.

1.1 - Objetivo

O objetivo deste trabalho é propor um modelo de reações para o complexo PTX-bomba de Na/K, com estrutura similar ao modelo de Albers-Post e, assim, contribuir para um melhor entendimento do efeito da PTX sobre a enzima Na/K-ATPase.

1.2 – Motivação do trabalho

Durante a pesquisa de dissertação de mestrado, foi proposto um modelo eletroquímico para a camada granular do giro denteado, que era capaz de reproduzir várias características das descargas epileptiformes não-sinápticas, tais como variações dos potenciais e concentrações iônicas, nos meios intra e extracelulares (RODRIGUES, 2003). Por meio de simulações computacionais com esse modelo, foi observado que o efeito eletrogênico da bomba de Na/K é essencial para o término de cada descarga epileptiforme. Quando esse efeito da bomba não era considerado nas simulações, uma vez deflagrada uma descarga epileptiforme, o sistema não era capaz de se recuperar e, conseqüentemente, tendia para um estado em que os gradientes iônicos

transmembranares tornavam-se nulos em regime permanente. Para representar o efeito eletrogênico da bomba de Na/K, o modelo do potencial transmembranar deveria incluir um termo, referente a esse efeito, mas que ainda permitisse explicitar o potencial. Para tanto, as análises mostraram que seria necessário interpretar a corrente gerada pela bomba como uma corrente de um canal iônico. Matematicamente, isso foi possível considerando a movimentação transmembranar de um íon fictício que representasse o saldo monovalente e positivo de 3 Na⁺ contra 2 K⁺. Posteriormente, essa concepção matemática foi reforçada por revisões feitas sobre modelos da bomba de Na/K, identificando propostas que interpretavam a bomba como um canal iônico (LAUGÉR, 1979). Além disso, evidências experimentais recentes envolvendo a PTX demonstraram que é possível induzir canais iônicos através da enzima Na/K-ATPase (ARTIGAS e GADSBY, 2002, 2003a, 2003b e 2004). Essas medidas da interação da PTX com a bomba de Na/K constituem um forte suporte para suspeitas de que a conformação geométrica da estrutura molecular da bomba deva ser similar a um canal iônico, como já mencionado anteriormente, com duas portas alternantes.

As ações interferentes da PTX sobre a bomba de Na/K, bloqueando sua atividade e induzindo canais, despertaram o interesse de estudar sua atuação sobre eventos epileptiformes sustentados por conexões não-sinápticas. Pensando dessa forma, a pesquisa da tese de doutorado foi direcionada para desenvolver um modelo matemático baseado em reações químicas, para descrever a atuação dessa toxina sobre a Na/K-ATPase. Esse modelo poderia ser incorporado ao modelo desenvolvido por RODRIGUES (2003) para simular a atuação da PTX durante as atividades epileptiformes não-sinápticas. Além disso, contribuiria para o entendimento das interações da PTX com a bomba de Na/K, as quais ainda não estão totalmente esclarecidas na literatura.

1.3 – Estrutura do trabalho

O modelo de reações proposto para investigar o efeito da PTX sobre a bomba de Na/K envolve um grande número de reações. Para tornar mais clara a sua descrição, o modelo foi dividido em partes, as quais foram separadas em capítulos diferentes da tese. O texto da tese encontra-se estruturado como descrito nos parágrafos seguintes.

No Capítulo II, é feita uma revisão sobre a bomba de Na/K, enfocando a evolução temporal do entendimento desse mecanismo de transporte iônico, as suas características estruturais e funcionais e as substâncias que interferem em seu funcionamento.

O Capítulo III consiste de uma revisão sobre a PTX, apresentando suas características estruturais e interações com a bomba de Na/K.

No Capítulo IV, é proposto um modelo para as interações entre PTX e a bomba de Na/K na ausência de ATP.

No Capítulo V, considerando a presença de ATP no meio intracelular, é proposto um modelo de reações para a fosforilação e desfosforilação do complexo PTX-bomba de Na/K.

No Capítulo VI, são estudadas as interações entre o K^+ e o complexo PTX-bomba de Na/K, na presença de ATP intracelular. O modelo proposto nesse capítulo não inclui o íon Na^+ e, portanto, não descreve a fosforilação da bomba.

No Capítulo VII, os modelos propostos nos capítulos anteriores são reunidos para investigar os efeitos conjuntos do K^+ e da fosforilação sobre o complexo PTX-bomba de Na/K.

O Capítulo VIII consiste de uma aplicação do modelo investigando o efeito da PTX durante a indução de atividades epileptiformes não-sinápticas, no hipocampo do cérebro de rato.

Finalmente, no Capítulo IX, é apresentada a conclusão, enfatizando os principais resultados obtidos e contribuições do modelo.

Capítulo II – A bomba de Na/K

Atualmente, existe muita informação referente aos transportes de íons através de membranas biológicas. O progresso no entendimento desses mecanismos de transporte iônico se deve, originalmente, a trabalhos de alguns poucos pesquisadores. Esses trabalhos questionam as origens de fenômenos simples relacionados com a distribuição iônica. Os experimentos relatados indicam a existência de um mecanismo que transporta íons ativamente contra seus respectivos gradientes eletroquímicos. Dean mostra, em 1941, por meio de experimentos, que íons Na^+ do interior de fibras musculares são trocados por Na^+ radioativos adicionados ao meio extracelular. Posteriormente, foi observado que os gradientes de Na^+ e K^+ são mantidos por um processo cíclico que absorve K^+ e causa a extrusão de Na^+ (HODGKIN e KEYNES, 1955). Como ainda não é totalmente compreendida, a bomba de Na/K é um mecanismo que está no centro das atenções, mesmo após vários anos de investigações (SCHEINER-BOBIS, 2002).

Em geral, as atividades celulares requerem gradientes iônicos através da membrana celular. As células usam esses gradientes eletroquímicos para obter nutrientes iônicos ou não-iônicos, que estão no meio extracelular, e para eliminar substâncias metabolizadas e íons de seus interiores. A bomba de Na/K é responsável pelo estabelecimento e manutenção desses gradientes eletroquímicos nas células animais. Essa bomba fica disposta através da membrana celular e transporta Na^+ e K^+ , contra seus respectivos gradientes de concentração, usando energia provinda da hidrólise de ATP. Além disso, apresenta outras funções tais como contribuir para a manutenção do potencial transmembranar e, conseqüentemente, para a comunicação neuronal e regulação osmótica do volume celular (GLITISCH, 2001; SCHEINER-BOBIS, 2002).

Embora a existência desse mecanismo preferencial de acumulação iônica nas células seja conhecida há mais de um século, somente em 1957 SKOU (1957) identificou a Na/K-ATPase como sendo a enzima responsável pelo bombeamento seletivo de íons através das membranas celulares e pelo estabelecimento dos gradientes iônicos transmembranares.

A partir de 1957, inúmeros são os trabalhos desenvolvidos com ênfase no estudo da bomba de Na/K. Dentre os grupos de pesquisa, destacam-se os de Albers e Post, nas décadas de 60 e 70. Esses pesquisadores mediram a atividade da bomba de Na/K em

função das concentrações de Na^+ , K^+ e ATP e, então, propuseram seqüências de reações para explicar a cinética do bombeamento dos íons (ALBERS *et al.*, 1963; POST *et al.*, 1965; POST *et al.*, 1972; POST *et al.*, 1975; TANIGUCHI e POST, 1975; HOBBS *et al.*, 1980). O modelo teórico derivado desses trabalhos, denominado modelo de Albers-Post, resumidamente, considera que o bombeamento iônico possui a seguinte dinâmica: (i) a reação de íons Na^+ e ATP com uma mesma enzima, na face intracelular, leva à hidrólise da molécula de ATP; (ii) conseqüentemente, ocorre a fosforilação da enzima, o desprendimento de uma molécula de ADP e, posteriormente, a liberação dos íons Na^+ na face extracelular; (iii) os íons K^+ reagem na face extracelular ficando oclusos na enzima e causando a liberação do P; (iv) posteriormente, ocorre a liberação dos íons K^+ no meio intracelular, por relaxação espontânea ou induzida pela reação de ATP. A ocorrência sucessiva dessas reações de modo cíclico promove o efluxo de Na^+ e o influxo de K^+ , caracterizando o bombeamento iônico promovido pela bomba.

Nas décadas de 60 e 70, surgem também evidências experimentais que mostram o efeito eletrogênico da bomba de Na/K (THOMAS, 1968; PIETRZYK *et al.*, 1978). THOMAS (1968) demonstrou que a injeção de Na^+ intracelular em neurônios de caracol, por ativar a bomba de Na/K, causa hiperpolarizações, de cerca de 15 mV, na membrana celular, às quais se deve associar o efeito eletrogênico da bomba de Na/K ao transportar Na^+ e K^+ em sentidos opostos, na razão de 3 para 2, respectivamente. Além disso, observa que a bomba de Na/K, em neurônios de caracol, contribui com cerca de 2 mV para a polarização da membrana celular durante o repouso. PIETRZYK *et al.* (1978), incorporando o efeito da bomba de Na/K na equação de Goldman-Hodgkin-Katz de potencial, mostram, em concordância com os achados de THOMAS (1968), que a contribuição da bomba para o potencial transmembranar de repouso é pequena, razão pela qual poucos pesquisadores atentam para esse efeito.

Apesar de contribuírem para o entendimento do funcionamento da bomba, até a década de 70, os trabalhos não permitem entender sua estrutura. LÄUGER (1979) sugere que a bomba de Na/K pode ser vista como um canal iônico modificado com duas portas. Nesse caso, foram supostas duas portas, uma porta externa e a outra interna, e que suas aberturas permitem ligações de Na^+ ou K^+ em sítios na enzima Na/K-ATPase. Além disso, foi admitido que as portas nunca se abrem simultaneamente, evitando o influxo de Na^+ e o efluxo de K^+ .

Na década de 80, surgem trabalhos detalhando a cinética do funcionamento da bomba de Na/K, possibilitando a estimativa de várias constantes das reações de Na^+ , K^+ ,

ATP, ADP e P com enzimas (Na,K)-ATPase, em diferentes tipos de células de várias espécies (BEAUGÉ e Di POLO, 1981; BRAND e WHITTAM, 1985; FORBUSH, 1987; FENDLER *et al.*, 1987; RAKOWSKI *et al.*, 1989; NAKAO e GADSBY, 1989). Esses trabalhos mostram que a bomba de Na/K apresenta cinética de funcionamento semelhante para os diferentes tecidos celulares e para as várias espécies estudadas, apesar de possuir valores diferentes para as constantes que descrevem afinidades e mudanças de estados. Os trabalhos de RAKOWSKI *et al.* (1989) e NAKAO e GADSBY (1989) se destacam por estudarem também o comportamento da corrente da bomba em função do potencial transmembranar, mostrando que a atividade da bomba diminui para potenciais mais negativos. Ainda nessa década, além de ocorrer a primeira clonagem da enzima Na/K-ATPase (SHULL *et al.*, 1985), surgem as primeiras evidências experimentais de ser possível induzir canais iônicos através da bomba de Na/K (MURAMATSU *et al.*, 1988; HABERMAN, 1989). O estudo do efeito da palitoxina (PTX), que é uma toxina extraída de corais do gênero *Palythoa*, mostra que essa substância, além de bloquear a bomba de Na/K, era capaz de induzir canais iônicos para cátions monovalentes através das enzimas Na,K-ATPase.

No início da década de 90, alguns trabalhos caracterizam com detalhes as diversas reações que ocorrem durante o bombeamento iônico (CAMPOS e BEUAGÉ, 1992; ROSSI e NORBY, 1993; CAMPOS e BEUAGÉ, 1994; HEYSE *et al.*, 1994). Dentre esses trabalhos, o de HEYSE *et al.* (1994) merece destaque. Experimentos envolvendo fluorescência e corantes para caracterizar várias reações parciais das enzimas da bomba de Na/K levam a um modelo, baseado na dinâmica de Albers-Post, para reproduzir a maioria das características de transporte iônico da bomba com um único conjunto de parâmetros cinéticos. Ainda na mesma década, observa-se o surgimento de vários trabalhos que apontam para o estudo dos mecanismos funcionais e moleculares da bomba de Na/K por meio de experimentos envolvendo a PTX (FRELIN *et al.*, 1995; SCHEINER-BOBIS e SCHNEIDER, 1997; WANG e HORISBERGER, 1997; HIRSH e WU, 1997; ICHIDA *et al.*, 1999).

Recentemente, ARTIGAS e GADSBY (2002, 2003a, 2003b e 2004), TOSTESON *et al.* (2003) e HARMEL e APELL (2006), com uma série de experimentos sobre a indução de canais pela PTX, mostram que as enzimas Na/K-ATPase, apesar de apresentarem canais iônicos na presença de PTX, ainda podem ser moduladas pelas reações de Na⁺, K⁺ e ATP. Esse fato de que o complexo PTX-Na/K-ATPase pode interagir com os ligantes da bomba faz com que a PTX seja uma

ferramenta útil para caracterizar os caminhos de movimentação iônica, bem como as estruturas e mecanismos das portas da bomba de Na/K (ARTIGAS e GADSBY, 2006; REYSE e GADSBY, 2006). No entanto, para que a PTX possa ser mais bem explorada nesse tipo de investigação, a interação entre essa toxina e a bomba ainda tem que ser entendida com mais detalhes. Apesar dos inúmeros trabalhos, nenhum deles sugere um modelo teórico consistente de como a PTX interage com a bomba de Na/K.

II.1 – Características estruturais e funcionais da bomba de Na/K

A enzima Na/K-ATPase faz parte de um grupo de enzimas da família P-ATPase, constituído por proteínas transmembranares caracterizadas por seqüências específicas relacionadas à função de hidrólise do ATP e à presença de vários domínios hidrofóbicos supostos formarem α -hélices transmembranares. As enzimas P-ATPase, durante o ciclo funcional, são caracterizadas por uma fosforilação transiente: o γ -fosfato do ATP é transferido para um resíduo aspartato que constitui um sítio de fosforilação, presente na enzima (HORISBERGER, 2004). Essas enzimas P-ATPase são encontradas praticamente em todas células eucariontes e também em bactérias, sendo responsáveis pelo transporte de uma grande variedade de íons (APELL, 2001). Recentemente, por meio do uso da cristalografia por raio-x, o entendimento da estrutura molecular da bomba de Ca^{2+} do retículo endoplasmático avançou substancialmente. Em razão de semelhanças estruturais, esses avanços contribuem para a compreensão das estruturas da bomba de Na/K e outros membros da família P-ATPase (OGAWA e TOYOSHIMA, 2002; HILGEMANN *et al.*, 2003; TOYOSHIMA *et al.*, 2004). Contudo, os mecanismos do transporte iônico ainda não são bem conhecidos (HORISBERGER, 2004).

A bomba de Na/K pertence a um subgrupo de enzimas oligômeras constituído de subunidades α e β (Figura II.1) que têm sido identificadas em vários tecidos de inúmeras espécies. Geralmente, é demonstrado que a função da Na/K-ATPase depende de ambas as subunidades. A subunidade α , que é a subunidade catalítica, tem uma massa molecular relativa de 100 – 113 kDa, dependendo da isoforma: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ou $\alpha 4$. Essa subunidade atravessa a membrana 10 vezes formando domínios transmembranares (M1 a M10) e possui os dois segmentos terminais NH_2 e COOH localizados na face citoplasmática. Vários trabalhos têm indicado que tanto a ligação de ATP quanto a

occlusão dos íons ocorrem nessa subunidade (SCHEINER-BOBIS, 2002; OGAWA e TOYOSHIMA, 2002; APELL, 2004).

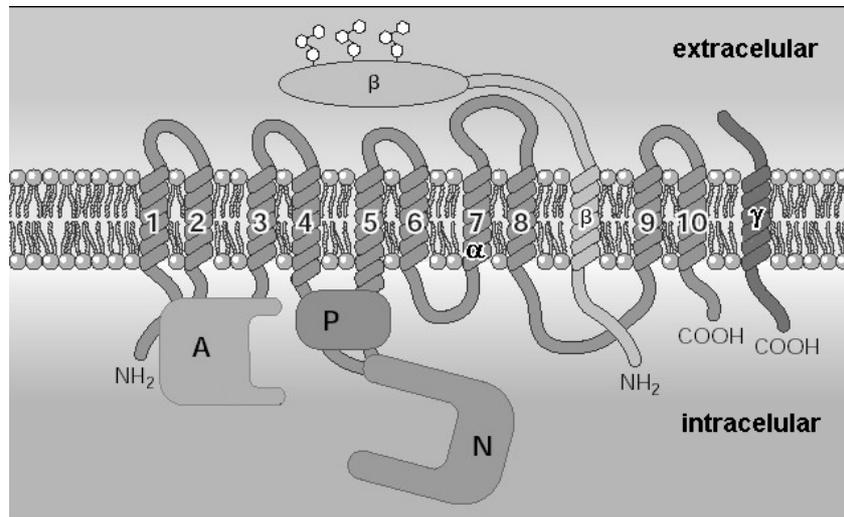


Figura II.1: Estrutura da enzima Na/K-ATPase. A enzima apresenta duas subunidades, α e β , que podem ou não se ligar a uma terceira subunidade γ . Os segmentos transmembranares 1 a 10 correspondem aos segmentos M1 a M10 da subunidade α , A é o domínio ativador, P, domínio de fosforilação e N é o domínio de nucleotídeos. Na subunidade β , são mostrados 3 sítios de ligação de glicosídeos. Apesar dos segmentos estarem dispostos em duas dimensões apenas, na realidade, formam um feixe tridimensional em torno dos segmentos centrais M4, M5 e M6 (extraído de HORISBERGER, 2004).

A subunidade β é altamente glicosilada e tem uma massa molecular relativa de cerca de 60 kDa. A massa da metade protéica dessa subunidade é 36-38 kDa, dependendo da isoforma ($\beta 1$, $\beta 2$ ou $\beta 3$). A subunidade β atravessa a membrana somente uma vez e o segmento terminal NH_2 é localizado na face citoplasmática. As funções dessas proteínas ainda não são totalmente entendidas. Recentemente, resultados têm indicado que a subunidade β apresenta contato direto com a subunidade α , estabilizando-a e auxiliando em seu transporte para a membrana celular, a partir do retículo endoplasmático. Em adição, vários experimentos têm mostrado que a subunidade β é importante para a hidrólise do ATP, o transporte iônico e a ligação de inibidores tais como a ouabaína (SCHEINER-BOBIS, 2002; HORISBERGER, 2004).

Na Figura II.1, os dez segmentos da subunidade α estão representados em um mesmo plano, embora formem um feixe transmembranar no entorno dos três segmentos

centrais M4, M5 e M6. O domínio ativador *A* é constituído pelo segmento terminal NH₂, que precede o primeiro segmento transmembranar, juntamente com o trecho que une os segmentos M2 e M3. Esse domínio está envolvido na desfosforilação da enzima. O domínio de fosforilação *P* é constituído das partes proximal e distal do trecho intracelular entre os segmentos M4 e M5. Na secção inicial desse domínio, existe um resíduo aspartil, para o qual o fosfato do ATP é transferido transitoriamente. O domínio do nucleotídeo (*N*) é composto da parte principal do trecho entre os segmentos M4 e M5 e forma um tipo de compartimento para a ligação de ATP. A subunidade β tem apenas um segmento transmembranar, um terminal intracelular NH₂ curto e um domínio extracelular com vários sítios de ligação de glicosídeos (são mostrados 3). Nesse esquema, o segmento transmembranar da subunidade β foi disposto nas proximidades dos segmentos M7 e M8 porque é admitido que a parte anterior do domínio extracelular dessa subunidade β interage com a subunidade α , no trecho entre os segmentos M7 e M8 (HORISBERGER, 2004).

As subunidades α e β ainda podem se associar a uma terceira subunidade, referida como subunidade γ . Em alguns tecidos, essa subunidade parece estar envolvida na regulação da atividade da bomba de Na/K e na sua interação com os íons Na⁺ e K⁺. No entanto, não é identificada em todos os tecidos e, além disso, não é essencial para as atividades da bomba de Na/K em sistemas de expressão exógena da enzima (SCHEINER-BOBIS e FARLEY, 1994). A subunidade γ apresenta massa molecular de 7-11 kDa e foi identificada como uma componente envolvida na ligação da [³H]ouabaína. Acredita-se que essa subunidade associa-se com a bomba de Na/K via interações com a extremidade C da subunidade α (HORISBERGER, 2004).

Funcionalmente, a bomba de Na/K é considerada como tendo dois estados conformacionais principais, E1 e E2. Esses estados são identificados por diferentes afinidades a Na⁺, K⁺ e ATP e pelas disposições das hélices da subunidade α (OGAWA e TOYSHIMA, 2002; APELL, 2004). Além disso, apresentam vários subestados e as transições entre esses subestados, que (em condições normais) levam a transições entre E1 e E2, estão associadas à hidrólise do ATP e ao bombeamento de 3 Na⁺ para a face extracelular e 2 K⁺ para o citoplasma, conforme descrito pelas reações do modelo proposto de Albers-Post. Seguindo a proposta de LAUGER (1979), no diagrama da Figura II.2, a bomba de Na/K está representada por um canal iônico com duas portas, uma na face intracelular e a outra na face extracelular. Apesar do diagrama apresentar

somente seis subestados conformacionais, o ciclo funcional da bomba pode incluir vários outros subestados (HEYSE *et al.*, 1994; HORISBERGER, 2004). As mudanças entre esses estados são representadas, no diagrama, pelas reações do modelo de Albers-Post.

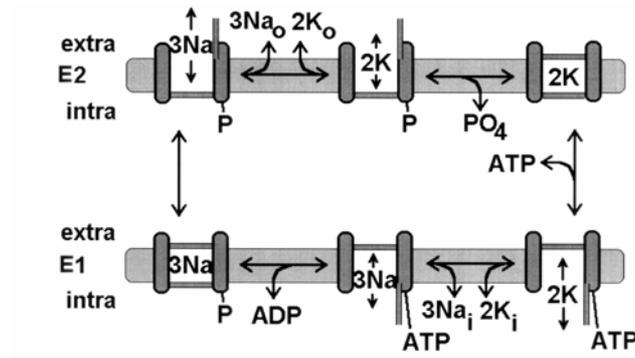


Figura II.2: Modelo teórico de portas alternadas de Albers-Post para a bomba de Na/K, considerada como um canal iônico. *extra* e *intra* indicam, respectivamente, as faces extra e intracelulares da membrana (modificado de ARTIGAS e GADSBY, 2003a).

Nesse modelo de portas alternadas de Albers-Post, quando a enzima Na/K-ATPase encontra-se no estado E1, a porta intracelular encontra-se aberta e apresenta maior afinidade ao Na^+ e ATP, com constantes de dissociação: $Kd_{\text{Na}} = 0,19 - 0,26 \text{ mM}$ e $Kd_{\text{ATP}} = 0,1 - 0,2 \text{ }\mu\text{M}$. Com a ligação de 3 Na^+ e ATP à enzima, ocorre a transferência do γ -fosfato do ATP para a enzima, causando a oclusão dos 3 Na^+ e liberação de uma molécula de ADP. O íon Mg^{2+} é indispensável para a ocorrência dessa reação de fosforilação da Na/K-ATPase. A partir do subestado fosforilado $\text{P}(\text{Na}^+)_3\text{E1}$, a enzima, por relaxação espontânea, muda para o estado E2 e permanece com a porta extracelular aberta. No estado E2, a enzima perde afinidade para os íons Na^+ ($Kd_{\text{Na}} = 14 \text{ mM}$) e a afinidade para K^+ é aumentada ($Kd_{\text{K}} = 0,1 \text{ mM}$). Logo, ocorre a liberação dos 3 Na^+ e a reação de 2 K^+ , que induz a desfosforilação da enzima. A desfosforilação da enzima, por sua vez, causa a mudança para o subestado $(\text{K}^+)_2\text{E2}$, no qual os 2 K^+ estão oclusos. A liberação dos 2 K^+ na face citoplasmática, que corresponde ao retorno da enzima para o estado E1, pode ocorrer espontaneamente ou pode ser induzida pela reação de ATP com baixa afinidade ($Kd_{\text{ATP}} \approx 0,3 \text{ mM}$). A ciclicidade deste mecanismo bombeia Na^+ para o meio extracelular e K^+ para o intracelular. Adicionalmente, esse modelo também prevê o funcionamento de forma reversa da bomba de Na/K (GLITSCH, 2001; SCHEINER-BOBIS, 2002; ARTIGAS e GADSBY, 2003a).

II.2 – Cinética das reações do modelo teórico de Albers-Post

Desde o surgimento do modelo teórico de Albers-Post, na década de 60, inúmeros trabalhos são direcionados ao estudo da cinética das reações parciais da bomba de Na/K. Várias técnicas têm sido empregadas, tais como o estudo da fosforilação e desfosforilação das enzimas em função do tempo (ALBERS *et al.*, 1963; POST *et al.*, 1975; TANIGUCHI e POST, 1975; HOBBS *et al.*, 1980; ROSSI e NORBY, 1993; CAMPOS e BEAUGÉ, 1994; BEAUGÉ, 2001), medidas de fluxos promovidos pelo transporte, oclusão e/ou desocclusão de íons (GARAY e GARRAHAN, 1973; BEAUGÉ e DI POLO, 1981; BRAND e WHITTAM, 1985; FORBUSH, 1987), registro de correntes transientes (RAKOWISK *et al.*, 1989; PINTSCHHOVIUS *et al.*, 1999; HANSEN *et al.*, 2002; HOLMGREN, 2000; MATHIAS *et al.*, 2000; PELYFFO *et al.*, 2000) ou registros de transições de subestados por meio de fluorescência (WARD e CARIERES, 1998; CORNELIUS, 1999; SCHNEEBERGER e APELL, 2000; HEYSE *et al.*, 1994). Dentre esses trabalhos, pode-se ressaltar o de HEYSE *et al.* (1994) em que a atividade da bomba de Na/K é descrita por meio de vários subestados que representam uma forma expandida do ciclo de Albers-Post (Figura II.3). As transições entre esses subestados são caracterizadas por faixas de valores para os parâmetros cinéticos das respectivas reações (Tabela II.1). Essas faixas de valores podem ser determinadas por meio de manobras experimentais envolvendo fluorescências sensíveis às mudanças conformacionais da Na/K-ATPase e por registro de correntes transientes geradas pela bomba de Na/K.

Segundo o ciclo funcional da Figura II.3, K^+ e Na^+ competem na ocupação dos dois sítios da bomba Na/K no estado principal E1, os quais são carregados negativamente e ficam expostos na face intracelular. Essa competição entre Na^+ e K^+ é observada experimentalmente, por exemplo, quando a corrente da bomba de Na/K é ativada sob várias condições de concentração iônica (GARAY e GARRAHAN, 1973; RAKOWSKI *et al.*, 1989; SCHNEEBERGER e APELL, 2001). Nesses experimentos, observa-se que a afinidade aparente dos íons Na^+ na face intracelular é reduzida na presença de K^+ intracelular.

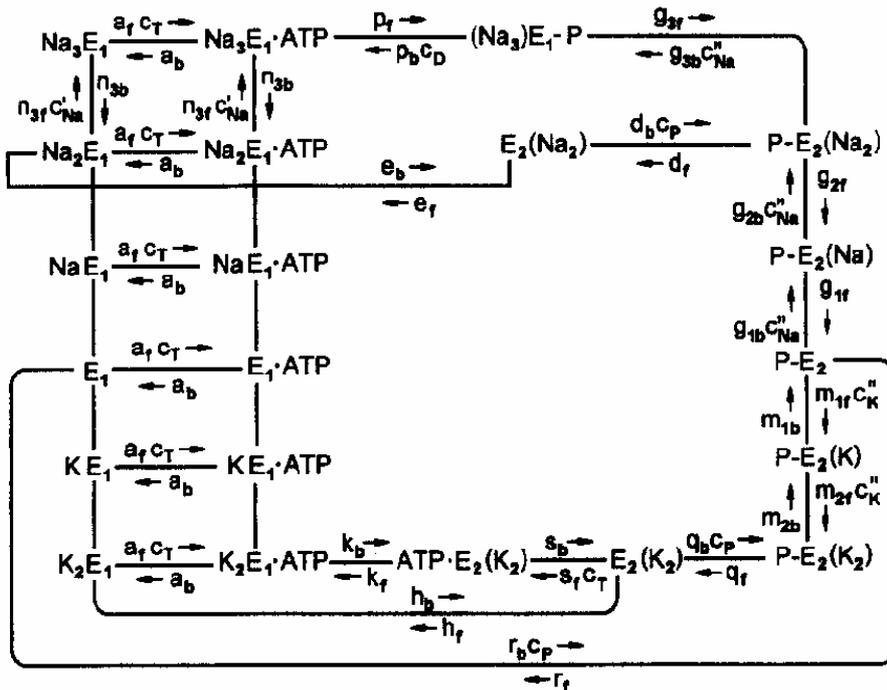


Figura II.3 – Forma expandida do ciclo de Albers-Post usada para o levantamento dos parâmetros cinéticos (extraído de HEYSE *et al.*, 1994). a_f , p_f , ..., a_b , p_b , ... são as constantes das taxas das reações, sendo que f e b representam os sentidos direto e reverso da reação. c_T , c_D e c_P são as concentrações intracelulares de ATP, ADP e P. $c_{Na'}$, $c_{K'}$, $c_{Na''}$ e $c_{K''}$ são as concentrações de Na^+ e K^+ no citoplasma e na face extracelular, respectivamente. E_1 e E_2 representam a enzima Na/K-ATPase em seus dois estados conformacionais principais. Nesse ciclo, ainda foi considerado que a liberação de 2 Na^+ ou 2 K^+ no citoplasma é muito rápida. Logo as reações de 2 Na^+ ou 2 K^+ com enzimas no estado E_1 puderam ser consideradas em equilíbrio em cada instante de tempo.

Segundo HEYSE *et al.* (1994) e SCHNEEBERGER e APELL (2001), o terceiro sítio de ligação presente na enzima no estado E_1 é neutro, altamente específico para Na^+ e a ligação iônica é eletrogênica. A oclusão dos íons Na^+ , por causa da fosforilação da enzima, ocorre somente quando os 3 Na^+ estão ocupando seus respectivos sítios de ligação e não apresenta efeito eletrogênico. Esse fato levou HEYSE *et al.* (1994) a concluir que o Na^+ ligado ao sítio eletroneutro não é movido dentro da enzima durante a transferência do γ -fosfato, indicando que a fosforilação causa somente o fechamento da porta intracelular da bomba. Essa conclusão é confirmada por investigações mais recentes que revelam que o movimento de carga ocorre durante as reações de ligação e de dissociação iônica (APELL *et al.*, 1998; APELL e KARLISH, 2001). A transição

conformacional para o estado principal E2 está associada com o acesso dos sítios de ligação na face extracelular e com a liberação primeiro Na^+ a partir do sítio eletroneutro. De acordo com HEYSE *et al.* (1994), essa transição de estado representa a maior contribuição eletrogênica do ciclo funcional da bomba.

Tabela II.1 – Valores de parâmetros cinéticos das reações da forma expandida do ciclo de Albers-Post (extraído de HEYSE *et al.*, 1994).

Parâmetro (x)	Faixa de valores	
	sentido direto (x_f)	sentido reverso (x_b)
n_3	$> 1 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$\approx 8 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
a	$1 \times 10^4 - 1 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$\approx 1,64 \text{ s}^{-1}$
p	$\approx 2 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$	$1 \times 10^0 - 1 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
g_3	$18 - 30 \text{ s}^{-1}$	$6 \times 10^1 - 6 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
g_2	$> 3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$	$\approx 2,68 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
g_1	$> 5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$	$\approx 1,00 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
m_1	$2 \times 10^1 - 5 \times 10^1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$5 - 20 \text{ s}^{-1}$
m_2	$\geq 1 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$m_{2b}/m_{2f} = 0,1 - 1,0 \text{ mM}$
q	$\geq 1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$	$\geq 1 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
s	$5 \times 10^2 - 1 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$s_b/s_f = 4 - 10 \text{ } \mu\text{M}$
k	$15 - 30 \text{ s}^{-1}$	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$
h	$5 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$	$5 \times 10^1 - 5 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
r	$0,3 - 1 \text{ s}^{-1}$	$1,2 \times 10^{-1} - 5 \times 10^1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
d	$3 - 30 \text{ s}^{-1}$	$\approx 2,52 \times 10^1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
e	$\geq 1 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$	$< 1 \text{ s}^{-1}$
o	$1,0 \times 10^3 - 4 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$5,0 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$

A liberação sucessiva dos segundo e terceiro Na^+ na face extracelular, assim como a ligação dos dois K^+ , também apresenta efeito eletrogênico (HEYSE *et al.*, 1994; SOKOLV *et al.*, 1998). HEYSE *et al.* (1994) concluem que para essas reações apresentarem efeito eletrogênico, no estado principal E2, os sítios de ligação devem estar localizados dentro da enzima. Portanto, a conexão entre os sítios e o meio extracelular deve ser formada por um canal estreito.

A oclusão dos dois K^+ , a desfosforilação da enzima e a liberação do K^+ na face intracelular não apresentam efeito eletrogênico (HEYSE *et al.*, 1994; PINTSCHOVIVUS

et al., 1999). HEYSE *et al.* (1994) explicam esse fato considerando que, durante essas transições de subestados, os dois K^+ devem estar emparelhados com as cargas negativas dos sítios de ligação, os quais têm acesso direto ao meio intracelular no estado conformacional principal E1.

Em relação às reações de ATP, como pode ser observado nesse esquema seqüencial para o funcionamento da bomba, o ATP é fundamental para o transporte dos 3 Na^+ para o meio extracelular, reagindo com sítios de alta afinidade e fosforilando a enzima Na/K-ATPase, e aumentando a taxa de liberação de K^+ na face intracelular, ligando-se a sítios de baixa afinidade. Entretanto, esse modelo seqüencial considera que a bomba de Na/K pode existir como um complexo com subunidades $(\alpha\beta)_2$ que cooperam entre si e, conseqüentemente, apresentam dois sítios de ligação para ATP. Assim, para explicar o efeito bifásico da concentração de ATP sobre a atividade da bomba, admite-se que cada composto $\alpha\beta$ tem apenas um sítio para ATP e que as variações de afinidade desse sítio estão associadas a mudanças conformacionais da bomba. No entanto, estudos cinéticos mostram que um modelo de sítio único não é suficiente para explicar o acoplamento da hidrólise de ATP com o transporte iônico (para revisão, SCHEINER-BOBIS, 2002).

No diagrama de reações na Figura II.3, ainda pode ser observado que, mesmo na ausência de K^+ , a enzima Na/K-ATPase permanece ativa transportando 3 Na^+ para o meio extracelular e 2 Na^+ para o citoplasma. Nesse caso, o Na^+ extracelular atua desfosforilando a enzima, no lugar do K^+ , porém, com afinidade muito menor (BEAUGÉ, 2001).

II.3 – Substâncias que interferem no funcionamento da bomba de Na/K

Possivelmente devido à sua fundamental importância na fisiologia celular e naturalmente para o organismo como um todo, a bomba de Na/K tem sido alvo de um vasto número de experimentos envolvendo a adição de toxinas produzidas por plantas e animais. A atividade de bombeamento iônico é especificamente inibida por uma série de esteróides, denominados glicosídeos cardíacos, tais como a ouabaína e as digitalinas. Outras substâncias como a PTX, extraída de corais marinhos do gênero *Palythoa*, e a *sanguinarina*, extraída da planta *Sanguinária canadensis*, também são inibidoras da bomba de Na/K. Diferentemente dos glicosídeos cardíacos, os quais bloqueiam o fluxo

iônico promovido pela bomba, a PTX e a *sanguinarina* convertem a enzima em um canal iônico aberto que permite o fluxo dissipativo de Na^+ e K^+ . Em todos os casos, contudo, as interações entre receptor e toxina resultam na perda do potencial de membrana, que é uma situação fatal para a célula e, dependendo do caso, para o organismo (SCHEINER-BOBIS, 2002).

Os glicosídeos cardíacos são encontrados como metabólitos secundários em várias plantas e também em alguns animais. Algumas dessas substâncias (por exemplo, a ouabaína) são usadas na África como veneno, na ponta de flechas, para caça. Essas substâncias se ligam de forma reversível à enzima Na/K-ATPase, na face extracelular, e inibem a hidrólise do ATP. A Na/K-ATPase é a única enzima conhecida que interage com essa classe de substâncias. Portanto, os glicosídeos cardíacos, especialmente a ouabaína, muitas vezes são usados para identificar a Na/K-ATPase e para estudar os mecanismos envolvidos no transporte iônico nesse sistema. Sob condições ótimas, 1 mol de Na/K-ATPase se liga a 1 mol de ouabaína. A condição ótima para a ligação ocorre quando a enzima é exposta a Mg^{2+} , Na^+ e ATP ou Mg^{2+} e P. Como essas duas condições induzem a conformação fosforilada da enzima PE₂, tem sido aceita a hipótese de que esse é o subestado ao qual os glicosídeos cardíacos se ligam. Assim, o efeito bloqueador dessas substâncias consiste em manter a enzima nesse subestado fosforilado, bloqueando a desfosforilação da enzima e, conseqüentemente, a atividade da bomba. A presença de íons K^+ na face extracelular da enzima influencia reduzindo a afinidade da enzima para os glicosídeos cardíacos. A presença de Na^+ inibe competitivamente o efeito do K^+ , favorecendo a ligação dos glicosídeos cardíacos (GLITISCH, 2001; SCHEINER-BOBIS, 2002).

A inibição da bomba de Na/K por glicosídeos cardíacos é clinicamente relevante. A aplicação dessas substâncias, especialmente das digitalinas e seus congêneres, aumenta a capacidade de contração dos músculos do coração, possivelmente pelo aumento indireto da concentração de Ca^{2+} intracelular. Recentemente, vários grupos de pesquisa têm isolado substâncias circulantes endógenas que interagem com a bomba de Na/K e inibem o bombeamento de $^{86}\text{Rb}^+$. Além disso, várias dessas substâncias têm sido identificadas como ouabaína ou seus congêneres. Em adição, evidências indicam que a concentração da ouabaína endógena aumenta sob esforço excessivo e apresenta alto nível em pacientes hipertensos. Contudo, os mecanismos que podem ser relevantes ainda não estão bem esclarecidos e os glicosídeos

cardíacos não aparecem na lista de substâncias endógenas vasoativas (para revisão, SCHEINER-BOBIS, 2002).

A palitoxina, produzida por corais do gênero *Palythoa*, é considerada a toxina mais potente de origem animal (HIRSH e WU, 1997; SCHEINER-BOBIS, 2002). Essa toxina transforma a bomba de Na/K em um canal iônico não-seletivo para cátions monovalentes, permitindo o fluxo dissipativo de Na⁺ e K⁺ através da membrana celular. Tal efeito explica a toxicidade da palitoxina, pois, as reduções dos gradientes de Na⁺ e K⁺ resultam no colapso do potencial transmembranar, causando a perda das funções celulares básicas (HABERMANN, 1989). No próximo capítulo, é feita uma revisão mais detalhada sobre essa toxina e seu efeito sobre a bomba de Na/K.

A *sanguinarina*, um alcalóide desenvolvido pela planta *Sanguinaria canadensis* no curso da evolução para protegê-la contra herbívoros, foi descrita cerca de 29 anos atrás como um inibidor da bomba de Na/K. Contudo, a interação entre a *sanguinarina* e a Na/K-ATPase ainda não foi investigada tão intensamente como no caso da PTX (SCHEINER-BOBIS, 2002). O trabalho mais conclusivo sobre o efeito dessa substância sobre a bomba de Na/K é o de SCHEINER-BOBIS (2001). Nesse trabalho, usando células de levedura com enzimas Na/K-ATPase incorporadas em suas membranas, foi mostrado que a *sanguinarina* induz a formação de um canal na bomba que é sensível à ouabaína e que permite o efluxo de K⁺. Segundo esse autor, a *sanguinarina* parece se ligar primariamente ao subestado PE1 da enzima e, assim, inibe a ligação da ouabaína. No entanto, como no caso da PTX, essa toxina também não necessita da fosforilação para interagir com a bomba.

Capítulo III – A Palitoxina

De acordo com uma antiga lenda do Hawaii, no distrito de Hana, vivia um homem que estava sempre ocupado plantando e colhendo. Sempre que as pessoas da região iam pescar, no retorno, alguém desaparecia. Esse mistério ficou sem explicação, durante algum tempo, até o momento em que passaram a suspeitar do homem que vivia cultivando. Assim, os pescadores aprisionaram esse homem, tiraram sua roupa e, surpreendentemente, descobriram uma boca de tubarão em suas costas. O homem foi morto e suas cinzas foram lançadas na direção do mar. Segundo a lenda, as algas da região onde as cinzas caíram tornaram-se tóxicas e, assim, foram chamadas de algas mortais de Hana. Essa região, que passou a ser um tabu para os havaianos, foi coberta com pedras e a sua localização tornou-se um segredo, pois, acreditavam que uma coisa muito ruim poderia acontecer se alguém encontrasse as algas.

Tendo tomado conhecimento da lenda, Scheuer e Moore, há mais de 30 anos atrás, conseguiram chegar ao local consultando vários nativos da região de Hana e lá coletaram uma pequena quantidade da “alga”, que foi identificada como corais do gênero *Palythoa*. A substância tóxica extraída desses corais foi denominada palitoxina (para revisão, PATOCKAA e STREDAB, 2002).

A palitoxina (PTX) é uma das mais potentes toxinas animais. Agindo na face extracelular das células, em alguns animais (por exemplo, rato, cão e porquinho-da-índia), a dose letal pode variar entre 10 e 100 ng/Kg. Além disso, essa dose letal depende da forma de aplicação. Por exemplo, em ratos, a injeção intravenosa mostra-se mais efetiva, enquanto injeção intragástrica ou intra-retal faz com que a PTX seja inativa. A PTX pode ser isolada de celenterados marinhos dos gêneros *Palythoa* e *Zoanthus* e também é encontrada em anêmonas-do-mar e em certos caranguejos. Essa toxina consiste de uma cadeia parcialmente não-saturada alifática e longa, com grupos carboxila, hidroxila e éter cíclicos espalhados (Figura III.1) (HABERMANN, 1989; HIRSH e WU, 1997). A PTX é uma molécula com estabilidade relativamente baixa e alterações em sua estrutura afetam a potencialidade de seus efeitos (ISHIDA *et al*, 1983; TOSTESON *et al*; 1995; WANG e HORISBER; 1997). A PTX não forma poros na bicamada lipídica e sua ação é claramente distinta daquela de ionóforos naturais. Isso sugere que a PTX não age como um ionóforo e deve reagir com alguma estrutura pré-existente na membrana citoplasmática (HABERMANN, 1989; HIRSH e WU, 1997).

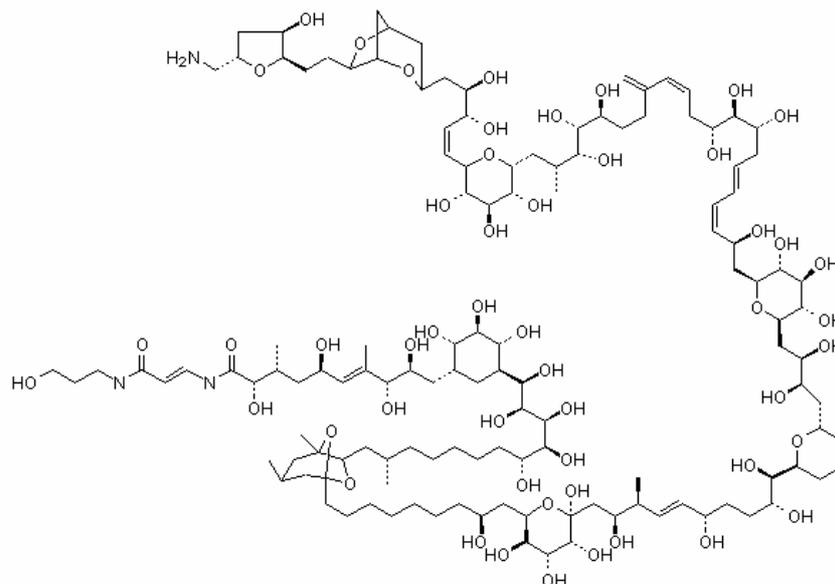


Figura III.1 – Estrutura da palitoxina (HABERMAN, 1989).

Dentre outros efeitos, a aplicação de PTX pode provocar contração de músculos e artérias, vasoconstrição, despolarização de células e liberação de neurotransmissores (FRELIN e RETERGHEM, 1995; LAU *et al.*, 1995; KOCKSKÄMPER *et al.*, 2004; VALE *et al.*, 2006). Segundo HABERMANN (1989), todos os efeitos provocados pela PTX, inclusive a letalidade, podem ser explicados pelo fato de que essa toxina possibilita os fluxos de Na^+ e K^+ através da membrana, de forma dissipativa. Isso porque a PTX é capaz de induzir canais iônicos não-seletivos para cátions monovalentes através da membrana celular. Como a ouabaína, uma substância bloqueadora específica da bomba de Na/K, atua como um antagonista do efeito da PTX, conclui-se que os canais são induzidos por essa toxina na bomba de Na/K (HABERMANN, 1989; WANG e HORISBERGER, 1997). Adicionalmente, o trabalho de SCHEINER-BOBIS (1998) mostra que células de levedura, as quais não apresentam enzimas Na/K-ATPase, são resistentes à PTX. Porém esta resistência pode ser superada pela expressão exógena da Na/K-ATPase.

A técnica de *patch-clamp*, usada para medir a atividade de canais isolados, forneceu a prova da existência dos canais induzidos pela PTX (HABERMANN, 1989). Segundo CHHATWAL *et al.* (1983), o canal induzido pode ser representado por uma única molécula ATPase que, uma vez ligada à PTX, é convertida em um poro reversível que permite o fluxo de cátions monovalentes.

ICHIDA *et al.* (1999), usando a técnica de *patch-clamp* com a configuração *whole cell* para medir a corrente induzida pela PTX, mostram que as propriedades dos

canais induzidos em megacariócitos de rato e de células excitáveis são similares em relação à seletividade iônica e ao efeito da ouabaína. TOSTESON *et al.* (2003) mostram que os canais induzidos em células de rim de porco e de cachorro também apresentam características qualitativas similares. Adicionalmente, os trabalhos de ARTIGAS e GADSBY (2002, 2003a, 2003b e 2004) demonstram que células de rim de embrião humano (HEK293) e miócitos ventriculares também apresentam canais induzidos pela PTX com características semelhantes. Esses trabalhos, portanto, indicam que o efeito da PTX deve ser qualitativamente semelhante para diferentes tipos de células de animais.

III.1 – Interações entre a PTX e a bomba de Na/K

Na década de 70, foi demonstrado que a PTX apresenta alguns efeitos similares aos da ouabaína e que, além disso, a aplicação de glicosídeos pode inibir os efeitos da PTX. ISHIDA *et al.* (1983) observam que a PTX, assim como a ouabaína, bloqueia a atividade de enzimas Na/K-ATPase extraídas de células do coração de porquinho-da-índia e do córtex cerebral de porco. Além disso, os autores também mostram que o K^+ apresenta um efeito competitivo com a PTX, reduzindo o bloqueio promovido pela toxina.

GRELL *et al.* (1988), utilizando células de rim de porco, confirmam o efeito competitivo exercido pelo K^+ sobre a PTX e explicam esse efeito propondo um esquema de reações em que a PTX somente pode reagir com enzimas não ligadas a K^+ , e vice-versa. Além disso, esses autores levantam a hipótese de que um rearranjo conformacional lento deve limitar a taxa de ligação da PTX e observam que o Na^+ , diferentemente do K^+ , não afeta a ligação dessa toxina.

Na Figura III.2, é mostrado um diagrama esquemático simplificado proposto para representar os efeitos da PTX e da ouabaína (HABERMANN, 1989). Segundo esse diagrama, o fato de essas substâncias apresentarem alguns efeitos semelhantes, como por exemplo a contração de músculos do intestino, é explicado pelo bloqueio que ambas exercem sobre a atividade da bomba. Por outro lado, as atuações dessas substâncias são diferenciadas pela capacidade da PTX de promover os fluxos dissipativos de Na^+ e K^+ e pela característica da ouabaína de bloquear esses fluxos.

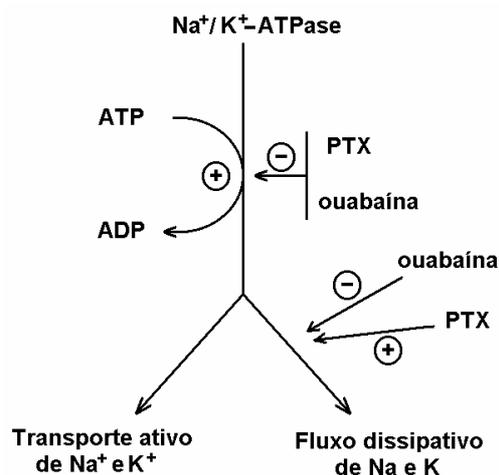


Figura III.2 – Atuações convergentes e divergentes da PTX e ouabaína sobre a bomba de Na/K. O sinais “+” e “-” indicam se a atuação é de favorecimento ou bloqueio, respectivamente.

TOSTESON *et al.* (1991), utilizando célula vermelha humana, observam que a PTX reduz o consumo de ATP, sugerindo que a toxina deve bloquear a bomba de Na/K inibindo a hidrólise do ATP. Segundo eles, quando os canais induzidos pela PTX estão abertos, a Na/K-ATPase não catalisa a hidrólise de ATP. Também demonstram que o efeito da PTX é reversível, uma vez que a remoção da toxina permite que a bomba retorne à atividade normal. Esse efeito reversível da PTX leva os autores a propor a hipótese de que o canal induzido pela toxina pode envolver os sítios de ligação de Na⁺ e K⁺, ocupados durante o funcionamento normal da bomba.

Até o início da década de 90, o bloqueio da ouabaína sobre o efeito da PTX era a evidência mais forte de que essa toxina interage com a bomba de Na/K. Posteriormente, com a aplicação da PTX em células de levedura, essa evidência se confirma (SCHEINER-BOBIS *et al.*, 1994). Essas células apesar de não apresentarem bomba de Na/K endógena, permitem a incorporação de suas subunidades α e β . Os autores demonstram que, enquanto as células não transformadas são insensíveis à PTX, as células expressando ambas subunidades α e β apresentam reduções da concentração intracelular de K⁺ quando a toxina é aplicada, indicando a abertura de canais iônicos (Figura III.3A). Além disso, observam que a presença de somente uma das subunidades da bomba, α ou β , não é suficiente para tornar as células de levedura sensíveis a PTX e demonstram de forma sistemática que a aplicação de ouabaína causa o bloqueio do efeito da PTX (Figura III.3B). Esses achados são confirmados posteriormente por

HIRSH e WU (1996) por meio de registros da atividade de canais isolados durante a aplicação de PTX em células de levedura expressando a bomba de Na/K.

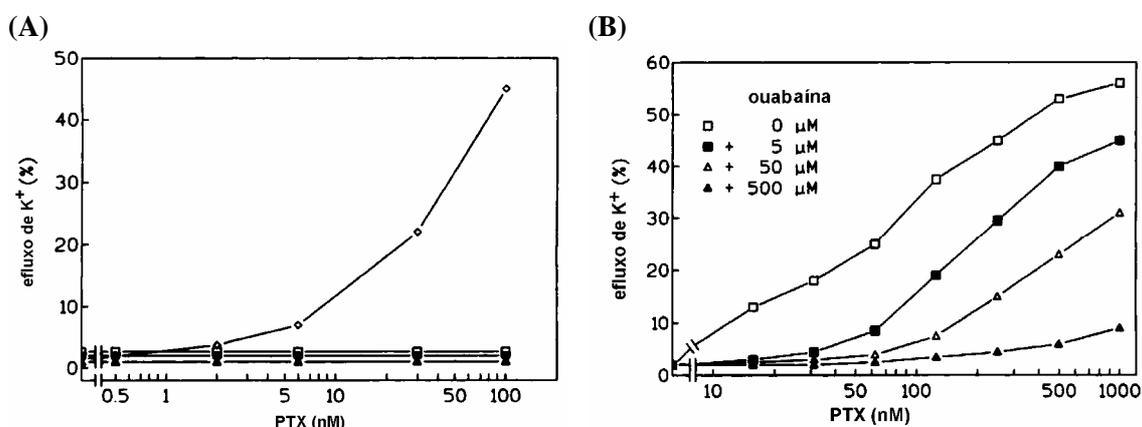


Figura III.3 – Subunidades α e β são necessárias para a interação da PTX com a bomba de Na/K em células de levedura, observada por meio do efluxo de K^+ (SCHEINER-BOBIS *et al.*, 1994). A) As células apresentam as subunidades α (●), β (▲) ou α e β (◇). Células não transformadas (□) foram utilizadas como controle. B) Inibição exercida pela ouabaína sobre o efluxo induzido pela PTX.

REDONDO *et al.* (1996), também utilizando células de levedura, demonstram que, mesmo a subunidade α estando em uma forma truncada, a PTX é capaz de se ligar a bomba de Na/K e afetar a ligação da ouabaína. No entanto, sob essa situação, observaram que a PTX não causa o efluxo de K^+ , indicando que a parte da subunidade α removida deve participar de forma direta ou indireta na formação do canal induzido pela PTX. Baseado nesses achados, os autores concluem que a PTX deve abrir um canal dentro da bomba de Na/K e não meramente na sua vizinhança. Outra hipótese proposta é que o canal induzido deve ser o mesmo canal que, sob condições normais, transporta ativamente os íons Na^+ e K^+ .

Estudando os efeitos da PTX, indução de corrente e o bloqueio da atividade da bomba, WANG e HORISBERBER (1997) observaram que a PTX pode induzir uma corrente macroscópica sem causar um bloqueio considerável da atividade da bomba de Na/K. Esse fato explicaria as diferenças na afinidade aparente da PTX que são observadas quando os efeitos secundários ao aumento da corrente induzida (despolarização da membrana, contração muscular, etc) ou a inibição da Na/K-ATPase são medidos. Além disso, WANG e HORISBERGER (1997), estudando a interação entre K^+ e o complexo PTX-bomba de Na/K, propõem um modelo simplificado para explicar o efeito competitivo entre essas substâncias (Figura III.4). Nesse modelo, a

ligação de PTX não ocorre, ou é muito lenta, se a enzima estiver ligada a K^+ ou ouabaína, e vice-versa.

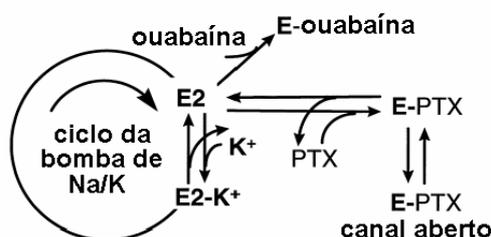


Figura III.4 – Modelo para a interação da PTX e da ouabaína, com a bomba de Na/K, proposto por WANG e HORISBERGER (1997).

Investigando as interações moleculares entre a PTX a bomba de Na/K, SCHEINER-BOBIS e SCHENEIDER (1997) e ARTIGAS e GADSBY (2002) demonstram que a hidrólise de ATP não é necessária para a indução de canais iônicos pela PTX. Na Figura III.5A, é mostrada uma medida de atividade de canal isolado induzido pela PTX, utilizando a técnica de *patch-clamp* em miócito ventricular de porquinho-da-índia (ARTIGAS e GADSBY, 2002). Nesse experimento, a face extracelular é perfundida com solução contendo 160 mM Na^+ e a face intracelular, com solução contendo 150 mM de Na^+ e 5 mM de ATP. Após 25 s de aplicação da PTX, observa-se a atividade de um canal induzido e, posteriormente, a perfusão da toxina é interrompida. O canal induzido apresenta *bursts* de abertura longos e a atividade permanece durante aproximadamente duas horas.

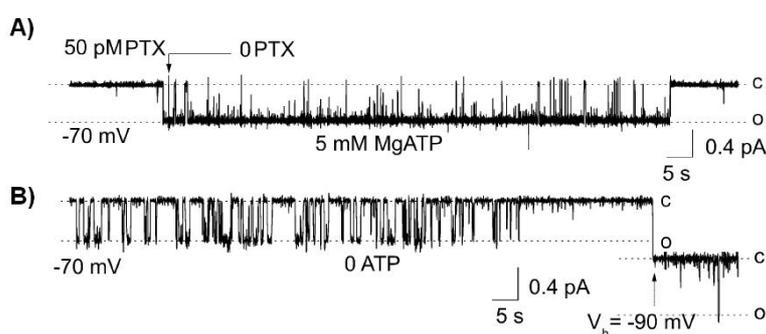


Figura III.5 – Registros de corrente em canais isolados, induzidos pela PTX, em membrana de miócito cardíaco, mantida a -70 mV e banhada com solução extracelular contendo 160 mM de Na^+ e intracelular apresentando 150 mM de Na^+ e 5 mM (A) ou 0 (B) de ATP. As linhas pontilhadas representam os estados aberto (O) e fechado (C) do canal. A PTX é aplicada até o registro do início da atividade do canal (ARTIGAS e GADSBY, 2002).

A condutância através dos canais induzidos pela PTX varia entre 9 e 25 pS para diferentes tipos de células (WANG e HORISBERGER, 1997) e, no caso em que não há a hidrólise de ATP, quando a solução de perfusão intracelular está livre de ATP, de acordo com as observações de ARTIGAS e GADSBY (2002), os canais isolados permanecem tempos mais longos no estado fechado (Figura III.2B).

Investigando o efeito da PTX sobre as reações de Na^+ , K^+ e ATP com a enzima Na/K-ATPase, TOSTESON *et al.* (2003) e ARTIGAS e GADSBY (2002, 2003a, 2003b e 2004) mostram que as enzimas Na/K-ATPase, mesmo na presença de PTX, mantêm suas características de reagir com os solutos Na^+ , K^+ e ATP. Nesse sentido, TOSTESON *et al.* (2003) demonstram que Na^+ e K^+ podem ser oclusos em enzimas ligadas a PTX. No caso do K^+ , a taxa de desocclusão é alterada pela PTX. Além disso, esses autores observam que, apesar de haver redução do nível de fosforilação, as enzimas ligadas a PTX também podem ser fosforiladas. Para explicar essa redução do nível de fosforilação, propõem que a PTX deve inibir as ligações de ATP aos sítios de alta afinidade ou aumentar a desfosforilação das enzimas.

O efeito bloqueador do K^+ sobre os canais induzidos pela PTX é conhecido desde a década de 80 (HABERMAN, 1989). Porém, um estudo mais consistente do efeito do K^+ sobre esses canais induzidos surge somente com o trabalho de ARTIGAS e GADSBY (2003a, 2003b e 2004). Esses autores, para explicar o decaimento da corrente induzida pela PTX na presença de K^+ extracelular, propõem que além do K^+ poder bloquear os canais induzidos, deve aumentar a taxa de dissociação de PTX.

ARTIGAS e GADSBY (2003a, 2003b e 2004) ainda verificam que a fosforilação dos canais induzidos aumenta a estabilidade das ligações de PTX e também que a PTX favorece o estado fosforilado das enzimas da bomba, resultado este diferente do obtido por TOSTESON *et al.* (2003). Além disso, constatam que a presença de ATP intracelular aumenta a probabilidade de abertura dos canais induzidos e reduz o decaimento da corrente provocado pelo K^+ extracelular.

De forma resumida, os trabalhos de ARTIGAS e GADSBY (2002, 2003a, 2003b e 2004) e de TOSTESON *et al.* (2003) contribuíram para elucidar vários mecanismos envolvidos na indução de canais por parte da PTX, através da bomba de Na/K. Porém, ainda existem mecanismos relativos às interações da PTX com enzimas nas presenças dos ligantes fisiológicos (Na^+ , K^+ , ATP, ADP e P) que precisam ser esclarecidos. Por exemplo, na literatura, ainda não existe uma descrição mais detalhada de como seriam

as reações envolvidas na fosforilação das enzimas na presença de PTX e os mecanismos pelos quais o K^+ reduz a indução de canais por parte da PTX.

O fluxo iônico através de canais induzidos pela PTX parece ser controlado pelas duas portas, as quais podem ser reguladas pelos ligantes fisiológicos da bomba de Na/K. Isso sugere que a abertura e fechamento das portas refletem mudanças conformacionais análogas às das reações parciais de oclusão e desocclusão iônica normais (ARTIGAS e GADSBY, 2003a e b). A PTX parece interferir sobre o acoplamento preciso entre as portas intra- e extracelular que controla o acesso aos sítios de ligação dos cátions, fazendo com que algumas vezes as portas se abram simultaneamente (ARTIGAS e GADSBY, 2004). Portanto, a PTX pode ser usada como uma ferramenta para caracterizar os caminhos do transporte iônico e as estruturas e mecanismos das portas da bomba de Na/K (ARTIGAS e GADSBY, 2004; HORISBERGER, 2004; ARTIGAS e GADSBY, 2006; REYSE e GADSBY, 2006). Contudo, antes dessa toxina ser explorada para tais estudos, as interações da PTX com a bomba de Na/K devem ser mais bem entendidas. O desenvolvimento de um modelo de reações, além de contribuir para o entendimento dessas interações, também auxiliaria no estudo dos efeitos da PTX em tecidos celulares, ou mesmo, como ferramenta para estudar a atuação da bomba de Na/K durante fenômenos biológicos, tais como durante a indução de atividades epileptiformes não-sinápticas (RODRIGUES, 2003; VIVAS, 2005).

Capítulo IV – Interações entre o Complexo PTX-Bomba de Na/K e os Íons Na⁺ e K⁺

O registro de corrente através da membrana celular, utilizando a técnica de *patch-clamp*, permite investigar a ativação e desativação de canais induzidos pela PTX, em resposta à adição ou remoção combinadas de Na⁺ e K⁺ no citoplasma ou na face extracelular da membrana, quando sob perfusão intra- e extracelulares com soluções sem ATP e P (ARTIGAS e GADSBY, 2003a e b). Nessas condições, as enzimas da bomba não podem ser fosforiladas. Tomando como referência o comportamento da corrente induzida pela PTX na presença de Na⁺, observa-se que o íon K⁺, a partir da face extracelular, interfere sobre as interações da PTX com a bomba, aumentando a taxa de dissociação da toxina e causando o fechamento de canais induzidos.

Em relação às interações entre Na⁺ e a bomba, TOSTESON et al. (2003), fazendo a incubação de enzimas Na/K-ATPase em solução contendo ²²Na⁺, mostram que a oclusão de Na⁺ na bomba não é alterada na presença da PTX. Reforçando essa observação, HARMEL e APELL (2006), utilizando um indicador (*electrochromic styryl dye* RH421) que monitora a quantidade de íons ligados à bomba, concluem que a PTX não altera a ligação dos três íons Na⁺. Além disso, esses autores mostram que a ligação de três Na⁺ em seus sítios de alta afinidade parece não modificar a ligação da toxina.

Como pode ser observado na Figura II.3, na presença de ATP, ADP e/ou P, o número de subestados possíveis da bomba de Na/K é maior. Como existe a hipótese de que a PTX pode interagir com subestados dos dois estados conformacionais principais E1 e E2 (HABERMANN, 1989; ARTIGAS e GADSBY, 2004), as interações da toxina com a bomba podem se tornar mais complexas nessa situação. Somando isso ao fato de que as reações químicas envolvidas na ação de Na⁺ e K⁺ sobre os canais induzidos pela PTX ainda não estão bem esclarecidas, neste capítulo, propõe-se um modelo de reações, com estrutura semelhante à do modelo de Albers-Post, para investigar como a PTX interfere com a bomba de Na/K e suas interações com Na⁺ e K⁺, na ausência de ATP, ADP e P.

IV.1 - Métodos

O modelo de reações pode ser dividido em duas partes. A primeira é constituída de reações do modelo de Albers-Post, que descreve o ciclo de transporte iônico. A segunda parte corresponde ao conjunto de reações e subestados proposto para explicar o efeito da PTX.

IV.1.1 – Modelo de reações de Albers-Post

No modelo de Albers-Post, os dois estados conformacionais principais da enzima Na/K-ATPase, E1 e E2, apresentam vários subestados (Figura II.3). As reações e subestados considerados foram aqueles que são necessários para reproduzir o efeito da PTX sobre a bomba de Na/K nas ausências de ATP, ADP e P. Para o estado E1, foram considerados dois subestados: (a) E1 – enzima livre com a porta intracelular aberta; (b) Na^+_3E1 – enzima com a porta intracelular aberta e 3 Na^+ ligados. Em relação ao estado E2, no qual a enzima apresenta os sítios de ligação para Na^+ e K^+ acessíveis na face extracelular, os seguintes subestados foram considerados: (a) $(K^+)_2E2$ – enzima contendo 2 K^+ oclusos; (b) $(Na^+)_2E2$ – enzima contendo dois Na^+ oclusos; (c) E2 – enzima livre com a porta extracelular aberta.

As reações envolvendo transições entre esses subestados, especificadas na Tabela IV.1, são: reação 1 – transição espontânea entre os subestados E1 e E2; reação 2 – ligação de três Na^+ às enzimas no subestado E1, formando o subestado Na^+_3E1 ; reação 3 – oclusão de K^+ em enzimas formando o subestado $(K^+)_2E2$; reação 4 – oclusão de Na^+ formando o subestado $(Na^+)_2E2$.

Tabela IV.1: Reações do modelo de Albers-Post que foram descritas no modelo.

Número da reação	Reação
1	$E2 \longleftrightarrow E1$
2	$3 \cdot Na^{+,i} + E1 \longleftrightarrow Na^+_3 E1$
3	$2 \cdot K^{+,o} + E1 \longleftrightarrow (K^+)_2 E2$
4	$E1 + 2Na^{+,i} \longleftrightarrow (Na^+)_2 E2$

Obs: E representa enzima Na/K-ATPase; os sobrescritos, *i* e *o*, indicam as faces intra e extracelulares da enzima, respectivamente.

IV.1.2 – Modelo de reações para o complexo PTX-bomba de Na/K

O conjunto de reações proposto para descrever a ação da PTX, apresentadas na Tabela IV.2, complementa a cinética do modelo de portas-alternadas de Albers-Post. De acordo com HABERMANN (1989) e ARTIGAS e GADSBY (2004), a PTX pode se ligar a subestados de ambos os estados conformacionais principais, E1 e E2. A ligação de PTX induz transições de certos subestados para outros, interferindo com o acoplamento preciso entre as portas intra- e extracelular, permitindo que se abram simultaneamente. Em outras palavras, a associação da toxina com a Na/K-ATPase causa a transição para um terceiro estado conformacional principal E3 em que as duas portas da bomba podem se abrir simultaneamente, caracterizando a abertura de um canal iônico. No presente modelo, o subestado que representa canais induzidos pela PTX, denotado por PTXE, segue a descrição de SCHEINER-BOBIS e SCHNEIDER (1997) e ARTIGAS e GADSBY (2004). Adicionalmente, são considerados canais induzidos fechados que apresentam Na⁺ ou K⁺ oclusos: PTX(Na⁺)₂E e PTX(K⁺)₂E.

Tabela IV.2: Reações do modelo para ação da PTX sobre a bomba de Na/K.

	Reação
p1	$PTX^o + E1 \longleftrightarrow PTXE$
p2	$PTX^o + E2 \longleftrightarrow PTXE$
p3	$PTX^o + Na_3^+ E1 \longleftrightarrow PTXE + 3Na^{+,i}$
p4	$2 \cdot Na^{+,o} + PTXE \longleftrightarrow PTX(Na^+)_2 E$
p5	$PTX(Na^+)_2 E \longleftrightarrow PTXE + 2 \cdot Na^{+,i}$
p6	$2 \cdot K^{+,o} + PTXE \longleftrightarrow PTX(K^+)_2 E$
p7	$PTX(K^+)_2 E \longleftrightarrow PTXE + 2K^{+,i}$
p8	$PTX(Na^+)_2 E \longleftrightarrow (Na^+)_2 E2 + PTX^o$
p9	$PTX(K^+)_2 E \longleftrightarrow (K^+)_2 E2 + PTX^o$

Descrevendo as reações, a PTX pode se ligar a enzimas nos subestados E1 ou E2, resultando no subestado PTXE (Tabela IV.2, reações p1 e p2, respectivamente).

Além disso, mesmo com três Na^+ ligados à enzima, a PTX pode reagir e induzir canais (reação p3).

Registrando a corrente iônica através dos canais induzidos pela PTX, ARTIGAS e GADSBY (2003a, b) observaram que K^+ extracelular acelera o decaimento da corrente induzida pela PTX, sugerindo que esse íon causa o fechamento de canais e aumenta a taxa de dissociação da toxina. Esses autores também verificaram a reativação parcial da corrente induzida quando o decaimento provocado com K^+ é interrompido substituindo esse íon na face extracelular por Na^+ . No modelo, o decaimento da corrente acelerado por K^+ foi associado à oclusão desse íon nas enzimas e a reativação parcial, após a perfusão com K^+ extracelular, foi interpretada como sendo um resultado da diferença entre as cinéticas das reações de oclusão e desocclusão de Na^+ e K^+ . Portanto, foram consideradas reações similares para as oclusões de Na^+ (reações p4-p5) e K^+ (reações p6-p7) no complexo PTX-bomba de Na/K. A aceleração da dissociação da PTX causada pelo K^+ , como descrito por ARTIGAS e GADSBY (2003a, b), foi representada pela reação p9. Supondo que Na^+ tenha efeito similar, a reação p8 foi incluída no modelo.

IV.1.3 – Modelo Matemático

A taxa de cada uma das reações (1-4 e p1-p9) foi admitida como a diferença entre a taxa do sentido direto da reação (que depende das concentrações dos reagentes) e a taxa do sentido reverso (que é função das concentrações dos produtos):

$$r_1 = \alpha_1[E2] - \beta_1[E1], \quad (4.01)$$

$$r_2 = \alpha_2 \frac{([\text{Na}^+]^i)^3}{([\text{Na}^+]^i + Kd_{\text{Na}})^2} [E1] - \beta_2[\text{Na}_3^+ E1], \quad (4.02)$$

$$r_3 = \alpha_3 \frac{([\text{K}^+]^i)^2}{([\text{K}^+]^i + Kd_{\text{K}})^2} [E1] - \beta_3[(\text{K}^+)_2 E2], \quad (4.03)$$

$$r_4 = \alpha_4 \frac{([\text{Na}^+]^i)^2}{([\text{Na}^+]^i + Kd_{\text{Na}})^2} [E1] - \beta_4[(\text{Na}^+)_2 E2], \quad (4.04)$$

$$r_{p1} = \alpha_{p1}[PTX]^o [E1] - \beta_{p1}[PTXE], \quad (4.05)$$

$$r_{p2} = \alpha_{p2}[PTX]^o [E2] - \beta_{p2}[PTXE], \quad (4.06)$$

$$r_{p3} = \alpha_{p3}[PTX]^o[Na_3^+E1] - \beta_{p3}[PTXE] \frac{([Na^+]^i)^3}{([Na^+]^i + Kd_{Na})^3}, \quad (4.07)$$

$$r_{p4} = \alpha_{p4} \frac{([Na^+]^o)^2}{([Na^+]^i + Kd_{Na})^2} [PTXE] - \beta_{p4}[PTX(Na^+)_2E], \quad (4.08)$$

$$r_{p5} = \alpha_{p5}[PTX(Na^+)_2E] - \beta_{p5} \frac{([Na^+]^i)^2}{([Na^+]^i + Kd_{Na})^2} [PTXE], \quad (4.09)$$

$$r_{p6} = \alpha_{p6} \frac{([K^+]^o)^2}{([K^+]^o + Kd_K)^2} [PTXE] - \beta_{p6}[PTX(K^+)_2E], \quad (4.10)$$

$$r_{p7} = \alpha_{p7}[PTX(K^+)_2E] - \beta_{p7} \frac{([K^+]^i)^2}{([K^+]^i + Kd_K)^2} [PTXE], \quad (4.11)$$

$$r_{p8} = \alpha_{p8}[PTX(Na^+)_2E] - \beta_{p8}[(Na^+)_2E2][PTX]^o, \quad (4.12)$$

$$r_{p9} = \alpha_{p9}[PTX(K^+)_2E] - \beta_{p9}[(K^+)_2E2][PTX]^o, \quad (4.13)$$

onde r_j é a taxa da reação j ($1, \dots, 4, p1, \dots, p9$). α_j e β_j são, respectivamente, as constantes das taxas dos sentidos direto e reverso da reação j e Kd_K e Kd_{Na} são, respectivamente, as constantes de dissociação de K^+ e Na^+ . Como foi observado que a toxina atua principalmente sobre a desocclusão dos íons (TOSTESON *et al.*, 2003), Kd_K e Kd_{Na} foram consideradas independentes da presença da PTX.

As taxas das reações descritas anteriormente implicam no seguinte conjunto de equações diferenciais acopladas que governam as concentrações de cada um dos subestados conformacionais da enzima Na/K-ATPase:

$$\frac{d[Na_3^+E1]}{dt} = r_2 - r_{p3}, \quad (4.14)$$

$$\frac{d[E1]}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 - r_4 - r_{p1}, \quad (4.15)$$

$$\frac{d[E2]}{dt} = -r_1 - r_{p2}, \quad (4.16)$$

$$\frac{d[(Na^+)_2E2]}{dt} = r_4 + r_{p8}, \quad (4.17)$$

$$\frac{d[(K^+)_2E2]}{dt} = r_3 + r_{p9}, \quad (4.18)$$

$$\frac{d[PTXE]}{dt} = r_{p1} + r_{p2} + r_{p3} - r_{p4} + r_{p5} - r_{p6} + r_{p7}, \quad (4.19)$$

$$\frac{d[PTX(Na^+)_2E]}{dt} = r_{p4} - r_{p5} - r_{p8}, \quad (4.20)$$

$$\frac{d[PTX(K^+)_2E]}{dt} = r_{p6} - r_{p7} - r_{p9}, \quad (4.21)$$

Supondo que a permeabilidade da membrana contendo canais iônicos induzidos pela PTX pode ser estimada em função da [PTXE] e da probabilidade de abertura do canal nesse subestado, então, para os íons Na⁺ e K⁺ foi considerado que:

$$P_{ion} = \gamma_{ion}[PTXE] \quad (4.22)$$

onde P_{ion} (cm/s) é a permeabilidade do íon (Na⁺ ou K⁺) e γ_{ion} (cm/s) é uma constante de proporcionalidade que depende da probabilidade de abertura do canal induzido. A concentração de subestados, como descrito no próximo item, é adimensional. As correntes de Na⁺ e K⁺ foram calculadas por meio da equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) de corrente (HILLE, 1992):

$$J_{ion} = P_{ion}^{PTX} z_{ion}^2 \frac{F^2 V_m}{RT} \frac{[ion]^i e^{\frac{z_{ion} F V_m}{RT}} - [ion]^o}{e^{\frac{z_{ion} F V_m}{RT}} - 1}, \quad (4.23)$$

onde J_{ion} (mA/cm²) é a densidade de corrente do íon (Na⁺ ou K⁺), V_m (mV) o potencial transmembranar, F a constante de Faraday (96.487 C/mmol), R é a constante universal dos gases (8.314 mV·C/K·mmol), T a temperatura absoluta (290.160 K) e z_{ion} é a valência do íon. $[ion]$, em mM, representa a concentração do íon e os sobrescritos i e o indicam, respectivamente, os meios intra- e extracelular.

A corrente total induzida pela PTX foi admitida como sendo:

$$J_{total}^{PTX}(t) = J_{Na} + J_K \quad (4.24)$$

IV.1.4 – Implementação do modelo e simulação

O sistema de equações foi resolvido utilizando o método das diferenças finitas (Euller), com um incremento de tempo de 0,01 ms e erro máximo de 10^{-4} . Para estimar as constantes das taxas, os resultados das simulações foram ajustados a dados experimentais em dois passos: primeiro, as constantes foram ajustadas por inspeção visual e, segundo, um ajuste fino foi obtido usando o método do gradiente. Todas as simulações foram realizadas na seqüência em que são descritas no item Resultados. A definição dessa seqüência das simulações foi direcionada pelas condições iniciais impostas pelos experimentos correspondentes, objetivando minimizar o número de parâmetros a ser ajustado em cada processo de ajuste.

Em simulações usadas para validar o modelo, o procedimento de ajuste não foi aplicado e somente as condições iniciais, refletindo os valores experimentais, foram incorporadas. Essas simulações são comparadas diretamente com os dados experimentais correspondentes.

Nas simulações, a concentração de enzimas Na/K-ATPase é usada para definir a unidade de concentração em relação a qual todas as outras concentrações foram normalizadas. As concentrações dos subestados E1 e E2 foram iniciadas iguais a 0,5, enquanto que os demais subestados da enzima foram considerados com concentrações iniciais nulas. As concentrações dos ligantes da bomba (Na^+ , K^+ e PTX) foram as mesmas das soluções intra- e extracelulares utilizadas nos experimentos correspondentes. O sistema foi mantido nessas condições até atingir o estado permanente. Posteriormente, o sistema estava pronto para simular a aplicação da PTX, reproduzindo o protocolo experimental.

Os valores das constantes do modelo de Albers-Post foram retirados da literatura (Tabela IV.3). Os valores das constantes de dissociação de Na^+ ($Kd_{\text{Na}} = 4 \text{ mM}$) e K^+ ($Kd_{\text{K}} = 12 \text{ mM}$) foram extraídos de HEYSE *et al.* (1994). A razão entre as permeabilidades de K^+ e Na^+ , $P_{\text{K}}/P_{\text{Na}}$, foi estimada por ARTIGAS e GADSBY (2004) igual a $1,13 \pm 0,02$. Portanto, nas simulações, γ_{Na} e γ_{K} foram consideradas iguais a 1,00 cm/s e 1,13 cm/s, respectivamente, uma vez que o importante é a relação.

Tabela IV.3 – Valores das constantes das reações do modelo de Albers-Post

Reação	Referência	Valores considerados	
		α_j	β_j
1	CAMPOS e BEAUGÉ (1994)	$1,00 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$	$1,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
2	HEYSE <i>et al.</i> (1994)	$2,00 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$8,00 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
3	HEYSE <i>et al.</i> (1994)	$5,00 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$	$5,00 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
4	HEYSE <i>et al.</i> (1994)	$1,00 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$	$5,00 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$

Embora todas as reações incorporadas no modelo sejam reversíveis, a imposição de um único sentido de ocorrência em alguns casos é justificada por dois motivos: (i) restrições estabelecidas pela manobra experimental; (ii) redução dos graus de liberdade das equações por meio do efeito resultante da reação.

As reações p7 e p9 (Tabela IV.2) estão incluídas na primeira situação. Como em todas as simulações $[K^+]^i = 0 \text{ mM}$, K^+ não pode se ligar à enzima na face intracelular. Portanto, foi considerado somente a desocclusão de K^+ para a reação p7. Em todas as simulações, $[PTX]^o = 0 \text{ mM}$ quando $[K^+] \neq 0 \text{ mM}$. Desta forma, a ligação de PTX a enzima contendo K^+ ocluso não pode acontecer, implicando que ocorre apenas a dissociação da PTX para a reação p9.

As reações p3, p4, p5, p6 e p8 estão incluídas na segunda situação. O sentido da reação adotado para cada uma dessas reações representa o seu efeito resultante nas condições experimentais simuladas. Em outras palavras, o valor ajustado para a constante da taxa considerada é capaz de reproduzir o efeito resultante da reação reversível. Esse procedimento é razoável uma vez que é possível inferir, a partir das condições de contorno, que a taxa da reação em uma direção sempre domina o efeito resultante em relação à taxa da outra direção.

IV.2 - Resultados

IV.2.1 – Ativação da corrente induzida pela PTX

ARTIGAS e GADSBY (2003a) realizaram experimentos para registrar a ativação da corrente induzida pela PTX enquanto as enzimas da bomba eram constantemente perfundidas com soluções intra- e extracelulares contendo apenas Na^+ ,

dentre os ligantes fisiológicos da bomba (Figura IV.1A – círculos). Para simular esse experimento (Figura IV.1A – curva contínua), as seguintes condições iniciais foram consideradas durante os primeiros 10 s: $V_m = -20$ mV, $[Na^+]^i = 150$ mM; $[Na^+]^o = 160$ mM, $[PTX]^o = [K^+]^i = [K^+]^o = 0$ mM. Reproduzindo a manobra experimental, a corrente foi ativada alterando a $[PTX]^o$ de 0 para 100 nM.

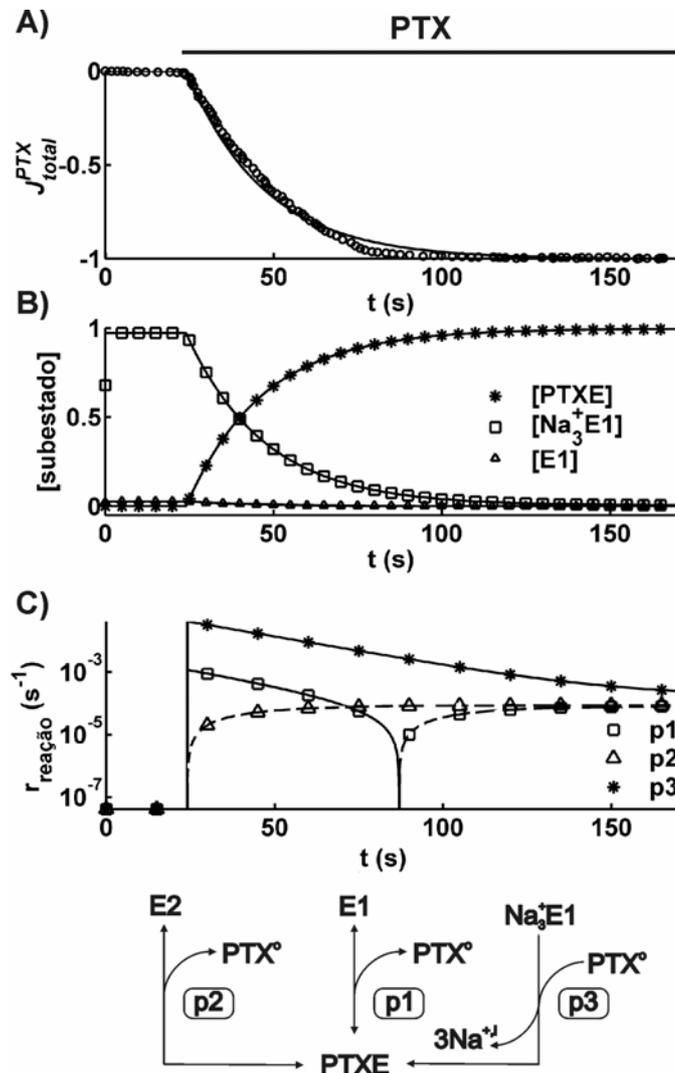


Figura IV.1 – Ativação da corrente induzida pela PTX na presença de Na^+ nas soluções de perfusão das enzimas da bomba. (A) Comparação entre a curva experimental (círculos, extraído de ARTIGAS e GADSBY, 2003a) e simulação (curva contínua). O traço na parte superior identifica o período de aplicação da PTX (100 nM). (B) Concentrações dos subestados da bomba durante a simulação. OBS: $[E2] \approx [(Na^+)_2E2] \approx 0$, devido às condições de contorno, $[(K^+)_2E2] = [PTX(K^+)_2E] = 0$. (C) Taxas das reações p1, p2 e p3 (curvas contínuas: indicam o sentido direto da reação; curvas tracejadas – sentido reverso) e o diagrama correspondente.

Para o ajuste realizado na Figuras IV.1, como $[K^+]^0 = 0$, somente seis reações do modelo envolviam a PTX (reações p1-p5 e p8, Tabela IV.2) e, portanto, oito parâmetros deveriam ser ajustados: $\alpha_{p1} - \alpha_{p5}$ e α_{p8} , β_{p1} e β_{p2} . Entretanto, considerando que o íon Na^+ não altera a ligação da PTX à bomba (HABERMANN, 1989), então, admitiu-se $\alpha_{p1} = \alpha_{p3}$. Ainda de acordo com esse autor, parece não existir um estado conformacional ao qual a PTX prefere se ligar e, portanto, assumiu-se $\alpha_{p2} = \alpha_{p1}$ e $\beta_{p1} = \beta_{p2}$. Logo, o número de parâmetros a ser ajustado foi reduzido para cinco. Além disso, somente as reações p1, p2 e p3 estão envolvidas com a ativação dos canais induzidos pela PTX. A reação p4 representa o bloqueio de canais e as reações p5 e p8, que dependem da ocorrência da reação p4, causam a reativação de canais temporariamente bloqueados e a dissociação da PTX, respectivamente. Nesse contexto, é razoável considerar que as reações p4, p5 e p8 estão envolvidas com o decaimento da corrente induzida quando a aplicação da toxina é interrompida na presença de Na^+ extracelular. Nessa condição, de acordo com os resultados experimentais de ARTIGAS e GADSBY (2003a), o decaimento da corrente apresenta uma constante de tempo relativamente lenta, sugerindo que essas três reações devem seguir a mesma dinâmica. Essa observação suporta a consideração de que as reações p4, p5 e p8 não apresentam efeitos sobre o período de ativação da corrente. Portanto, somente α_{p1} e β_{p1} foram ajustadas nessa simulação: $\alpha_{p1} = \alpha_{p2} = \alpha_{p3} = 1,00 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $\beta_{p1} = \beta_{p2} = 8,80 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

O comportamento das concentrações dos subestados durante a simulação é apresentado na Figura IV.1B. O aumento da $[PTXE]$ durante a aplicação da PTX é acompanhado pela redução simultânea de $[Na^+_3E1]$ e $[E1]$. As taxas das reações durante a ativação da corrente (Figura IV.1C) indicam que a atividade da reação p3 é mais proeminente, contribuindo para a formação do subestado PTXE. A reação p1 contribui para o aumento da $[PTXE]$ somente no início da aplicação da toxina. No decorrer da simulação, com o aumento da $[PTXE]$, a reação p1 inverte o sentido de ocorrência, causando a dissociação da PTX. A taxa da reação p2 sugere que essa reação somente atua no sentido reverso, também representando o desligamento da PTX.

IV.2.2 – Decaimento da corrente induzida pela PTX na presença de K^+ extracelular

Investigações sobre o efeito do K^+ extracelular sobre os canais induzidos pela PTX mostraram que esse íon acelera o decaimento da corrente (ARTIGAS e GADSBY,

2003a). Para simular esse experimento (Figura IV.2), as mesmas condições iniciais descritas na simulação da Figura IV.1 foram consideradas e a corrente induzida pela PTX foi ativada alterando a $[PTX]^o$ de 0 para 100 nM. Após atingir o estado permanente, o decaimento da corrente foi simulado variando, simultaneamente, a $[PTX]^o$ de 100 nM para 0, $[K^+]^o$ de 0 para 160 mM e a $[Na^+]^o$ de 160 mM para 0.

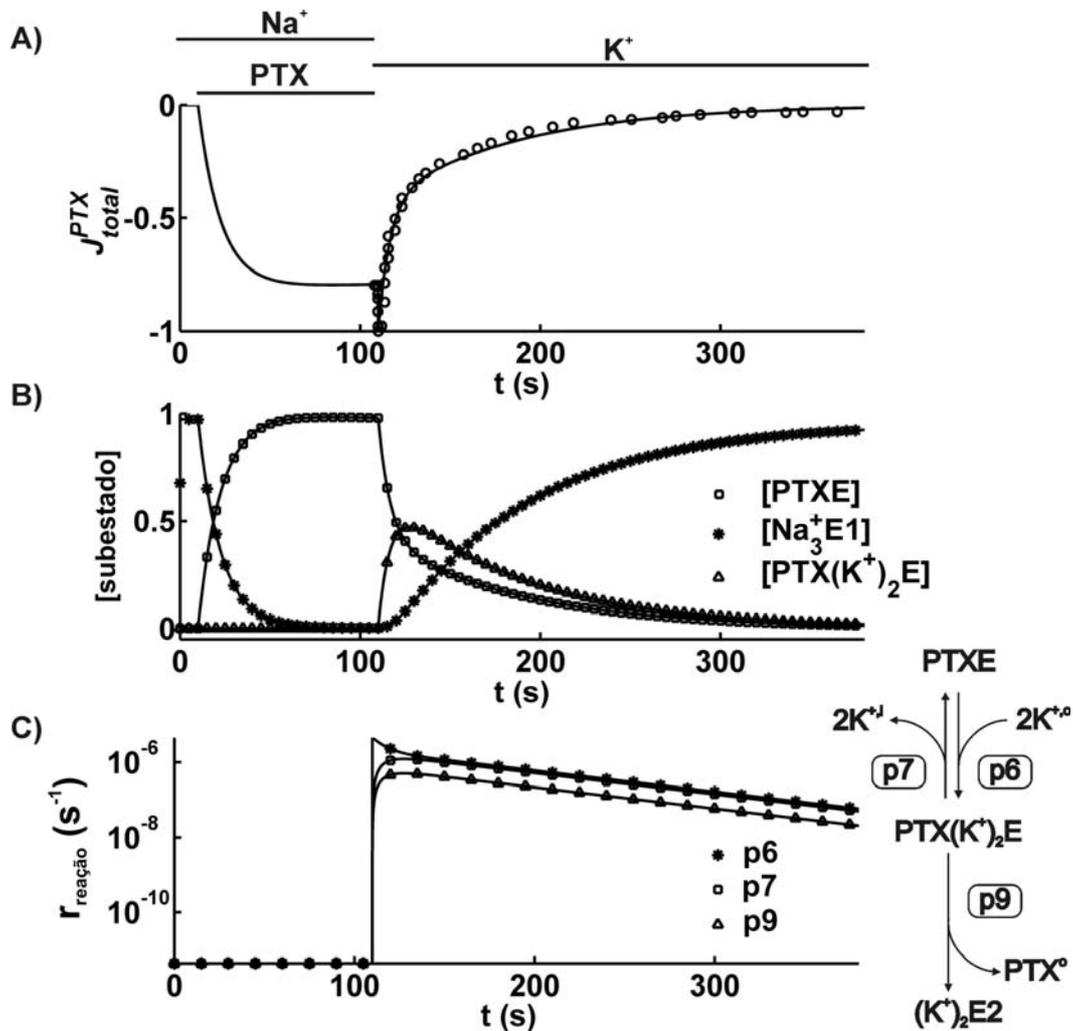


Figura IV.2 – Decaimento da corrente induzida provocado por K^+ extracelular. (A) Comparação entre os dados experimentais (círculos, extraídos de ARTIGAS e GADSBY, 2003a) e simulação (curva contínua). Após atingir o estado permanente, dadas as condições iniciais e de contorno ($[Na^+]^o = 160$ mM, $[Na^+]^i = 150$ mM, $[PTX]^o = 100$ nM, $[K^+]^i = [K^+]^o = 0$ mM e $V_m = -20$ mV), o decaimento da corrente foi simulado fazendo as seguintes alterações simultâneas: $[PTX]^o = 0$ nM, $[Na^+]^o = 0$ mM e $[K^+]^o = 160$ mM. (B) Comportamento das concentrações dos subestados PTXE, Na_3E1 e $PTX(K^+)_2E$. Os demais subestados apresentaram concentrações menores que 0,01 durante a perfusão com K^+ . (C) Taxas das reações p6, p7 e p9 e o diagrama esquemático correspondente.

Durante a desativação da corrente induzida pela PTX, o íon K^+ acelera mais a dissociação da PTX do que o íon Na^+ (ARTIGAS e GADSBY, 2003a). Supondo que somente as reações p6, p7 e p9 estejam envolvidas no decaimento da corrente induzida na presença de K^+ extracelular, apenas as constantes α_{p6} , α_{p7} e α_{p9} tiveram que ser ajustadas: $\alpha_{p6} = 1,06 \times 10^{-1} s^{-1}$, $\alpha_{p7} = 5,20 \times 10^{-2} s^{-1}$ e $\alpha_{p9} = 2,15 \times 10^{-2} s^{-1}$.

Em relação às concentrações dos subestados da bomba, a simulação indica, durante a perfusão com K^+ , uma redução rápida da $[PTXE]$, um aumento inicial seguido por um decréscimo da $[PTX(K^+)_2E]$ e um aumento da $[Na^+_3E1]$ (Figura IV.2B). Para as taxas das reações envolvendo a PTX, pode ser deduzido da Figura IV.2C que a reação p6 (que representa a oclusão de K^+ em canais induzidos) apresenta a ativação mais rápida e a taxa mais proeminente durante a perfusão com K^+ . Em resposta ao aumento da $[PTX(K^+)_2E]$, ocorre o aumento das taxas das reações p7, causando a desocclusão do K^+ , e da reação p9, levando à dissociação da PTX.

IV.2.3 – Decaimento da corrente induzida pela PTX na presença de Na^+ extracelular

Foi observado que o efeito do Na^+ sobre a corrente induzida pela PTX é diferente em relação ao do K^+ (ARTIGAS e GADSBY, 2003a), como mostrado na Figura IV.3A (Círculos). O experimento foi realizado mantendo o potencial transmembranar igual a -20 mV e com solução de perfusão intracelular livre de ATP, ADP, P e K^+ e apresentando 150 mM de Na^+ . A corrente induzida pela PTX é ativada adicionando 100 nM de PTX à solução de perfusão extracelular que contém 160 mM de Na^+ . Após a ativação, a perfusão com PTX é interrompida e a corrente induzida decai de forma extremamente lenta na presença de Na^+ extracelular (Figura IV.3A). A substituição do Na^+ extracelular por K^+ acelera de forma dramática o decaimento da corrente induzida. Retornando para a solução de perfusão extracelular livre de K^+ e com 160 mM de Na^+ , os autores observam que a reativação da corrente somente ocorre quando a PTX é reaplicada.

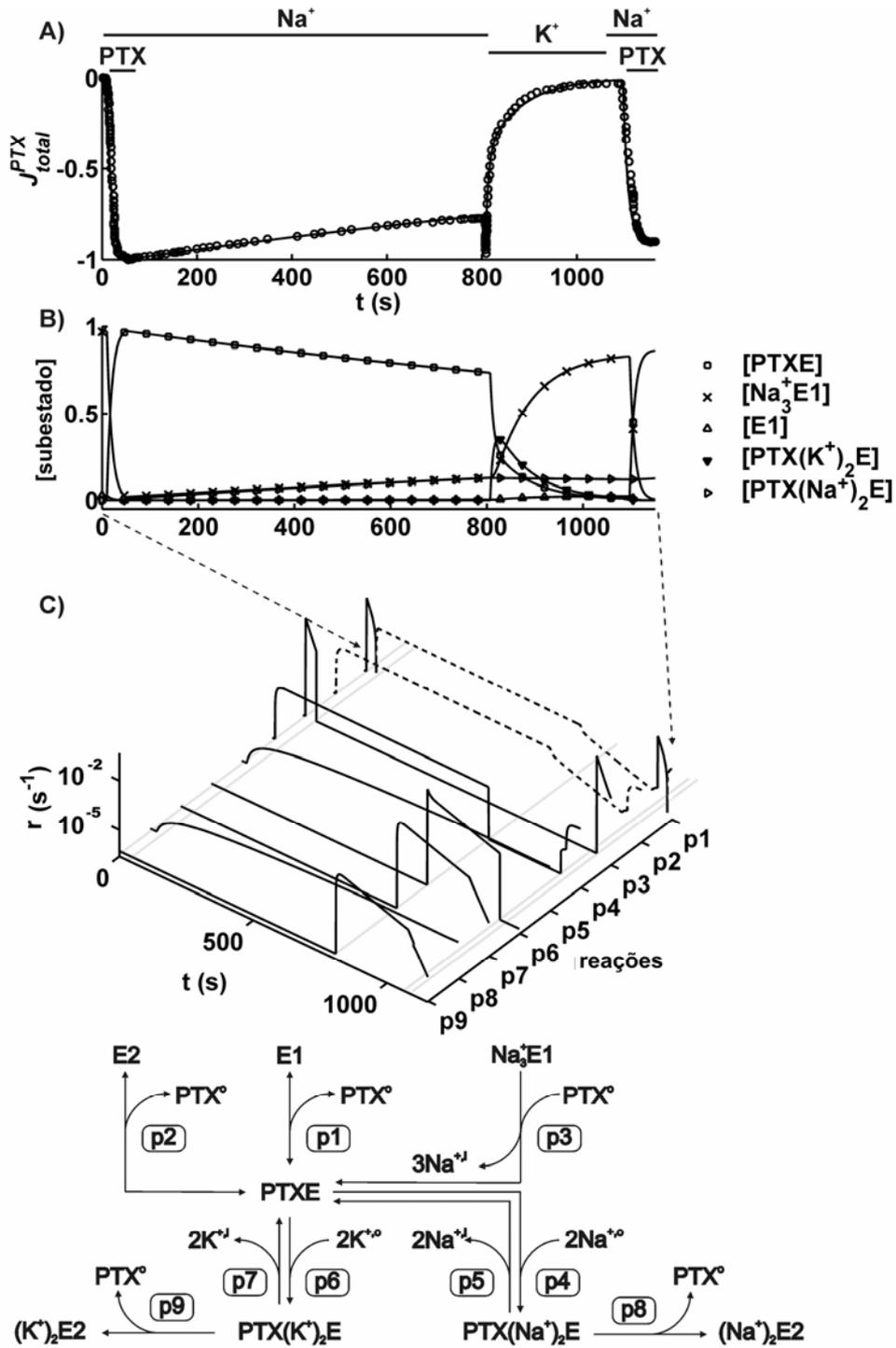


Figura IV.3 – Decaimento da corrente induzida pela PTX promovido por Na^+ e K^+ extracelulares. (A) Comparação entre dados experimentais (círculos, ARTIGAS e GADSBY, 2003a) e simulação (curva contínua). Após atingir o regime permanente, as seguintes alterações foram sustentadas durante os intervalos indicados: (i) $[PTX]^o = 100$ nM; (ii) $[PTX]^o = 0$ nM; (iii) $[Na^+]^o = 0$ mM e $[K^+]^o = 160$ mM; (iv) $[Na^+]^o = 160$ mM e $[K^+]^o = 0$ mM; (v) $[PTX]^o = 100$ nM. (B) Concentrações dos subestados. (C) Taxas das reações p1-p9 (curvas contínuas: reações no sentido direto; curvas tracejadas: reações no sentido reverso) e o diagrama esquemático correspondente.

Para simular esse experimento (Figura IV.3A – círculos), as seguintes condições foram mantidas durante os primeiros 10 s: $V_m = -20$ mV, $[Na^+]^i = 150$ mM, $[Na^+]^o = 160$ mM, $[K^+]^i = [K^+]^o = [PTX]^o = 0$ mM. Para reproduzir a manobra experimental, as modificações foram feitas na seguinte ordem: (i) a $[PTX]^o$ foi alterada de 0 para 100 nM, durante 40 s para ativar a corrente; (ii) a $[PTX]^o$ foi modificada de 100 para 0 nM, durante 800 s; (iii) a $[K^+]^o$ foi alterada de 0 para 160 mM, simultaneamente, à modificação da $[Na^+]^o$ de 160 mM para 0, durante 270 s; (iv) $[K^+]^o$ e $[Na^+]^o$ foram retornadas para 0 e 160 mM, respectivamente, durante 20 s; (v) a $[PTX]^o$ foi alterada novamente para 100 nM. Nessa simulação, somente três constantes foram ajustadas ($\alpha_{p4} = 2,12 \times 10^{-4} s^{-1}$, $\alpha_{p5} = 1,70 \times 10^{-4} s^{-1}$ e $\alpha_{p8} = 8,80 \times 10^{-5} s^{-1}$), uma vez que as demais constantes foram ajustadas nas simulações anteriores.

O comportamento das concentrações dos subestados durante a simulação (Figura IV.3B) indica que a $[PTXE]$ aumenta simultaneamente à redução das concentrações de $[Na^+_3E1]$ e $[E1]$, durante a aplicação da PTX, como descrito para a Figura IV.1. Após a interrupção da perfusão com PTX, a $[PTXE]$ gradualmente reduz e a $[Na^+_3E1]$ aumenta lentamente, na presença de Na^+ . A substituição do Na^+ pelo K^+ causou a aceleração das taxas de redução da $[PTXE]$ e aumento da $[Na^+_3E1]$. Na presença de K^+ extracelular, a $[PTX(K^+)_2E]$ sofreu um aumento inicial seguido por uma redução. O retorno da perfusão com Na^+ não apresentou efeito. Quando a PTX foi reaplicada, a $[PTXE]$ aumentou novamente, porém, apresentando um nível de saturação mais baixo. $[PTX(Na^+)_2E]$ apresentou um aumento lento durante toda simulação e as concentrações dos subestados $(Na^+)_2E2$, $(K^+)_2E2$ e $E2$ não apresentaram alterações significativas.

Para as reações envolvendo a PTX, pode ser deduzido a partir da Figura IV.3C que as taxas das reações p1 e p3 são responsáveis pela ativação da corrente induzida durante aplicação da toxina, como descrito na simulação da Figura IV.1. Após a interrupção da aplicação da PTX, as taxas de dissociação das reações p1 e p2 (sentido reverso das duas reações) apresentaram a mesma dinâmica, com um decréscimo lento na presença de Na^+ extracelular. Por outro lado, na presença de K^+ , essas taxas de dissociação reduziram drasticamente. Para as reações envolvendo Na^+ , a taxa de oclusão desse íon no complexo PTX-bomba (reação p4) foi máxima durante a perfusão da PTX e reduziu para zero durante perfusão com K^+ . A taxa de desocclusão de Na^+ (reação p5) e a taxa de dissociação da PTX a partir do subestado $PTX(Na^+)_2E$ (reação p8) apresentaram um ativação lenta durante toda a simulação.

As atividades das reações envolvendo K^+ seguiram o que foi descrito para a simulação descrita na Figura IV.2.

IV.2.4 – Decaimento da corrente induzida pela PTX durante trocas de soluções de perfusão contendo Na^+ e K^+

Para validar os ajustes descritos nos itens anteriores, uma manobra experimental adicional realizada por ARTIGAS e GADSBY (2003a) foi simulada (Figura IV.4). Os autores diferenciaram o desligamento da PTX facilitado pelo K^+ e o fechamento de canais promovido por esse íon. Para isso, o decaimento da corrente provocado pelo K^+ é interrompido, várias vezes, substituindo esse íon por Na^+ . Na simulação, os intervalos correspondentes às trocas de soluções de perfusão seguiram o protocolo experimental e os procedimentos para estudo da ativação e decaimento da corrente foram os mesmos descritos na simulação da Figura IV.3.

Como apresentado na Figura IV.4A, a simulação reproduz a dinâmica básica do registro experimental. Adicionalmente, a simulação indica que durante o intervalo que Na^+ substitui K^+ , somente as taxas das reações p4 e p6 são significativamente alteradas (Figura IV.4C). No caso da reação p4, essa alteração não causou variações significativas da $[PTX(Na^+)_2E]$. Contudo, a alteração da taxa da reação p6 claramente aumentou a $[PTXE]$ e reduziu a $[PTX(K^+)_2E]$.

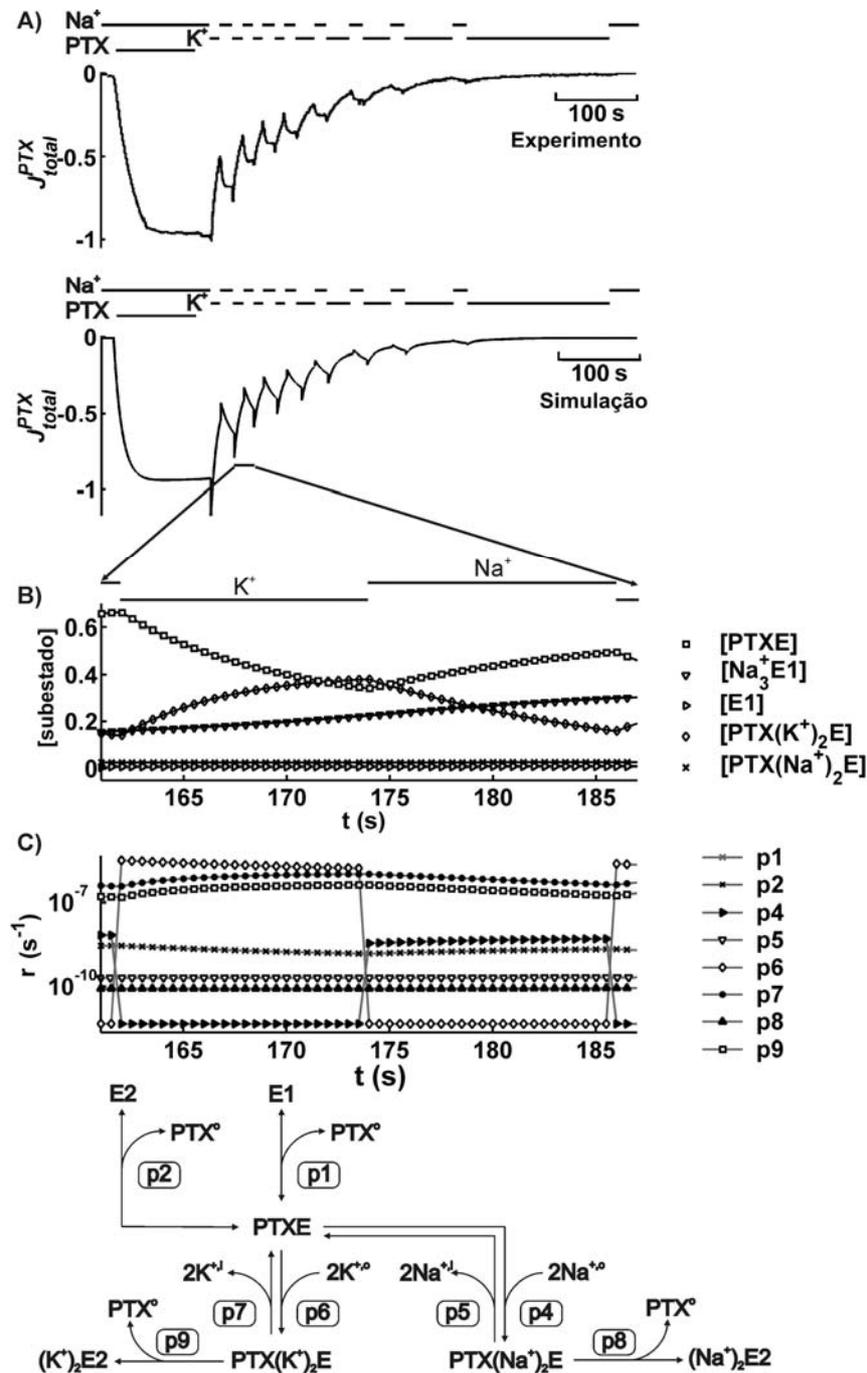


Figura IV.4 – Reativação da corrente induzida durante substituições breves de K^+ por Na^+ , na solução extracelular de perfusão. (A) Curvas experimental (extraída de ARTIGAS e GADSBY, 2003a) e simulada. Após a corrente atingir o regime permanente, com $[PTX]^o = 100$ nM, $[Na^+]^o = 160$ mM, $[Na^+]^i = 150$ mM, $[K^+]^i = [K^+]^o = 0$ mM e $V_m = -20$ mV, as seguintes alterações foram realizadas, de acordo com os intervalos de tempo indicados no topo do gráfico: (i) $[Na^+]^o = 160$ mM e $[K^+]^o = 0$ mM; (ii) $[Na^+]^o = 0$ mM e $[K^+]^o = 160$ mM. (B) Concentrações dos subestados durante as presenças de K^+ e Na^+ extracelulares. (C) taxas das reações p1-p9. As taxas das reações p1 e p2 estão superpostas e representam a dissociação da toxina.

IV.3 - Discussão

O principal objetivo desse capítulo é propor um modelo de reações para o complexo PTX-bomba de Na/K para simular e investigar os efeitos da PTX sobre a bomba de Na/K e suas interações com Na^+ e K^+ . As reações seguem a mesma estrutura do modelo de Albers-Post e foram deduzidas analisando e simulando manobras experimentais, de ARTIGAS e GADSBY (2003a), que envolvem o registro da corrente induzida pela PTX. Como apresentado na Figura IV.5, o modelo apresenta nove reações envolvendo a PTX (p1-p9) e suas respectivas constantes foram estimadas ajustando o modelo aos dados experimentais. Com um número elevado de constantes para se estimar, poderia ser esperado que várias combinações possíveis de valores dessas constantes levassem a um mesmo ajuste. Porém, o procedimento usado para estimar os parâmetros prevê esse fato. O grupo de experimentos para simular foi selecionado objetivando reduzir o número de graus de liberdade durante o processo de ajuste. Portanto, cada manobra experimental foi escolhida levando em consideração a redução de número de parâmetros estabelecido pelas condições inicial e de contorno. Tal procedimento permitiu obter um único conjunto de parâmetros para todos os dados experimentais.

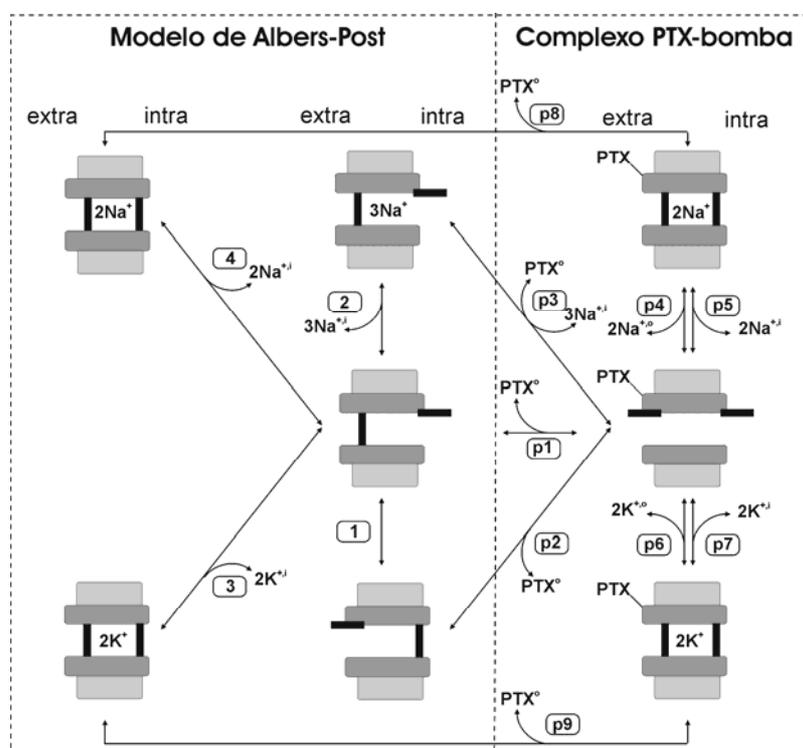


Figura IV.5 – Diagrama esquemático representando o modelo de reações para o complexo PTX-bomba de Na/K.

Suportando hipóteses propostas por ARTIGAS e GADSBY (2003a, b e 2004), as simulações indicam que o K^+ extracelular promove o bloqueio de canais induzidos pela PTX e aumenta a taxa de dissociação da toxina. Além disso, as simulações sugerem que Na^+ também atua bloqueando esses canais induzidos, de forma análoga ao K^+ . As simulações também indicam que PTX atua interferindo sobre as constantes das taxas das reações do modelo de Albers-Post, que descrevem o ciclo normal de bombeamento iônico.

IV.3.1 – Subestados da bomba de Na/K aos quais a PTX se liga

Enquanto alguns autores concluem que a PTX favorece um estado conformacional principal para se ligar, E1 (SCHEINER-BOBIS e SCHNEIDER, 1997) ou E2 (WANG e HORISBERGER, 1997), HABERMANN (1989) propôs que a toxina poderia se ligar a enzimas em ambos os estados. O presente trabalho indica que a ativação da corrente induzida na presença de Na^+ extra- e intracelular envolve a ligação de PTX a enzimas no estado conformacional principal E1, particularmente, nos subestados E1 e Na^+_3E1 (Figura IV.1). Experimentos com ativação da corrente induzida pela PTX na presença de K^+ extracelular, na ausência de nucleotídeos, não são encontrados na literatura. Esses experimentos poderiam ser realizados e, então, simulados com o modelo proposto para investigar melhor as interações da PTX com o estado conformacional E2.

IV.3.2 – Influência do K^+ sobre as interações entre PTX e a bomba

Em relação ao efeito do K^+ sobre o decaimento da corrente induzida pela PTX (Figura IV.3), ARTIGAS e GADSBY (2003a, b) interpretaram que o decaimento rápido é causado pelo bloqueio dos canais induzidos e o decaimento lento foi associado ao desligamento da PTX, ambos facilitados pela oclusão do K^+ . A simulação do presente trabalho suporta essa interpretação. A oclusão do K^+ nas enzimas ligadas à PTX (descrita pela reação p6) é associada com o decaimento rápido, quando a $[PTX(K^+)_2E]$ aumenta. Esse aumento é limitado pela desocclusão do K^+ (descrita pela reação p7). Essas duas reações exibiram uma dinâmica temporal aproximando do equilíbrio. Contudo, a atividade acoplada da reação p9, que causa a dissociação da PTX, não

permitiu que as taxas das reações p6 e p7 tornassem iguais. Conseqüentemente, ocorre a desaceleração do decaimento da corrente induzida, caracterizando o decaimento lento. Como observado por ARTIGAS e GADSBY (2003a), comparando as constantes das taxas de dissociação da PTX a partir dos subestados PTXE e $PTX(K^+)_2E$, pode ser observado que o K^+ aumenta a taxa de dissociação da PTX.

GRELL *et al.* (1988) propuseram um modelo teórico para explicar a competição observada entre K^+ e PTX, interferindo sobre a atividade da bomba. Nesse modelo, é assumido que a PTX reage exclusivamente a enzimas não ligadas à K^+ e vice-versa. Similarmente, WANG e HORIBERGER (1997) consideram que a PTX não se liga a enzimas ligadas a K^+ ou que a ligação é pouco provável de acontecer. Contudo, as simulações realizadas com o presente modelo (Figuras IV.2, 3 e 4) indicaram que o subestado $PTX(K^+)_2E$ é essencial para descrever a dinâmica da corrente induzida pela PTX.

IV.3.3 – Influência do Na^+ sobre as interações entre PTX e a bomba

Em relação ao efeito do Na^+ sobre os canais induzidos pela PTX na ausência de ATP (Figura IV.3), TOSTESON *et al.* (2003) observaram que a oclusão de Na^+ facilitada pela oligomicina não é alterada pela PTX. Esse resultado sugere que a oclusão e a desocclusão de Na^+ podem acontecer em enzimas ligadas à PTX. Na simulação, as taxas de oclusão e desocclusão do Na^+ apresentaram valores reduzidos. Contudo, apesar da baixa ocorrência do subestado $PTX(Na^+)_2E$ (≈ 0.15), a oclusão do Na^+ foi suficiente para causar uma redução do valor de regime permanente da corrente induzida durante a reaplicação da PTX, como mostrado na Figura IV.3. Baseado na simulação, pode ser proposto que a oclusão de Na^+ (reação p4), a qual contribui para o decaimento da corrente e, de forma menos eficiente, para o desligamento posterior da PTX (reação p8), também reduz o número de enzimas que poderiam ser transformadas em canais pela PTX.

ARTIGAS e GADSBY (2003a, b) levantaram a hipótese de que após a interrupção da aplicação da PTX, durante as substituições breves de K^+ extracelular por Na^+ (Figura IV.4), Na^+ seria responsável pela reabertura dos canais induzidos pela PTX que haviam sido temporariamente bloqueados pelo K^+ . Contudo, os resultados da simulação sugerem uma outra interpretação. A substituição do K^+ pelo Na^+

impossibilita novas oclusões de K^+ , permitindo o aumento da [PTXE] que é causado pela desocclusão do K^+ (reação p7). Isso resulta na falsa impressão de que o Na^+ poderia causar a reabertura de canais. O modelo, na verdade, sugere que o Na^+ , assim como o K^+ , bloqueia canais (reação p4), porém, com afinidade menor.

Capítulo V – Fosforilação e Desfosforilação do Complexo PTX-Bomba de Na/K

Recentemente, foi demonstrado que a enzima Na/K-ATPase pode ser fosforilada ou desfosforilada mesmo quando a PTX permanece ligada (ARTIGAS e GADSBY, 2002, 2003a, b e 2004; TOSTESON *et al.*, 2003; HARMEL e APELL, 2006). No entanto, ainda existem questões a serem respondidas sobre a cinética dos mecanismos de fosforilação e desfosforilação do complexo PTX-bomba de Na/K. Por exemplo, enquanto TOSTESON *et al.* (2003) observaram uma redução da quantidade de enzimas fosforiladas na presença da PTX, ARTIGAS e GADSBY (2004) concluíram, a partir de seus resultados experimentais, que a toxina favorece o estado fosforilado da bomba. Nesse contexto, o objetivo do presente capítulo é propor um modelo de reações para investigar como a PTX interfere sobre as fosforilação e desfosforilação da bomba de Na/K.

V.1 - Métodos

O modelo de reações para a fosforilação e desfosforilação do complexo PTX-bomba de Na/K foi desenvolvido adicionando ao modelo de Albers-Post reações que descrevem subestados envolvendo a PTX.

V.1.1 – Modelo de reações de Albers-Post

O conjunto de reações descrevendo transições entre os subestados dos dois estados conformacionais principais do modelo de Albers-Post é apresentado na Tabela V.1. No subestado E1, o ATP pode se ligar ao sítio de alta afinidade promovendo a transição para o subestado ATP_aE1 (reação 5). A fosforilação da enzima é descrita pela transição a partir do subestado ATP_aE1 para o subestado PE2 (reação 6). Nesse subestado, a desfosforilação da Na/K-ATPase pode ocorrer espontaneamente (reação 7) ou ATP pode se ligar ao sítio de baixa afinidade da enzima induzindo a transição para o subestado ATP_bPE2 (reação 8). A partir desse subestado, a desfosforilação da enzima leva à transição para o subestado ATP_bE2 (reação 9), o qual pode também ser resultante

da ligação do ATP ao sítio de baixa afinidade de enzimas no subestado E2 (reação 10). Alternativamente, esse subestado ATP_bE2 pode ser formado a partir da ligação de ATP a sítios de baixa afinidade de enzimas no subestado E1 (reação 11). Na ausência de ATP, transições entre E1 e E2 podem ocorrer e são representadas pela reação 1, como descrito no Capítulo IV.

Tabela V.1 – Reações do modelo de Albers-Post e as equações de suas respectivas taxas.

	Reação	Taxa da reação
1	$E2 \longleftrightarrow E1$	$r_1 = \alpha_1[E2] - \beta_1[E1]$
5	$ATP^i + E1 \longleftrightarrow ATP_aE1$	$r_5 = \alpha_5[ATP]^i[E1] - \beta_5[ATP_aE1]$
6	$ATP_aE1 \longleftrightarrow PE2 + ADP^i$	$r_6 = \alpha_6[ATP_aE1] - \beta_6[PE2][ADP]^i$
7	$PE2 \longleftrightarrow P^i + E2$	$r_7 = \alpha_7[PE2] - \beta_7[P]^i[E2]$
8	$ATP^i + PE2 \longleftrightarrow ATP_bPE2$	$r_8 = \alpha_8[ATP]^i[PE2] - \beta_8[ATP_bPE2]$
9	$ATP_bPE2 \longleftrightarrow ATP_bE2 + P^i$	$r_9 = \alpha_9[ATP_bPE2] - \beta_9[ATP_bE2][P]^i$
10	$ATP^i + E2 \longleftrightarrow ATP_bE2$	$r_{10} = \alpha_{10}[ATP]^i[E2] - \beta_{10}[ATP_bE2]$
11	$ATP^i + E1 \longleftrightarrow ATP_bE2$	$r_{11} = \alpha_{11}[ATP]^i[E1] - \beta_{11}[ATP_bE2]$

Obs.: “a” indica que ATP está ligada ao sítio de alta afinidade e “b” ao de baixa afinidade.

Como é objetivo desse capítulo estudar a fosforilação e desfosforilação do complexo PTX-bomba de Na/K na ausência de K^+ , os subestados e reações envolvendo esse íon não foram considerados. Similarmente a CAMPOS e BEAUGÉ (1994) e ROSSI e NORBY (1993), os íons Na^+ e Mg^{2+} não foram explicitamente descritos nas reações e subestados. Estudos acerca dos possíveis efeitos da variação das concentrações desses íons sobre a fosforilação do complexo PTX-bomba de Na/K ainda não constam na literatura.

V.1.2 – Modelo de reações para a fosforilação e desfosforilação do complexo PTX-bomba de Na/K

As reações propostas para modelar a ação da PTX sobre a bomba de Na/K estão apresentadas na Tabela V.2. Descrevendo a ação da PTX na ausência de ATP, observada por ARTIGAS e GADSBY (2003a, b e 2004), a reação p1 representa a

ligação da PTX à enzima no subestado E1, promovendo a formação do subestado PTXE.

Tabela V.2 – Reações para o complexo PTX-bomba de Na/K e as respectivas equações de suas taxas.

Reação	Taxa da reação
p1 $PTX^o + E1 \longleftrightarrow PTXE$	$r_{p1} = \alpha_{p1}[PTX]^o[E1] - \beta_{p1}[PTXE]$
p10 $ATP^i + PTXE \longleftrightarrow PTXATP_aE$	$r_{p10} = \alpha_{p10}[ATP]^i[PTXE] - \beta_{p10}[PTXATP_aE]$
p11 $PTXATP_aE \longleftrightarrow PTXPE + ADP^i$	$r_{p11} = \alpha_{p11}[PTXATP_aE] - \beta_{p11}[PTXPE][ADP]^i$
p12 $PTXPE \longleftrightarrow PTXE^* + P^i$	$r_{p12} = \alpha_{p12}[PTXPE] - \beta_{p12}[PTXE^*][P]^i$
p13 $ATP^i + PTXPE \longleftrightarrow PTXATP_bPE$	$r_{p13} = \alpha_{p13}[ATP]^i[PTXPE] - \beta_{p13}[PTXATP_bPE]$
p14 $PTXPE \longleftrightarrow PE2 + PTX^o$	$r_{p14} = \alpha_{p14}[PTXPE] - \beta_{p14}[PE2][PTX]^o$
p15 $PTXATP_bPE \longleftrightarrow PTX^o + ATP_bPE2$	$r_{p15} = \alpha_{p15}[PTXATP_bPE] - \beta_{p15}[PTX]^o[ATP_bPE2]$

A partir dos dados experimentais de ARTIGAS e GADSBY (2004) pode ser observado que 1 μ M de ATP reduz 70 vezes a constante de dissociação da PTX. Esse valor de concentração de ATP é suficiente para sustentar a ligação desse nucleotídeo ao sítio de alta afinidade na enzima Na/K-ATPase. Portanto, a fosforilação ocorre e pode ser assumida como responsável pela variação da constante de dissociação da PTX. Isso justifica a incorporação das reações de fosforilação no modelo. A reação p10 descreve a ligação de ATP aos sítios de alta afinidade, formando o subestado PTXATP_aE. A reação p11 representa a fosforilação da PTX descrevendo a transição entre os subestados PTXATP_aE e PTXPE.

Em relação à desfosforilação, ARTIGAS e GADSBY (2004) observaram um decaimento lento da corrente induzida pela PTX na presença de ATP em comparação aos casos em que outros nucleotídeos pobremente hidrolisáveis são utilizados. Por essa razão, os autores concluíram que a fosforilação da enzima reduz o desligamento da PTX. TOSTESON *et al.* (2003) observaram uma redução da quantidade de enzimas fosforiladas na presença da PTX. Ambas observações conduzem a incorporar no modelo dois subestado distintos: PTXE e PTXE*. O primeiro é resultante da ligação de PTX a enzimas no subestado E1 (reação p1), como descrito acima, enquanto que o segundo, da desfosforilação do complexo PTXPE (reação p12). PTXE e PTXE* devem ser

diferenciados pelas respectivas afinidades à PTX. A afinidade da enzima para PTX é provavelmente maior no subestado PTXE*.

De acordo com ARTIGAS e GADSBY (2004), a constante de dissociação da PTX não altera quando a concentração de ATP é reduzida de 5 mM para 1 μM. Contudo, na presença de 5 mM de ATP, a probabilidade de abertura dos canais induzidos é aumentada de seis vezes (ARTIGAS e GADSBY, 2003a). Quando ATP é substituído por AMPNP e ADP (nucleotídeos pobremente hidrolisáveis que reproduzem o efeito da ligação de ATP a sítios de baixa afinidade), a corrente induzida pela PTX aumenta seis vezes e não é observada alteração da constante de dissociação da PTX (ARTIGAS e GADSBY, 2004). Portanto, pode ser assumido que o ATP, quando presente em altas concentrações, se liga a sítios de baixa afinidade da Na/K-ATPase, mesmo quando a enzima está fosforilada, induzindo a transição para o subestado PTXATP_bPE (reação p13). Seguindo o esquema proposto por ARTIGAS e GADSBY (2004) para descrever a influência da PTX sobre a fosforilação da enzima, a dissociação da PTX a partir dos subestados PTXPE e PTXATP_bPE foi representada pelas reações p14 e p15, respectivamente.

V.1.3 – Modelo matemático

A contribuição de cada reação do modelo para a variação das concentrações dos subestados da enzima foi calculada estimando-se a respectiva taxa, segundo as equações das Tabelas V.1 e V.2. A taxa da reação foi admitida igual à diferença entre a taxa do sentido direto (proporcional à concentrações dos reagentes) e a taxa do sentido reverso (proporcional às concentrações dos produtos). Em função dessas taxas, as concentrações dos subestados da enzima foram calculadas por meio de:

$$\frac{d[E1]}{dt} = r_1 - r_5 - r_{11} - r_{p1} \quad (5.01)$$

$$\frac{d[ATP_a E1]}{dt} = r_5 - r_6 \quad (5.02)$$

$$\frac{d[PE2]}{dt} = r_6 + r_{p14} - r_7 - r_8 \quad (5.03)$$

$$\frac{d[ATP_b PE2]}{dt} = r_8 - r_9 + r_{p15} \quad (5.04)$$

$$\frac{d[ATP_b E2]}{dt} = r_9 + r_{11} + r_{10} \quad (5.05)$$

$$\frac{d[E2]}{dt} = r_7 - r_{10} - r_1 \quad (5.06)$$

$$\frac{d[PTXE]}{dt} = r_{p1} - r_{p10} \quad (5.07)$$

$$\frac{d[PTXATP_a E]}{dt} = r_{p10} - r_{p11} \quad (5.08)$$

$$\frac{d[PTXPE]}{dt} = r_{p11} - r_{p12} - r_{p13} - r_{p14} \quad (5.09)$$

$$\frac{d[PTXE^*]}{dt} = r_{p12} \quad (5.10)$$

$$\frac{d[PTXATP_b PE]}{dt} = r_{p13} - r_{p15} \quad (5.11)$$

onde r_j é a taxa da reação j ($j = 1, 5, \dots, 11, p1, p10, \dots, p15$).

A probabilidade de abertura dos canais induzidos pela PTX é modificada quando o ATP se liga aos sítios de baixa ou de alta afinidade ou quando a enzima é fosforilada (ARTIGAS e GADSBY, 2004). Baseando-se nessas observações, a permeabilidade de Na^+ através desses canais foi estimada em termos da concentração e da probabilidade de abertura de cada um dos subestados do complexo PTX-Na/K-ATPase que representa canal induzido:

$$P_{Na}^{PTX} = \gamma_{Na} \cdot (P_{o1}[PTXE] + P_{o2}[PTXATP_a E] + P_{o3}[PTXPE] + P_{o4}[PTXE^*] + P_{o5}[PTXATP_b PE]) \quad (5.12)$$

onde γ_{Na} é uma constante de proporcionalidade e P_{oj} ($j = 1, \dots, 5$) são coeficientes que traduzem a probabilidade de abertura dos canais nos subestados correspondentes.

A corrente de Na^+ induzida pela PTX, J_{Na} , foi calculada pela equação de corrente de GHK (HILLE, 1992):

$$J_{Na} = P_{Na}^{PTX} z_{Na}^2 \frac{F^2 V_m [Na]^i e^{\frac{z_{Na} F V_m}{RT}} - [Na]^o}{e^{\frac{z_{Na} F V_m}{RT}} - 1} \quad (5.13)$$

V.1.4 – Métodos e parâmetros do modelo

O sistema de equações diferenciais de primeira ordem (Equações 5.01-5.11) foi resolvido usando-se o método das diferenças finitas. O incremento de tempo foi 0,01 ms e o erro máximo tolerado foi 10^{-4} . Para estimar os valores das constantes, as curvas simuladas foram ajustadas aos dados experimentais em dois passos: primeiro, as constantes foram ajustadas por inspeção visual e, segundo, um ajuste fino foi realizado utilizando o método do gradiente. Na simulação utilizada para validação dos ajustes, o processo de ajuste não foi aplicado. Nesse caso, somente as condições experimentais foram representadas no modelo e os resultados experimentais foram usados apenas para comparação.

A concentração de enzimas Na/K-ATPase usada nas simulações foi considerada igual a uma unidade de concentração. Portanto, todas as outras concentrações de subestados foram normalizadas. Em todas as simulações, as concentrações dos subestados E1 e E2 foram iniciadas com valores iguais a 0,5, enquanto os demais subestados foram admitidos com concentrações iniciais nulas. Para os ligantes da bomba (Na^+ , ATP, ADP, P e PTX), os valores das concentrações foram iguais aos das soluções de perfusão intra- e extracelular utilizadas nos experimentos correspondentes. Após o sistema atingir o equilíbrio sob essas condições, as aplicações de PTX foram simuladas alterando as concentrações da toxina de acordo com o protocolo experimental.

As constantes das taxas das reações do modelo de Albers-Post foram extraídas da literatura (Tabela V.3). Todos os valores dessas constantes se referem a células de rim de diferentes espécies animais, principalmente de porco. As reações do modelo de Albers-Post, descrevendo a cinética da bomba não-modificada, foram usadas em todas as simulações apresentadas neste capítulo.

Tabela 3 – Constantes das reações do modelo de Albers-Post

Reação	Referência	Valores das constantes	
		α_j	β_j
1	CAMPOS e BEAUGÉ (1994)	$1,00 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$	$1,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
5	HEYSE <i>et al.</i> (1994)	$1,50 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$1,64 \text{ s}^{-1}$
6	CAMPOS e BEAUGÉ (1994) e HEYSE <i>et al.</i> (1994)	$1,99 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$	$1,00 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
7	CAMPOS e BEAUGÉ (1994)	$1,90 \text{ s}^{-1}$	$6,00 \times 10^1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
8	Consideradas iguais às constantes da reação 10	$1,60 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$1,60 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
9	Consideradas iguais às constantes da reação 7	$1,90 \text{ s}^{-1}$	$6,00 \times 10^1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
10	CAMPOS e BEAUGÉ (1994)	$1,60 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$1,60 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
11	β_{11} foi assumida igual a β_{10} . Seguindo o princípio da reversibilidade microscópica:	$1,60 \times 10^{-1} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$1,60 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
		$\alpha_{11} = \frac{\beta_1 \alpha_{10} \beta_{11}}{\beta_{10} \alpha_1}$	

No modelo proposto, o decaimento da corrente induzida na ausência de ATP é descrito somente pelo sentido reverso da reação p1. ARTIGAS e GADSBY (2003a) observaram uma constante de tempo $\tau = 1671 \pm 369 \text{ s}$ para o decaimento da corrente induzida pela PTX na ausência de ATP e K^+ . Portanto, a constante β_{p1} foi considerada igual a $1/\tau = 5,98 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. A constante α_{p1} foi considerada igual a $1,00 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Para a reação p10, com o objetivo de reduzir o número de graus de liberdade do modelo e baseado nas observações de que PTX interfere principalmente sobre a fosforilação e a desfosforilação da enzima (ARTIGAS e GADSBY, 2004), α_{p10} e β_{p10} foram consideradas iguais, respectivamente, a α_5 e β_5 da reação 5, a qual descreve a ligação de ATP a sítios de alta afinidade de enzimas não-modificadas no subestado E1. As constantes das outras reações envolvendo a PTX foram ajustadas durante as simulações de experimentos retirados da literatura (descritas no próximo subitem). Em todas as simulações, P_{o1} , P_{o3} e P_{o5} (da Equação 5.12) foram iguais a 0,15, 0,24 e 0,90, respectivamente, representando os valores da probabilidade de abertura dos canais induzidos medidos por ARTIGAS e GADSBY (2004). Os valores de P_{o2} e P_{o4} foram

ajustados durante as simulações. A constante γ_{Na} foi considerada igual a 1,00 cm/s (como descrito no Capítulo IV).

V.2 - Resultados

V.2.1 – Efeito da PTX sobre a fosforilação da enzima Na/K-ATPase

Investigando o efeito da PTX sobre a fosforilação da Na/K-ATPase, TOSTESON *et al.* (2003) observaram que a quantidade de enzimas fosforiladas é reduzida quando expostas a PTX. Esse fato sugere que a ligação da PTX bloqueia a ligação de ATP a sítios de alta afinidade ou estimula a liberação de P ou ambos. Como nesse experimento a $[ATP]^i$ foi muito baixa (10 μ M), a ligação de ATP a sítios de baixa afinidade é pouco provável segundo CAMPOS e BEAUGÉ (1994). Adicionalmente, antes da aplicação do ATP, quando $K_{dPTX} = \beta_{p1}/\alpha_{p1} = 0,598$ nM (ARTIGAS e GADSBY, 2004) e com $[PTX]^0 = 5$ μ M, praticamente todas as enzimas devem ocupar o subestado PTXE. Portanto, no modelo de reações proposto, a interferência da PTX sobre a quantidade de enzimas fosforiladas após a aplicação do ATP, sob essas condições, é descrita pelas reações p10, p11 e p12. As reações p10 e p11 causam a fosforilação do complexo PTX-bomba de Na/K e p12 causa a desfosforilação.

Desse modo, as reações p1, p10-p12, associadas com as reações da bomba não-modificada (reações 1 e 5-11; Tabela V.1), foram usadas para simular a manobra experimental. As seguintes condições iniciais foram consideradas: $[PTX]^0 = 5$ μ M e $[ATP]^i = [ADP]^i = [P]^i = 0$ mM. Após o sistema atingir o estado de equilíbrio, a $[ATP]^i$ foi alterada para 10 μ M. Como as constantes das reações p1 e p10 foram previamente estimados (item Métodos e parâmetros do modelo), durante essa simulação, somente as constantes α_{p11} ($\alpha_{p11} = 6,67$ s⁻¹) e α_{p12} ($\alpha_{p12} = 1,45 \times 10^{-2}$ s⁻¹) foram ajustadas. Os valores nulos de $[ADP]^i$ e $[P]^i$ impossibilitam ajustar as constantes β_{p11} e β_{p12} nessa simulação. A concentração total de enzimas fosforiladas ($[PE2]+[PTXPE]$) durante a simulação é apresentada na Figura V.1A (curva sólida) e pode ser comparada com os dados experimentais (círculos) de TOSTESON *et al.* (2003). Antes da aplicação do ATP, por meio da reação p1, a PTX causa a redução da $[E1]$ para ~ 0 e o aumento da $[PTXE]$ para ~ 1 . Analisando o comportamento dos subestados (Figura V.1B), pode ser

observado que o ATP causa a fosforilação do complexo PTX-Na/K-ATPase, por meio das reações p10 e p11. A reação p10 representa a ligação do ATP aos sítios de alta afinidade e a reação p11 a fosforilação da enzima. Por outro lado, a desfosforilação que resulta no subestado PTXE* reduz a [PTXPE].

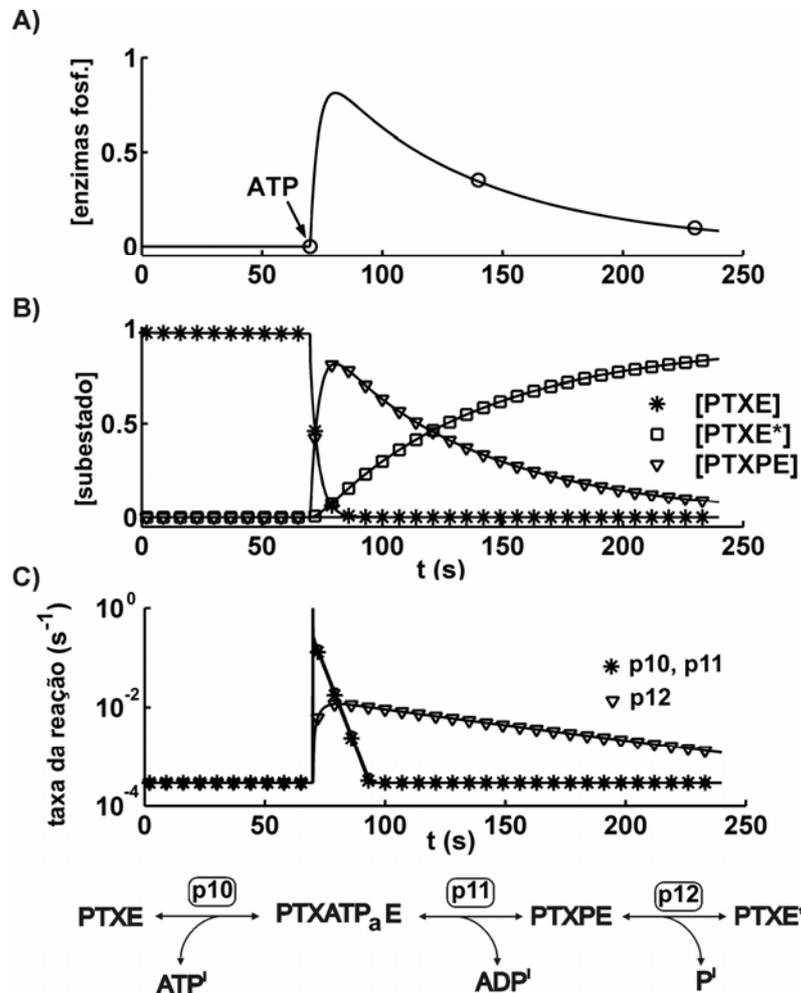


Figura V.1 – Efeito da PTX sobre a fosforilação da bomba de Na/K. (A) Comparação entre os dados experimentais (círculos) extraídos de TOSTESON *et al.* (2003) e a simulação (curva contínua). Após atingir o estado permanente, com $[PTX]^o = 5 \mu M$ e $[ATP]^i = [ADP]^i = [P]^i = 0 \text{ mM}$, a manobra experimental foi reproduzida variando a $[ATP]^i$ para $10 \mu M$. (B) Comportamento das concentrações dos subestados durante a simulação. (C) Taxas das reações p1 e p10-p12 e um diagrama esquemático representado essas reações.

TOSTESON *et al.* (2003) também realizaram experimentos em que a PTX somente é adicionada após a fosforilação das enzimas Na/K-ATPase por hidrólise de ATP (Figura V.2A – círculos). Nesses experimentos, as enzimas são continuamente

incubadas com ATP, mesmo após a adição da PTX. Os autores observaram que nessas condições experimentais a PTX também reduz a quantidade de enzimas fosforiladas.

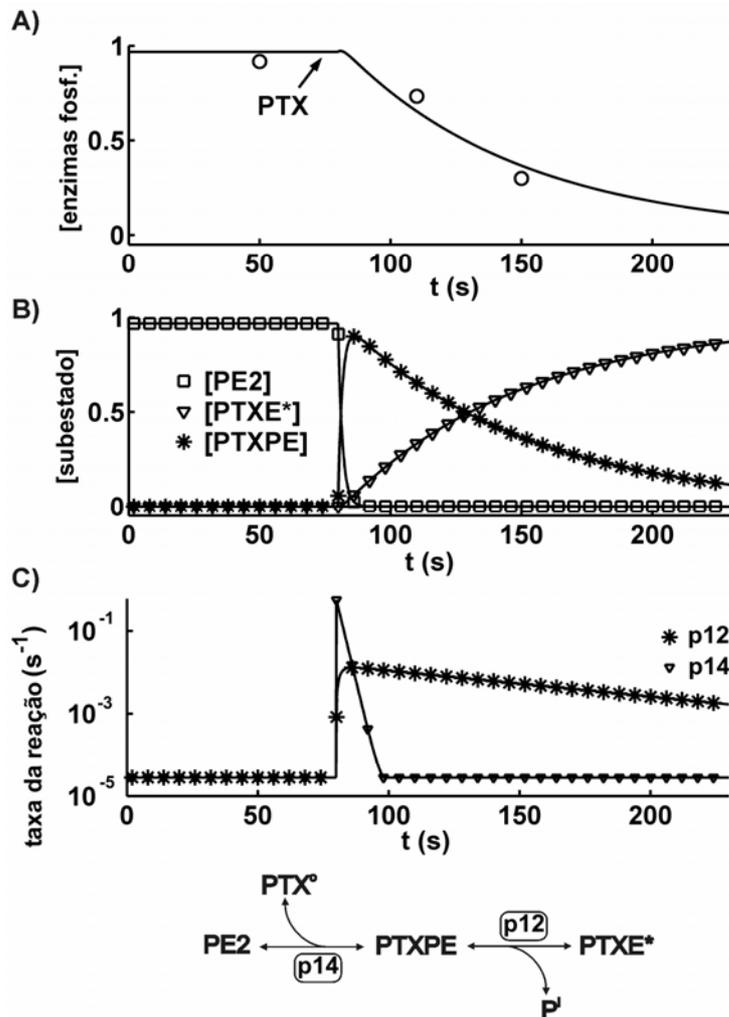


Figura V.2 – Efeito da aplicação da PTX sobre enzimas fosforiladas previamente pela adição de ATP. (A) Comparação entre dados experimentais (círculos, extraídos de TOSTESON *et al.*, 2003) e simulação (curva contínua). Após atingir o estado permanente, com $[PTX]^o = [ADP]^i = [P]^i = 0$ mM e $[ATP]^i = 10$ μ M, a manobra experimental foi representada alterando a $[PTX]^o$ para 5 μ M, no instante indicado pela seta. (B) Comportamentos das concentrações dos subestados. (C) Taxas das reações p12 e p14 e, na parte inferior, o diagrama esquemático representando essas reações.

Durante esses experimentos, antes da aplicação da PTX, quase todas as enzimas estão no subestado PE2, devido à $[ATP]^i = 10$ μ M (HEYSE *et al.*, 1993; CAMPOS e BEAUGÉ, 1994). Portanto, baseado no modelo de reações proposto, pode-se supor que a ligação da PTX a enzimas nesse subestado (reação p14) indiretamente contribui para a

redução do nível de enzimas fosforiladas, favorecendo a atuação da reação p12. Considerando a reação p14 juntamente com as reações p1, p10-p12, 1 e 5-11, a manobra experimental foi simulada com as seguintes condições iniciais: $[ATP]^i = 10 \mu\text{M}$ e $[PTX]^o = [P]^i = [ADP]^i = 0 \text{ mM}$. Após atingir o estado permanente, quando o nível de enzimas fosforiladas chega à saturação, a $[PTX]^o$ foi alterada de 0 para $5 \mu\text{M}$. Como as constantes das reações p1 e p10-p12 foram estimadas anteriormente, para essa simulação somente as constantes α_{p14} ($\alpha_{p14} = 5,00 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) e β_{p14} ($\beta_{p14} = 1,23 \times 10^2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) foram ajustadas. Na Figura V.2A, a concentração de enzimas fosforiladas ($[PE2]+[PTXPE]$) é comparada com os dados experimentais de TOSTESON *et al.*(2003). As concentrações dos subestados PE2, PTXPE e PTXE* e as taxas das reações são apresentadas nas Figuras V.2B e C, nas quais nota-se que a atuação da reação p14 causando a ligação da PTX ao subestado PE2 leva ao aumento da $[PTXPE]$, simultaneamente à redução da $[PE2]$. A atividade da reação p12, por sua vez, reduz a $[PTXPE]$ e aumenta a $[PTXE^*]$, contribuindo para a desfosforilação das enzimas. Como a $[E1]$ foi aproximadamente nula durante a simulação, as reações p1, p10 e p11 não apresentaram taxas com valores significativos.

V.2.2 – Aumento promovido pelo ATP da corrente induzida pela PTX

ARTIGAS e GADSBY (2003a) reportaram que mesmo após a corrente induzida pela PTX ter atingido o estado permanente na ausência do ATP, a aplicação desse nucleotídeo pode aumentar a corrente em cerca de seis vezes. A simulação desse experimento está apresentada na Figura V.3. Primeiramente, para reproduzir a manobra experimental (Figura V.3A), o potencial transmembranar foi mantido igual a -20 mV e foram utilizados os seguintes valores para as concentrações intra- e extracelulares dos ligantes da bomba: $[Na^+]^o = 160 \text{ mM}$, $[PTX]^o = 100 \text{ nM}$, $[Na^+]^i = 150 \text{ mM}$ e $[P]^i = [ADP]^i = 0 \text{ mM}$. Mantendo a $[ATP]^i = 0 \text{ mM}$, a corrente foi ativada até a saturação (nível correspondente ao zero na Figura V.3A). Posteriormente, a concentração de ATP foi aumentada, seguindo o mesmo protocolo experimental.

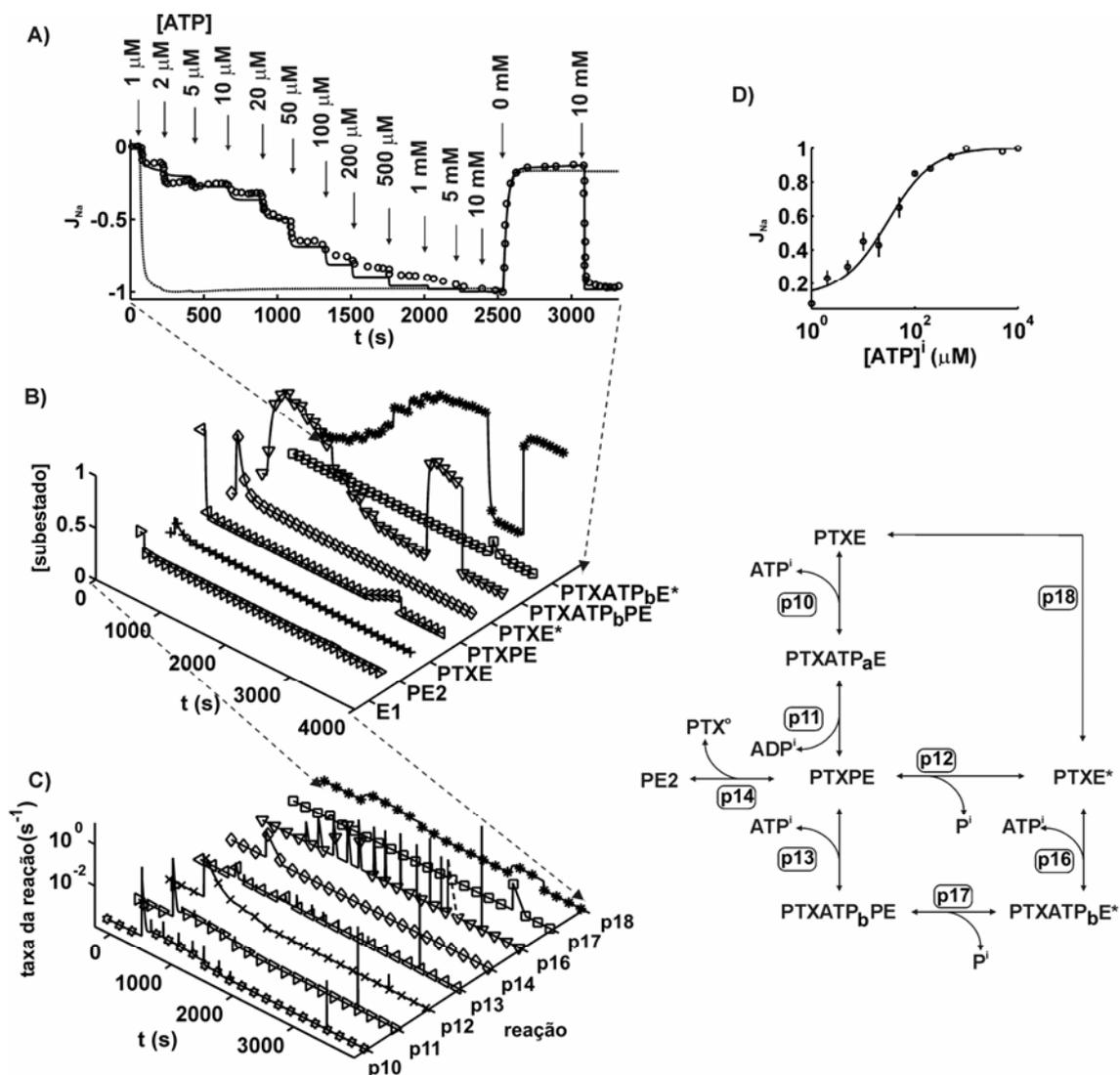


Figura V.3 – Aumento provocado pelo ATP da corrente induzida pela PTX. (A) Comparação entre dados experimentais (círculos, extraídos de ARTIGAS e GADSBY (2004)) e simulações (curvas: contínua e tracejada). A curva tracejada corresponde ao melhor ajuste sem considerar as reações p8-p10. A corrente foi ativada usando as seguintes condições iniciais: $[PTX]^o = 100$ nM, $[ATP]^i = [ADP]^i = [P]^i = 0$ mM e $V_m = -20$ mV. Após a saturação da corrente induzida pela PTX, a concentração de ATP foi aumentada de acordo com a indicação das setas. A corrente nula corresponde à saturação antes da aplicação do ATP. (B) Concentrações dos subestados durante a simulação. (C) Taxas das reações p10-p14 e p16-p18. Os trechos de curva tracejados da taxa da reação p16 indicam o sentido reverso da reação. (D) Comparação entre simulação (linha contínua) e dados experimentais (círculos, extraídos de ARTIGAS e GADSBY, 2003a) para a curva dose-resposta da corrente em função da $[ATP]^i$.

Como as enzimas Na/K-ATPase foram perfundidas previamente com PTX, praticamente todos os canais induzidos encontravam-se no subestado PTXE,

caracterizando a condição inicial para a aplicação do ATP. A partir dos valores das concentrações de ATP utilizadas, a análise das reações do modelo permite concluir que podem ocorrer transições desse subestado PTXE para PTXPE (reações p10 e p11) e PTXE* (reação p12). O ATP também pode se ligar aos sítios de baixa afinidade induzindo transições para o subestado PTXATP_bPE (envolvendo a reação p13).

Tomando as reações p1 e p10-p14 juntamente com as reações 1 e 5-11, a dinâmica da corrente induzida pela PTX não pôde ser reproduzida pela simulação, como apresentado na Figura 3A (linha tracejada). Nessa simulação, somente foram ajustados os parâmetros α_{p13} e β_{p13} , da reação p13, e P_{o2} e P_{o4} que representam as probabilidades de abertura dos canais correspondentes aos subestados PTXATP_aE, e PTXE*, respectivamente. As outras constantes foram ajustadas previamente. Uma inspeção cuidadosa das reações que estariam envolvidas no experimento e permitiriam simular o registro, sem modificar os parâmetros estimados para as reações p1, p10-p12 e p14, indica a necessidade de novas reações envolvendo a PTX (Tabela V.4). Primeiramente, como o subestado PTXE* é o mais provável nessa simulação, é razoável suspeitar que exista a ligação de ATP a sítios de baixa afinidade de enzimas nesse subestado, levando à formação do subestado PTXATP_bE* (reação p16). Esse subestado também poderia ser formado quando a enzima no subestado PTXATP_bPE é desfosforilada (reação p17). Durante o período em que $[ATP]^i = 0$ mM, após a aplicação do maior valor de concentração desse nucleotídeo (10 mM), o decaimento lento da corrente induzida pode estar associado com transições a partir do subestado PTXE* para o subestado PTXE, descritas pela reação p18.

Tabela V.4 – Reações propostas para o modelo do complexo PTX-bomba para descrever o aumento provocado pelo ATP da corrente induzida pela toxina.

Reação	Taxa da reação
p16 $ATP^i + PTXE^* \longleftrightarrow PTXATP_bE^*$	$r_{p16} = \alpha_{p16}[ATP]^i[PTXE^*] - \beta_{p16}[PTXATP_bE^*]$
p17 $PTXATP_bPE \longleftrightarrow PTXATP_bE^* + P^i$	$r_{p17} = \alpha_{p17}[PTXATP_bPE] - \beta_{p17}[PTXATP_bE^*][P]^i$
p18 $PTXE^* \longleftrightarrow PTXE$	$r_{p18} = \alpha_{p18}[PTXE^*] - \beta_{p18}[PTXE]$

Incorporando as reações p16-p18 (cujas equações das taxas estão na Tabela V.4), as equações para o cálculo das concentrações dos subestados PTXATP_bPE (Equação 5.11), PTX (Equação 5.7) e PTXE* (Equação 5.10) sofreram modificações e

foi necessário introduzir uma nova equação para descrever a taxa de variação da concentração do subestado PTXATP_bE*:

$$\frac{d[PTXE]}{dt} = r_{p1} + r_{p18} - r_{p10} \quad (5.14)$$

$$\frac{d[PTXE^*]}{dt} = r_{p12} - r_{p16} - r_{p18} \quad (5.15)$$

$$\frac{d[PTXATP_b PE]}{dt} = r_{p13} - r_{p15} - r_{p17} \quad (5.16)$$

$$\frac{d[PTXATP_b E^*]}{dt} = r_{p16} + r_{p17} \quad (5.17)$$

A equação para a permeabilidade dos canais induzidos pela PTX para Na⁺ (Equação 5.12) também foi modificada para descrever o efeito do subestado PTXATP_bE* sobre a corrente induzida pela toxina:

$$P_{Na}^{PTX} = \gamma_{Na} \cdot (P_{o1}[PTXE] + P_{o2}[PTXATP_a E] + P_{o3}[PTXPE] + P_{o4}[PTXE^*] + P_{o5}[PTXATP_b PE] + P_{o6}[PTXATP_b E^*]) \quad (5.18)$$

Como a desfosforilação da enzima na presença de Na⁺ não parece ser alterada pela ligação de ATP a sítios de baixa afinidade (CAMPOS e BEAUGÉ, 1994), a constante α_{p17} , da reação p17, foi admitida igual a α_{p12} ($\alpha_{p17} = 1,45 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). A reação de ATP com o sítio de baixa afinidade pode apresentar a mesma cinética para subestados diferentes (CAMPOS e BEAUGÉ, 1994; ARTIGAS e GADSBY, 2004), indicando que as reações p13 e p16 podem apresentar constantes iguais: $\alpha_{p13} = \alpha_{p16}$ e $\beta_{p13} = \beta_{p16}$. Para reduzir os graus de liberdade, a reação p18 foi suposta apresentando somente um sentido de ocorrência (representando o efeito líquido da reação). Em outras palavras, o valor ajustado para a constante dessa reação é capaz de reproduzir o efeito resultante dos sentidos direto e reverso da reação. Essa aproximação é razoável se é possível inferir a partir das condições de contorno que a taxa da reação apresenta um sentido sempre dominante em relação ao outro.

Portanto, utilizando-se as reações p1, p10-p14 e p16-p18 e as reações 1, 5-11, os parâmetros das reações p13 ($\alpha_{p13} = 1,33 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $\beta_{p13} = 4,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$), p16 ($\alpha_{p16} = 1,33 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $\beta_{p16} = 4,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) e p18 ($\alpha_{p18} = 3,42 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) puderam ser

ajustados de modo a simular a dinâmica da corrente induzida pela PTX observada na manobra experimental (Figura 3A – curva contínua). A probabilidade de abertura dos canais induzidos pela PTX nos subestados $PTXATP_aE$, $PTXE^*$ e $PTXATP_bE^*$ foram estimadas iguais a $P_{o2} = 0,24$, $P_{o4} = 0,24$ e $P_{o6} = 0,90$, respectivamente. Para validar o ajuste de parâmetros anterior, os valores determinados pelo processo de ajuste foram usados para simular a curva de dose-resposta do aumento da corrente em função da $[ATP]^i$ (Figura V.3D).

As concentrações dos subestados e as taxas das reações envolvidas estão apresentadas nas Figuras V.3B e V.3C, respectivamente. Inicialmente, na ausência de ATP, quase todas as enzimas estavam no subestado $PTXE$ ($[PTXE] \approx 0,85$) e $E1$ ($[E1] \approx 0,24$). A perfusão com valores reduzidos da $[ATP]^i$ (da ordem de $1 \mu M$) causou transições para os subestados $PTXPE$ e $PTXE^*$ por meio das reações p10-p12, as quais apresentaram taxas correspondentes àquelas da simulação da Figura V.1. O ATP também induziu o aumento da $[PE2]$, devido à fosforilação das enzimas que estavam no subestado $E1$ (reações 5 e 6), que contribuiu para o aumento da $[PTXPE]$, como indicado pelo aumento transiente da taxa da reação p14. Subseqüentemente, a reação p12 causou a desfosforilação resultando na redução da $[PTXPE]$ e no aumento da $[PTXE^*]$. Para concentrações de ATP mais elevadas, os sítios de baixa afinidade passaram a ser ocupados progressivamente por esse nucleotídeo (por meio da reação p16) e ocorreu o aumento da $[PTXATP_bE^*]$. Como caracterizado na Figura V.3C, para a reação p16, descrevendo transições para o subestado $PTXATP_bE^*$, existe um aumento progressivo do pico máximo das espículas da taxa da reação associado com o aumento da $[ATP]^i$. Por outro lado, a área abaixo de cada espícula apresenta uma redução também progressiva. Esse comportamento indica que a reação atinge o equilíbrio mais rápido para concentrações de ATP maiores. Quando a $[ATP]^i$ é anulada, após o nível máximo de aplicação (10 mM), a dissociação de ATP é predominante e, rapidamente, quase todas as enzimas retornam para o subestado $PTXE^*$, como mostra a taxa do sentido reverso da reação p16 (Figura V.3C). Uma vez nesse subestado, a enzima lentamente muda para o subestado $PTXE$, de acordo com a taxa da reação p18. O subestado $PTXATP_bPE$, resultante da ligação de ATP a sítios de baixa afinidade de reações no subestado $PTXPE2$, apresenta pequenos valores de concentração durante a simulação por causa da atuação da reação p17, que promove a desfosforilação das enzimas nesse subestado e forma o subestado $PTXATP_bE^*$.

V.2.3 – Ativação da corrente induzida pela PTX na presença de ATP

Quando a membrana celular é perfundida com soluções intra- e extracelular contendo Na^+ e intracelular contendo ATP, uma corrente induzida mensurável é ativada mesmo quando a $[\text{PTX}]^o$ é da ordem de 10 pM (ARTIGAS e GADSBY, 2004). A comparação entre os dados experimentais e a simulação é apresentada na Figura V.4A. A simulação foi realizada mantendo o potencial transmembranar igual a -20 mV e considerando as seguintes concentrações dos ligantes da bomba: $[\text{Na}^+]^o = 160$ mM, $[\text{Na}^+]^i = 150$ mM, $[\text{ATP}]^i = 5$ mM e $[\text{ADP}]^i = [\text{P}]^i = 0$. Como no experimento as enzimas foram previamente perfundidas com solução contendo 5 mM de ATP, a condição inicial para aplicação da PTX foi caracterizada por quase todas as enzimas no subestado ATP_bPE_2 . Para induzir a corrente através dos canais, a $[\text{PTX}]^o$ foi aumentada reproduzindo a manobra experimental (Figura V.4A). Como ATP_bPE_2 é o subestado mais provável antes da aplicação da PTX, é razoável assumir a formação do subestado PTXATP_bPE (reação p15), o qual pode ser desfosforilado resultando no subestado $\text{PTXATP}_b\text{E}^*$ (reação p17). Para a simulação apresentada na Figura V.3 (item anterior), esse é o principal subestado responsável pela corrente induzida pela PTX, quando a $[\text{ATP}]$ é maior do 5 mM. Contudo, se a dissociação da PTX não é assumida para o subestado $\text{PTXATP}_b\text{E}^*$ (Tabela V.5; reação p19), os níveis diferentes de saturação da corrente induzida em dependência da $[\text{PTX}]^o$ (Figura V.4) nunca seriam possíveis. Sem a dissociação da PTX, com $[\text{ATP}] = 5$ mM, a aplicação da toxina, mesmo para os menores valores de concentração, resultaria num aumento progressivo da $[\text{PTXATP}_b\text{E}^*]$, até esse subestado tornar-se o único possível. Todas as enzimas nesse subestado causariam a saturação máxima da corrente induzida, independentemente do valor da $[\text{PTX}]$. Somente a taxa de ativação da corrente variaria em função da $[\text{PTX}]$.

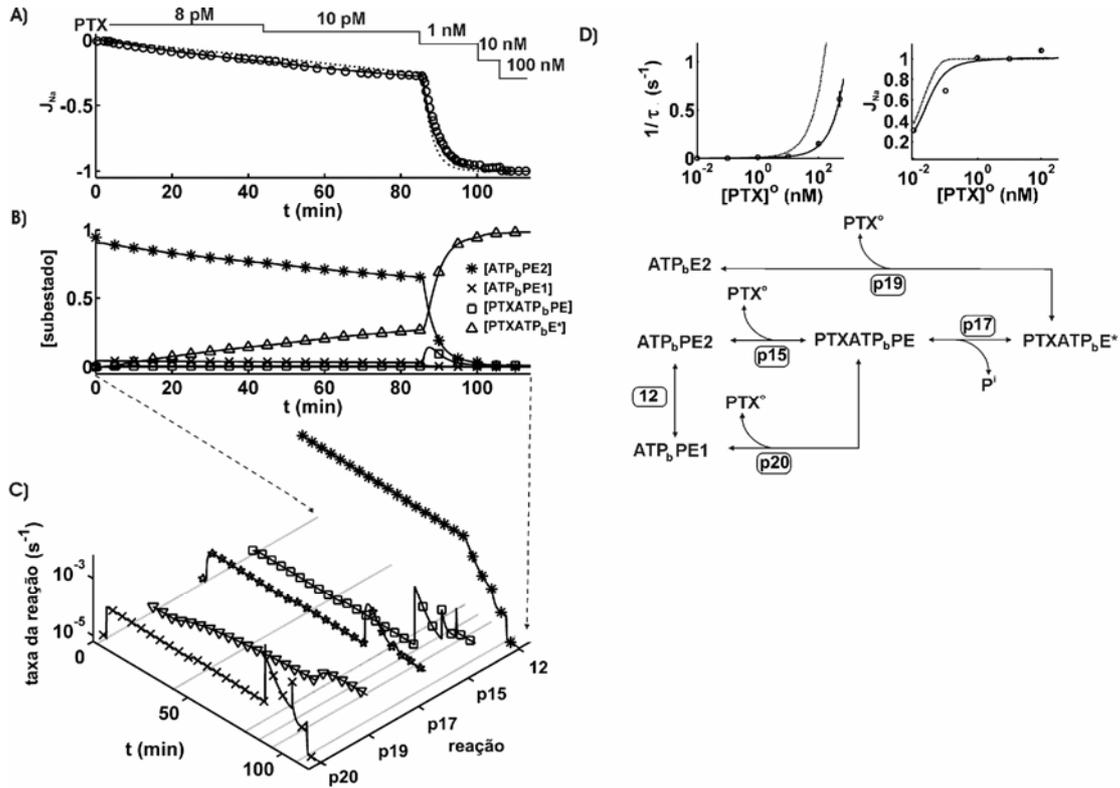


Figura V.4 – Ativação da corrente induzida pela PTX na presença de ATP intracelular. (A) Comparação entre dados experimentais (círculos; extraídos de ARTIGAS e GADSBY, 2004) e simulações (curva pontilhada e contínua). A curva tracejada corresponde ao melhor ajuste obtido sem considerar as reações 12, 13, p19 e p20. Após o sistema atingir o estado permanente com $[PTX]^o = 0$ nM, $[ATP]^i = 5$ mM, $[Na^+]^o = 160$ mM, $[Na^+]^i = 150$ mM, $[ADP]^i = [P]^i = 0$ mM e $V_m = -20$ mV, a $[PTX]^o$ foi aumentada como indicado na parte superior. (B) Concentrações dos subestados. (C) taxas das reações 12, p15, p17, p19 e p20. (D) Comparação entre simulação (curvas contínua e tracejada) e experimento (círculos; extraído de ARTIGAS e GADSBY, 2004) para as curvas dose-resposta da taxa de ativação ($1/\tau$) e valor de regime permanente (J_{Na}) da corrente induzida em função da $[PTX]^o$.

Tabela V.5 – Reações propostas para descrever a ativação da corrente induzida pela PTX na presença de ATP.

Reação	Taxa da reação
12 $ATP_bPE2 \longleftrightarrow ATP_bPE1$	$r_{12} = \alpha_{12}[ATP_bPE2] - \beta_{12}[ATP_bPE1]$
13 $ATP_bPE1 \longleftrightarrow E1 + ATP^i + P^i$	$r_{13} = \alpha_{13}[ATP_bPE1] - \beta_{13}[E1][ATP]^i[P]^i$
p19 $PTXATP_bE^* \longleftrightarrow PTX^o + ATP_bE2$	$r_{p19} = \alpha_{p19}[PTXATP_bE^*] - \beta_{p19}[PTX]^o[ATP_bE2]$
p20 $PTX^o + ATP_bPE1 \longleftrightarrow PTXATP_bPE$	$r_{p20} = \alpha_{p20}[PTX]^o[ATP_bPE1] - \beta_{p20}[PTXATP_bPE]$

A adição da reação p19 leva à reformulação das equações para o cálculo das [PTXATP_bE*] e [ATP_bE2], exigindo a incorporação da sua taxa (descrita na Tabela V.5):

$$\frac{d[PTXATP_bE^*]}{dt} = r_{p16} + r_{p17} - r_{p19} \quad (5.19)$$

$$\frac{d[ATP_bE2]}{dt} = r_9 + r_{10} + r_{11} + r_{p19} \quad (5.20)$$

O melhor ajuste para a simulação (Figura V.4A – curvas tracejadas) foi obtido ajustando-se as constantes das reações p15 (α_{p15} e β_{p15}) e p19 (α_{p19}). Analogamente à reação p18, a reação p19 foi suposta como tendo somente um sentido de ocorrência para reduzir os graus de liberdade. As constantes das outras reações p1, p10-p14 e p16-p18 foram estimadas como descrito anteriormente. Uma vez ajustadas as constantes, o modelo foi usado para reproduzir as curvas dose-resposta para a taxa de ativação e do regime permanente da corrente induzida (Figura V.4D; curvas tracejadas). Analisando a simulação, nota-se que a afinidade aparente da PTX e a taxa de ativação são ambas maiores do que é observado experimentalmente. A redução de α_{p15} , da reação p15, pode corresponder a uma redução da taxa de ativação da corrente induzida. Mas, por outro lado, para [PTX]^o menores que 1 mM, essa taxa de ativação seria muito pequena quando comparada com a observação experimental. Essas observações levam a supor a existência de um outro subestado para a bomba não-modificada, o qual teria alta afinidade a PTX, permitindo uma rápida ligação da toxina. Contudo, esse subestado deveria contribuir para a ativação da corrente induzida somente para valores reduzidos da [PTX]^o. Como essa simulação é correspondente a experimentos onde as enzimas são perfundidas com concentrações de ATP intracelulares elevadas, é razoável considerar esse subestado fosforilado e com ATP ocupando o sítio de baixa afinidade. Todos esses aspectos levam a propor o subestado ATP_bPE1, o qual deveria ser resultante da transição espontânea a partir do subestado ATP_bPE2 (Tabela V.5; reação 12) e também poderia suportar a transição para o subestado E1, permitindo a liberação de ATP e P (Tabela V.5; reação 13). Considerando o efeito desse novo subestado sobre a corrente induzida, a reação p20 também foi proposta (Tabela V.5). Essa reação descreve a ligação de PTX ao subestado ATP_bPE1 e causa a transição para o subestado

PTXATP_bPE. Finalmente, as equações para as taxas das concentrações devem ser modificadas:

$$\frac{d[E1]}{dt} = r_1 - r_5 - r_{11} - r_{p1} + r_{13} \quad (5.21)$$

$$\frac{d[ATP_bPE2]}{dt} = r_8 - r_9 + r_{p15} - r_{12} \quad (5.22)$$

$$\frac{d[PTXATP_bPE]}{dt} = r_{p13} - r_{p15} - r_{p17} + r_{p20} \quad (5.23)$$

$$\frac{d[ATP_bPE1]}{dt} = r_{12} - r_{13} - r_{p20} \quad (5.24)$$

Ajustando-se os parâmetros das reações 12 ($\alpha_{12} = 6,67 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), 13 ($\alpha_{13} = 1,35 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$), p15 ($\beta_{p15} = 1,20 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $\alpha_{p15} = \beta_{p15}\beta_{p13}\beta_{p14}\alpha_{12}/\alpha_{p13}\alpha_{p14}\beta_{12} = 7,33 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), p19 ($\alpha_{p19} = 1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) e p20 ($\alpha_{p20} = 2,16 \times 10^5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), agora é possível reproduzir a ativação da corrente em função da $[PTX]^0$ (Figura V.4A; curva contínua) e, também, as curvas dose-resposta da taxa de ativação e do regime permanente da corrente induzida (Figura V.4D). Para reduzir os graus de liberdade, as reações 12, 13 e p20, analogamente às reações p18 e p19, foram supostas apresentando apenas um sentido de ocorrência (o sentido que representa o efeito líquido da reação). A semelhança entre as curvas simulada e experimental valida o processo de ajuste (Figuras V.4A e D). A simulação também permite prever e analisar as variações de concentração dos subestados mais prováveis (Figura V.4B) e as taxas das reações (Figura V.4C). Quando a $[PTX]^0$ aumenta, existe um aumento progressivo da $[PTXATP_bE^*]$ simultaneamente à redução das $[ATP_bPE2]$ e $[ATP_bPE1]$. Para $[PTX]^0$ na ordem de 10 pM, a ocorrência sequencial das reações 12, p20 e p17 constitui a principal causa do decréscimo da $[ATP_bPE2]$ e aumento da $[PTXATP_bE^*]$. Quando a $[PTX]^0$ é alterada para 1 nM, a $[ATP_bPE2]$ é reduzida rapidamente por causa da atividade da reação p15 e, conseqüentemente, ocorre a redução da atividade da reação p17, resultando no aumento transiente da $[PTXATP_bPE]$. Portanto, $[ATP_bPE1]$ reduz para ~ 0 em resposta a atuação das reações 13 e p20. Nesse sentido, a principal contribuição para o aumento da $[PTXATP_bE^*]$ (portanto para a ativação da corrente induzida) é resultante das atividades subseqüentes das reações p15 e p17 para esse nível

de [PTX]⁰. Durante toda a simulação, a atividade da reação p19 é responsável pela dissociação da PTX a partir do subestado PTXATP_bE* e pelos diferentes níveis de corrente de regime permanente em função da [PTX]⁰.

V.3 - Discussão

O principal objetivo do presente capítulo é propor um modelo de reações para o complexo PTX-bomba de Na/K para simular e contribuir para a elucidação do efeito da PTX sobre a fosforilação e desfosforilação da Na/K-ATPase. As reações seguem a mesma estrutura do modelo de Albers-Post e foram deduzidas analisando e simulando experimentos de ARTIGAS e GADSBY (2003a e 2004) e TOSTESON *et al.* (2003). Suportando hipóteses propostas por ARTIGAS e GADSBY (2004), as simulações sugerem: (i) PTX reduz a taxa de desfosforilação da Na/K-ATPase; (ii) a ligação de ATP a sítios de baixa afinidade aumenta a probabilidade de abertura dos canais induzidos; (iii) a fosforilação da Na/K-ATPase aumenta afinidade da PTX. Além disso, as simulações computacionais sugerem: (i) a fosforilação aumenta a probabilidade de abertura dos canais induzidos; (ii) PTX reduz a taxa de fosforilação da Na/K-ATPase; (iii) PTX pode causar mudanças conformacionais levando a subestados que não podem ser fosforilados; (iv) PTX pode se ligar a enzimas em ambos os subestados dos estados principais E1 e E2 e a sua maior afinidade ocorre para o subestado que permanece fosforilada e com ATP ligado a sítios de baixa afinidade.

ARTIGAS e GADSBY (2004) concluíram a partir de suas investigações que o complexo PTX-bomba pode também ser fosforilado por meio da hidrólise de ATP. As simulações apresentadas nas Figura V.1 e V.3 suportam essa hipótese e, além disso, indicam que a reação que descreve a fosforilação do complexo pode apresentar estrutura similar à daquela do modelo de Albers-Post. Contudo, a PTX parece interferir reduzindo a taxa de fosforilação (cerca de 30 vezes: $\alpha_6/\alpha_{p11} \approx 30$). Essa redução da taxa de fosforilação pode estar associada com o fato de que a toxina sustenta a abertura simultânea das duas portas intra- e extracelular da bomba durante períodos de tempo relativamente longos. De acordo com o modelo de Albers-Post, a abertura da porta extracelular é uma característica básica do estado conformacional principal E2, no qual a bomba não pode receber o γ -fosfato do ATP (HOBBS *et al.*, 1980; CAMPOS e BEAUGÉ, 1994; SCHEINER-BOBIS, 1997; HORISBERGER, 20004). Portanto,

apesar do fato de que a porta intracelular está aberta e Na^+ e ATP podem se ligar a seus respectivos sítios na face intracelular, é razoável esperar uma redução da fosforilação.

HARMEL e APELL (2006) investigaram a influência da PTX sobre a fosforilação da bomba de Na/K detectando o movimento de íons através da bomba por meio de um indicador. A adição de PTX (100 nM) após a incubação das enzimas num meio contendo Na^+ (50 mM) não causa alterações do nível da fluorescência indicando a ocupação dos subestados E1 e $\text{Na}^+_3\text{E1}$. Contudo, a adição de ATP (0,5 mM), após a aplicação da PTX, causa uma rápida variação de fluorescência até um nível que é obtido quando bombas não-modificadas ficam fosforiladas ocupando o subestado PE2. A partir desse nível de fluorescência, ocorre um decaimento lento para um outro nível que, segundo os autores, corresponde ao subestado em que dois cátions monovalentes ocupam sítios na bomba. Esse comportamento da fluorescência é similar ao que foi observado nas simulações da concentração de enzimas fosforiladas, como apresentado na Figura V.1. Analogamente à manobra experimental, na simulação, o ATP foi adicionado após a aplicação da PTX. Como Na^+ não foi considerado explicitamente nessas simulações, E1 representa ambos os subestados E1 e $\text{Na}^+_3\text{E1}$. De acordo com as simulações, a adição da PTX causa transições de E1 para PTXE (reação p1) e a aplicação posterior de ATP leva à fosforilação do complexo PTX-bomba de Na/K (reações p10 e p11), formando o subestado PTXPE (Figura V.1). Em termos de nível de fluorescência registrado por ARMEL e APELL (2006), esse subestado pode corresponder ao subestado PE2. Portanto, de acordo com o modelo, a variação da fluorescência induzida pela aplicação do ATP após a adição da PTX pode estar associada principalmente às atividades sequenciais das reações p10 (ligação de ATP a sítios de alta afinidade) e p11 (fosforilação das enzimas). O decaimento da fluorescência após a fosforilação pela hidrólise de ATP, de acordo com o modelo, pode ser causado pela desfosforilação do complexo PTX-bomba, promovendo a formação do subestado PTXE* (reação p12). Nas simulações, as características desse subestado são diferentes daquelas do subestado PTXE e, portanto, esse subestado pode corresponder, em termos de nível de fluorescência, ao subestado da bomba de Na/K não-modificada contendo dois cátions monovalentes ligados aos sítios.

Investigando a influência do ATP sobre o comportamento da corrente induzida pela PTX, ARTIGAS e GADSBY (2004) inferiram que a PTX, reduzindo a taxa de desfosforilação, predispõe as enzimas a ocuparem o subestado fosforilado. Essa interferência pode levar à suspeita de que os achados de ARTIGAS e GADSBY (2004)

contradizem as observações de TOSTESON *et al.* (2003) que mostram que a PTX reduz a quantidade de enzimas fosforiladas. Contudo, as simulações computacionais (Figuras V.1, V.2 e V.3) sugerem que não existe essa contradição, permitindo reproduzir resultados de ambos os autores sem a necessidade de reajustar constantes do modelo. De acordo com a simulação da Figura V.1, após a fosforilação promovida pelas reações p10 e p11, o complexo PTX-bomba é desfosforilado e as enzimas passam a ocupar o subestado PTXE* (reação p12). A redução promovida pela PTX da taxa de fosforilação ($\alpha_6/\alpha_{p11} \approx 30$), a impossibilidade de refosforilação do subestado PTXE* e a pequena taxa de transição desse subestado para o subestado PTXE (α_{p18} , reação p18) explicam as observações de TOSTESON *et al.* (2003). De acordo com as simulações, PTX reduz a desfosforilação da bomba ($\alpha_7/\alpha_{p12} = 0,014$), como é sugerido por ARTIGAS e GADSBY (2004), contudo, promovendo transições para o subestado PTXE*. Pode ser observado que a corrente induzida com $[ATP]^i = 1 \mu M$ é sustentada por esse subestado (Figura V.3). Além disso, como proposto na simulação da Figura V.3, os canais induzidos associados com PTXE* têm probabilidade de abertura igual ao do subestado fosforilado PTXPE ($P_{04} = P_{03} = 0,24$). Portanto, o subestado PTXE* apresenta probabilidade de abertura 1,6 vezes maior do que o subestado PTXE ($P_{01} = 0,15$) e, quando $[ATP]^i = 1 \mu M$, o efeito resultante sugerido pela simulação é um aumento da corrente induzido até a $[PTXE^*]$ atingir a saturação. No modelo de Albers-Post, a abertura da porta extracelular é promovida pela fosforilação da bomba (CAMPOS e BEAUGÉ, 1994; HEYSE *et al.*, 1994; HORISBERGER, 2004). Nesse caso, como os subestados PTXPE e PTXE* são obtidos a partir da fosforilação do complexo PTX-bomba, a alta probabilidade de abertura dos canais induzidos nesses subestados, comparada aquela do subestado PTXE, pode ser devido ao aumento da probabilidade de abertura da porta extracelular.

Quando a $[ATP]^i$ é aumentada na Figura V.3, a taxa da reação p16 assume o comportamento de espículas (Figura V.3C), representando uma rápida ligação do ATP aos sítios de baixa afinidade. Essa ligação aumenta a $[PTXATP_bE^*]$. Os canais nesse subestado têm probabilidade de abertura igual a 0,90, de acordo com o processo de ajuste (Figura V.3A). Portanto, a corrente induzida pela PTX aumenta até o subestado $PTXATP_bE^*$ atingir o nível de saturação, que é igual a ~ 1 . No modelo de Albers-Post, a ligação de ATP aos sítios de baixa afinidade aumenta a probabilidade de abertura da porta intracelular. Desta forma, o aumento de seis vezes da probabilidade de abertura

dos canais correspondentes aos subestados $PTXATP_bPE$ e $PTXATP_bE^*$, em comparação ao subestado $PTXE^*$, pode expressar o aumento da probabilidade de abertura da porta intracelular promovido pela ligação de ATP ao sítio de baixa afinidade, como interpretado por ARTIGAS e GADSBY (2004).

Durante a interrupção da perfusão com ATP, na Figura V.3, o desligamento do ATP (sentido reverso da reação p16) leva a uma rápida redução da $[PTXATP_bE^*]$ e um aumento acoplado da $[PTXE^*]$. Como a probabilidade de abertura dos canais no subestado $PTXE^*$ é maior do que no subestado $PTXE$ ($P_{o4}/P_{o1} = 1,6$), a corrente induzida não retorna ao nível de regime permanente atingido antes da aplicação do ATP. O decaimento da corrente durante esse período em que a $[ATP]_i = 0$ mM é muito lento e expressa a baixa taxa de transição do subestado $PTXE^*$ para o subestado $PTXE$ (reação p18, $\alpha_{p18} = 3,42 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; Figura V.3C).

ISHIDA *et al.* (1983) demonstraram o bloqueio da bomba de Na/K promovido pela PTX medindo a dependência da atividade da bomba em relação à $[PTX]$. Os autores mediram a atividade da bomba por meio da concentração de fósforo liberado. De acordo com as simulações, o complexo PTX-bomba nos subestados $PTXE^*$ e $PTXATP_bE^*$ explicam o bloqueio observado por ISHIDA *et al.* (1983). Quando a $[PTX]$ aumenta, as concentrações desses dois subestados aumentam impedindo a fosforilação das enzimas Na/K-ATPase provocada pela hidrólise de ATP. Logo, ocorre a redução da atividade da bomba de Na/K.

Analogamente ao Capítulo IV, as simulações sustentam a hipótese de HABERMANN (1989), indicando que, dependendo das concentrações dos ligantes da bomba, a PTX pode se ligar a subestados de ambos estados conformacionais principais. Quando é realizada a simulação da perfusão da membrana com solução intracelular livre de ATP (Figuras V.1 e V.3), a ativação da corrente induzida durante a perfusão com PTX é promovida basicamente pela ligação da toxina ao subestado E1 (reação p1). Por outro lado, quando a simulação considera a perfusão com ATP (Figuras V.2 e V.4), as concentrações dos subestados PE2, ATP_bPE2 e ATP_bPE1 aumentam e a ativação da corrente durante a aplicação da PTX é promovida pela ligação da toxina a esses subestados (reações p13, p15 e p20). Além disso, as simulações suportam as observações de ARTIGAS e GADSBY (2004), que indicam que a enzima fosforilada tem maior afinidade à PTX. Pois, comparando as constantes de dissociação das reações p1 (β_{p1}/α_{p1}), p13 (β_{p13}/α_{p13}), p15 (β_{p15}/α_{p15}) e p20 (β_{p20}/α_{p20}), ATP_bPE2 e ATP_bPE1 são os subestados que apresentam maior afinidades à PTX. Esses resultados sugerem que

quaisquer combinações das concentrações dos ligantes da bomba que favoreçam esses dois subestados aumentam a toxicidade da PTX. Como os canais iônicos através da bomba não são observados na ausência da toxina, ARTIGAS e GADSBY (2004) concluíram que a PTX deve se ligar às enzimas antes da abertura dos canais. Além disso, sabendo que a taxa de dissociação da PTX é muito mais lenta do que as taxas de abertura e fechamento dos canais induzidos, ARTIGAS e GADSBY (2004) levantaram a hipótese de que a toxina deve se dissociar somente de canais fechados. Isso leva a considerar que quando os canais induzidos estão abertos (ou quando as duas portas da bomba estão abertas simultaneamente), a enzima Na/K-ATPase tem maior afinidade à PTX. Isso pode explicar porque, nas simulações com o modelo proposto, os subestados ATP_bPE2 e ATP_bPE1 apresentaram maiores afinidades à toxina. Em ambos os subestados, as aberturas das portas intra- e extracelular são favorecidas, respectivamente, pela fosforilação da enzima e pela ligação do ATP ao sítio de baixa afinidade.

Todos os efeitos da PTX nos diferentes tecidos celulares podem ser explicados pela modificação conformacional da bomba de Na/K, que resulta em canais iônicos monovalentes (HABERMANN, 1989; WANG e HORISBERGER, 1997). Investigações posteriores indicaram que a PTX deveria desacoplar as portas interna e externa da bomba de Na/K permitindo que essas abrissem simultaneamente (SCHEINER-BOBIS e SCHENEIDER, 1997; ARTIGAS e GADSBY, 2002, 2003a, b e 2004). As aberturas simultâneas das duas portas deveriam permitir os fluxos dissipativos de Na⁺ e K⁺, caracterizando os canais induzidos. Essa interferência sobre o acoplamento entre as duas portas sugere que a PTX pode ser uma ferramenta útil para revelar os caminhos iônicos, estrutura e mecanismos de abertura e fechamento das portas da bomba de Na/K (ARTIGAS e GADSBY, 2004 e 2006; HORISBERGER, 2004; REYES e GADSBY, 2006). Como esse tipo de investigação necessita de uma compreensão mais detalhada sobre as interações entre a PTX e a Na/K-ATPase (ARTIGAS e GADSBY, 2004), o modelo descrito nesse capítulo contribui propondo um conjunto de reações e subestados para descrever a fosforilação e a desfosforilação do complexo PTX-bomba de Na/K (Figura V.5). As simulações computacionais com o modelo permitem prever os comportamentos dos subestados conformacionais ocupados pelo complexo PTX-bomba para diferentes níveis de concentração de ATP e das reações descrevendo transições entre esses subestados.

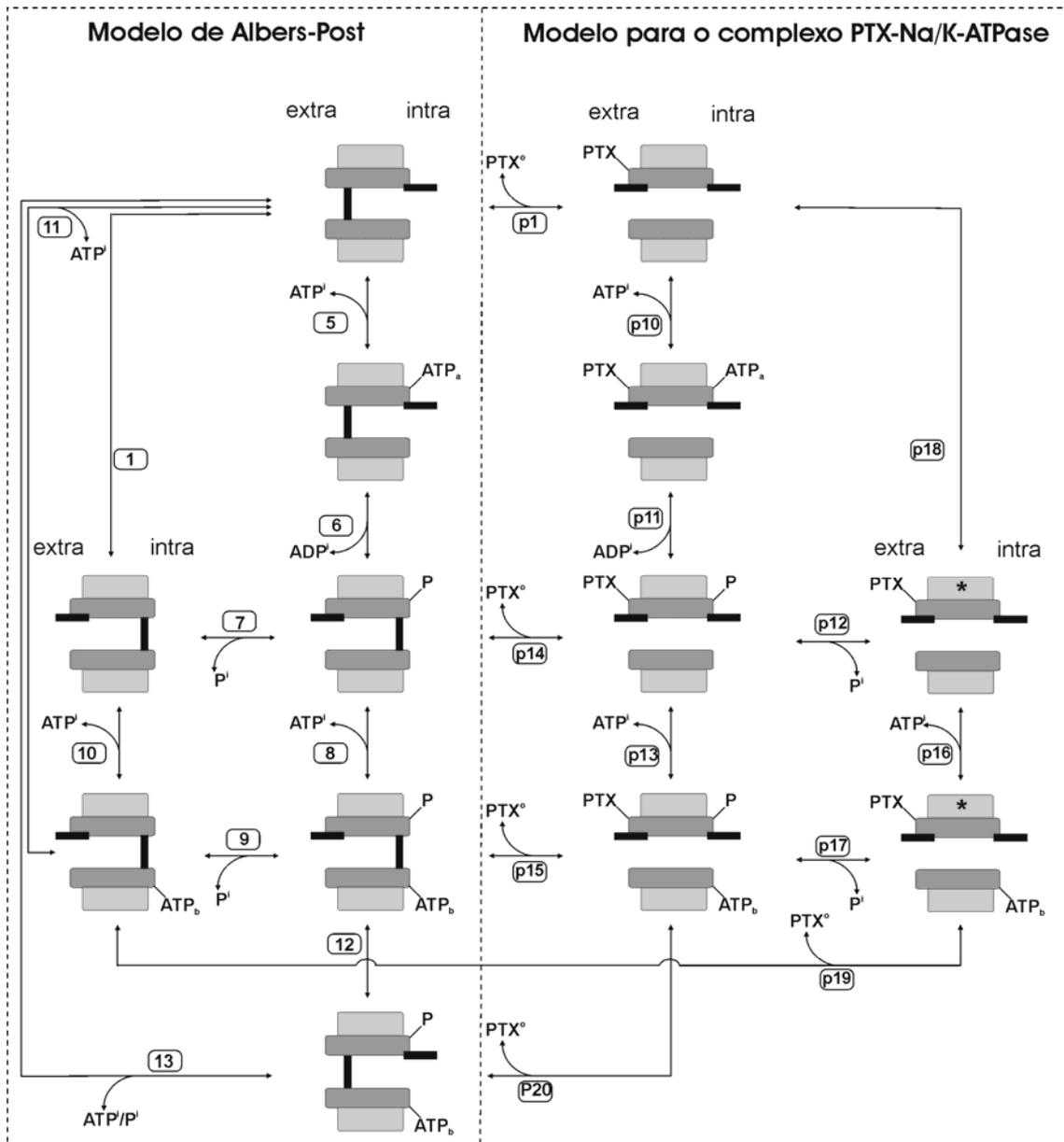


Figura V.5 – Diagrama esquemático do modelo de reações do complexo PTX-bomba de Na/K integrado ao modelo de reações de Albers-Post. Quando a PTX não está ligada, o funcionamento alternado das portas da Na/K-ATPase causa a oclusão e desocclusão dos íons transportados e dois estados conformacionais principais são possíveis: E1 (somente a porta intracelular pode abrir) e E2 (apenas a porta extracelular pode abrir). A ligação da PTX causa a transição para um terceiro estado conformacional principal E3, caracterizado por subestados em que as duas portas podem se abrir simultaneamente. As setas descrevem as reações que causam as transições entre os subestados.

Capítulo VI – Efeito Inibidor do K⁺ sobre os Canais Induzidos pela PTX

Como foi discutido nos Capítulos IV e V, o efeito da PTX é influenciado pelos ligantes fisiológicos da bomba de Na/K. No caso particular do K⁺, ISHIDA *et al.* (1983) mostraram que o aumento da concentração desse íon reduz o bloqueio exercido pela PTX sobre a bomba de Na/K. Posteriormente, essa interferência do K⁺ foi explicada propondo que a oclusão desse íon na enzima impede a ligação da toxina (GRELL *et al.*, 1988; WANG e HORISBERGER, 1997). No Capítulo IV, as simulações computacionais, reforçando as hipóteses levantadas a partir de manobras experimentais (ARTIGAS e GADSBY, 2003a, 2003b e 2004), sugerem que a oclusão do K⁺ não somente reduz a afinidade da PTX mas também causa o fechamento das portas mesmo se a toxina permanece ligada à bomba.

Houve grandes avanços na compreensão das interações entre K⁺ e o complexo PTX-bomba de Na/K. Porém, ainda não se sabe quais reações e subestados estão envolvidos na atuação da PTX sobre a bomba durante a perfusão da membrana com soluções contendo K⁺ e ATP. ARTIGAS e GADSBY (2004) mostraram que sob essas condições, a afinidade aparente da PTX é reduzida e a taxa de ativação da corrente induzida pela toxina é baixa mesmo quando a concentração da toxina é aumentada. Nesse cenário de pouca clareza sobre as interações entre K⁺ e o complexo PTX-bomba, o objetivo desse capítulo foi propor um modelo de reações que permita investigar, por meio de simulações computacionais, essas interações em circunstâncias em que o ATP está presente na face intracelular da membrana.

VI.1 - Métodos

Seguindo a metodologia empregada nos capítulos anteriores, o modelo de reações foi desenvolvido adicionando reações e subestados, para explicar o efeito da PTX sobre a bomba, ao modelo de Albers-Post. Adicionalmente, foi utilizada uma técnica para análise de sensibilidade do modelo aos parâmetros das reações. A utilização desse método é necessária neste capítulo porque o número de parâmetros analisados em uma mesma simulação é elevado.

VI.1.1 – Reações do modelo de Albers-Post

De acordo com o modelo de Albers-Post, na ausência de Na^+ , que corresponde às condições envolvidas no estudo deste capítulo, a enzima Na/K-ATPase não pode ser fosforilada e o bombeamento iônico é inibido. Contudo, as reações envolvendo K^+ e ATP podem ocorrer mesmo com as enzimas não fosforiladas. Essas reações estão listadas na Tabela VI.1. Dentre essas reações, pode-se observar que o ATP pode se ligar ao sítio de alta afinidade de enzimas no subestado E1, formando o subestado $\text{ATP}_a\text{E1}$ (reação 5). A oclusão de K^+ em enzimas no subestado E1 é possível e causa a transição para o subestado $(\text{K}^+)_2\text{E2}$, como é descrito pela reação 3. O ATP pode também ligar ao sítio de baixa afinidade quando a enzima apresenta K^+ ocluso, formando o subestado $\text{ATP}_b(\text{K}^+)_2\text{E2}$ (reação 14). E, a partir desse subestado, os dois íons K^+ podem ser liberados ocorrendo a transição para o subestado $\text{ATP}_a\text{E1}$ (reação 15). Essas quatro reações são as mais prováveis quando a membrana é perfundida apenas com ATP e K^+ (HEYSE *et al.*, 1994).

Tabela VI.1 – Reações do modelo de Albers-Post e suas respectivas taxas. α_j e β_j são, respectivamente, as constantes das taxas do sentido direto e reverso da reação j e Kd_K é a constante de dissociação de K^+ .

Reação	Taxa da reação
5 $\text{ATP}^i + \text{E1} \longleftrightarrow \text{ATP}_a\text{E1}$	$r_5 = \alpha_5[\text{ATP}]^i[\text{E1}] - \beta_5[\text{ATP}_a\text{E1}]$
3 $2\text{K}^{+,i} + \text{E1} \longleftrightarrow (\text{K}^+)_2\text{E2}$	$r_3 = \alpha_3 \frac{([\text{K}]^i)^2}{([\text{K}]^i + Kd_K)^2} [\text{E1}] - \beta_3[(\text{K}^+)_2\text{E2}]$
14 $\text{ATP}^i + (\text{K}^+)_2\text{E2} \longleftrightarrow \text{ATP}_b(\text{K}^+)_2\text{E2}$	$r_{14} = \alpha_{14}[\text{ATP}]^i[(\text{K}^+)_2\text{E2}] - \beta_{14}[\text{ATP}_b(\text{K}^+)_2\text{E2}]$
15 $\text{ATP}_b(\text{K}^+)_2\text{E2} \longleftrightarrow \text{ATP}_a\text{E1} + 2\text{K}^{+,i}$	$r_{15} = \alpha_{15}[\text{ATP}_b(\text{K}^+)_2\text{E2}] - \beta_{15}[\text{ATP}_a\text{E1}] \frac{([\text{K}]^i)^2}{([\text{K}]^i + Kd_K)^2}$

VI.1.2 – Modelo de reações para o complexo PTX-bomba de Na/K

As reações propostas para explicar o efeito da PTX sobre a bomba de Na/K estão apresentadas na Tabela VI.2. Como também proposto nos capítulos anteriores, a reação p1 representa a ligação de PTX a enzimas no subestado E1, resultando no subestado PTXE.

Tabela VI.2 – Reações do modelo para o complexo PTX-bomba de Na/K e suas respectivas taxas. α_j e β_j são, respectivamente, as constantes das taxas do sentido direto e reverso da reação j e Kd_K é a constante de dissociação de K^+ .

	Reações	Taxas das reações
p1	$PTX^o + E1 \longleftrightarrow PTXE$	$r_{p1} = \alpha_{p1}[PTX]^o[E1] - \beta_{p1}[PTXE]$
p6	$2 \cdot K^{+,o} + PTXE \longleftrightarrow PTX(K^+)_2E$	$r_{p6} = \alpha_{p6} \frac{([K^+]^o)^2}{([K^+]^o + Kd_K)^2} [PTXE] -$ $-\beta_{p6}[PTX(K^+)_2E]$
p7	$PTX(K^+)_2E \longleftrightarrow PTXE + 2K^{+,i}$	$r_{p7} = \alpha_{p7}[PTX(K^+)_2E] -$ $-\beta_{p7} \frac{([K^+]^i)^2}{([K^+]^i + Kd_K)^2} [PTXE]$
p9	$PTX(K^+)_2E \longleftrightarrow (K^+)_2E2 + PTX^o$	$r_{p9} = \alpha_{p9}[PTX(K^+)_2E] - \beta_{p9}[PTX]^o[(K^+)_2E2]$
p10	$ATP^i + PTXE \longleftrightarrow PTXATP_aE$	$r_{p10} = \alpha_{p10}[ATP]^i[PTXE] - \beta_{p10}[PTXATP_aE]$
p21	$ATP^i + PTX(K^+)_2E \longleftrightarrow PTXATP_b(K^+)_2E$	$r_{p21} = \alpha_{p21}[ATP]^i[PTX(K^+)_2E] -$ $-\beta_{p21}[PTXATP_b(K^+)_2E]$
p22	$PTXATP_b(K^+)_2E \longleftrightarrow PTXATP_aE + 2K^{+,i}$	$r_{p22} = \alpha_{p22}[PTXATP_b(K^+)_2E] -$ $-\beta_{p22}[PTXATP_aE] \frac{([K^+]^i)^2}{([K^+]^i + Kd_K)^2}$
p23	$PTX^o + ATP_b(K^+)_2E2 \longleftrightarrow PTXATP_b(K^+)_2E$	$r_{p23} = \alpha_{p23}[PTX]^o[ATP_b(K^+)_2E2] -$ $-\beta_{p23}[PTXATP_b(K^+)_2E]$
p24	$PTX^o + ATP_aE1 \longleftrightarrow PTXATP_aE$	$r_{p24} = \alpha_{p24}[PTX]^o[ATP_aE1] - \beta_{p24}[PTXATP_aE]$

Como foi descrito no Capítulo IV, o bloqueio de canais induzidos promovido pelo K^+ foi representado pela reação de oclusão desse íon (reação p6), formando o subestado $PTX(K^+)_2E$. A reação p7 descreve a desocclusão do K^+ a partir do complexo PTX-bomba e a reação p9 descreve o desligamento da PTX a partir do subestado $PTX(K^+)_2E$.

Em relação ao efeito do ATP, foi considerada a ligação de ATP ao sítio de alta afinidade, formando o subestado $PTXATP_aE$ (reação p10). Como descrito no Capítulo V, o ATP pode também ocupar o sítio de baixa afinidade no complexo PTX-bomba. Portanto, é razoável incorporar no modelo a reação p21, supondo que essa leva à formação do estado $PTXATP_b(K^+)_2E$. Analogamente ao modelo de Albers-Post, a reação p22 descreve a liberação de K^+ a partir desse subestado causando a formação do

subestado $PTXATP_aE$. Essa reação pode traduzir a reabertura de canais induzidos que foram temporariamente bloqueados pelo K^+ .

Como existem evidências que a PTX pode se ligar a diferentes subestados de ambos os estados conformacionais principais E1 e E2 (como discutido no Capítulo V), é razoável considerar as reações p23 e p24 representando as ligações da toxina a enzimas nos subestados $ATP_b(K^+)_2E2$ e ATP_aE1 , que causam transições, respectivamente, para os subestados $PTXATP_b(K^+)_2E$ e $PTXATP_aE$.

Todas as reações e subestados do modelo, inclusive as do modelo de Albers-Post, estão representados na Figura V.1.

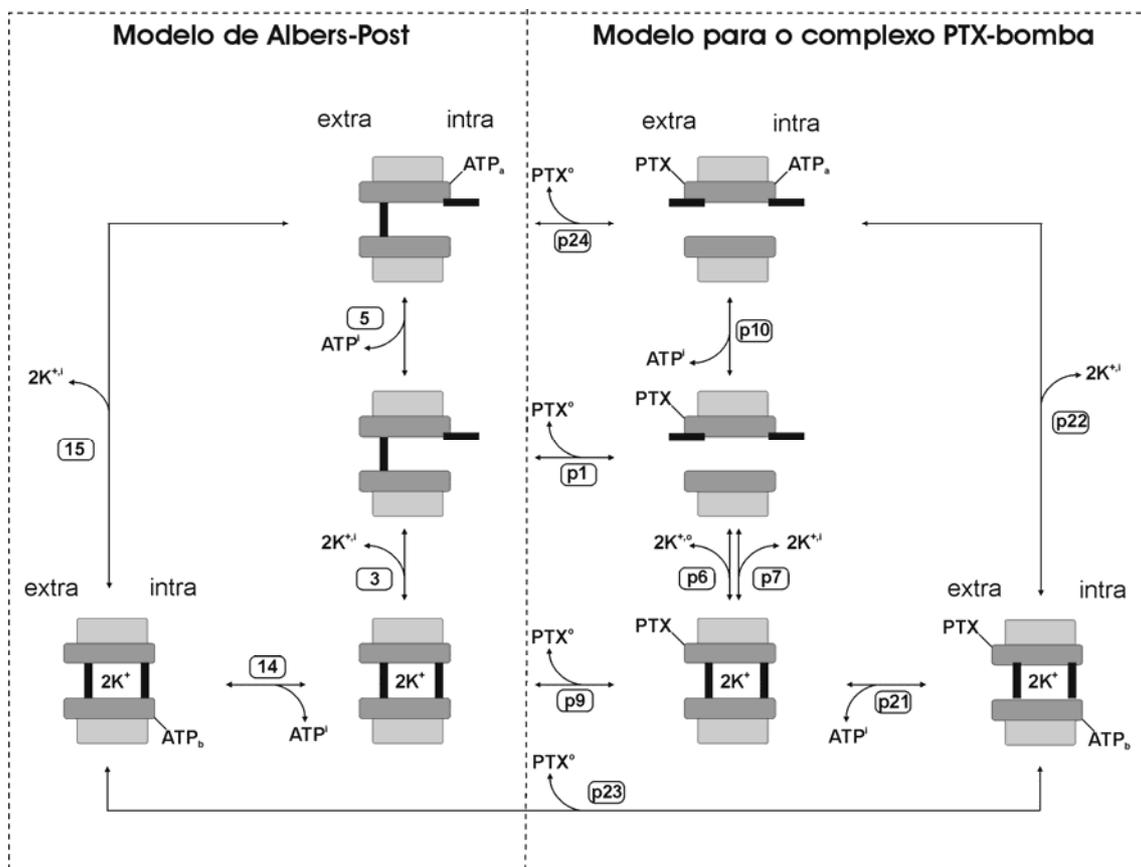


Figura VI.1 - Diagrama esquemático do modelo de reações proposto para explicar o efeito de PTX sobre a bomba de Na/K. Os canais induzidos pela PTX são caracterizados pela abertura simultânea das duas portas da bomba.

VI.1.3 – Modelo matemático

Nas Tabelas VI.1 e VI.2, são apresentadas as equações usadas para calcular as taxas das reações. A taxa de cada reação foi considerada igual à diferença entre as taxas

dos sentidos direto e reverso. Em função das taxas das reações, as variações das concentrações dos subestados foram calculadas, em cada instante de tempo, resolvendo as seguintes equações:

$$\frac{d[E1]}{dt} = -r_5 - r_3 - r_{p1} \quad (6.01)$$

$$\frac{d[ATP_a E1]}{dt} = r_5 + r_{15} - r_{p24} \quad (6.02)$$

$$\frac{d[ATP_b (K^+)_2 E2]}{dt} = r_{14} - r_{15} - r_{p23} \quad (6.03)$$

$$\frac{d[(K^+)_2 E2]}{dt} = r_3 - r_{14} + r_{p9} \quad (6.04)$$

$$\frac{d[PTXE]}{dt} = r_{p1} - r_{p6} + r_{p7} - r_{p10} \quad (6.05)$$

$$\frac{d[PTX(K^+)_2 E]}{dt} = -r_{p9} + r_{p6} - r_{p7} - r_{p21} \quad (6.06)$$

$$\frac{d[PTXATP_a E]}{dt} = r_{p24} + r_{p10} + r_{p22} \quad (6.07)$$

$$\frac{d[PTXATP_b (K^+)_2 E]}{dt} = r_{p21} - r_{p22} + r_{p23} \quad (6.08)$$

onde r_j é a taxa da reação j ($j = 3, 5, 14, 15, p1, p6, p7, p9, p10$ e $p21-p24$).

Os subestados PTXE e PTXATP_aE representam canais iônicos induzidos com probabilidades de abertura diferentes (Capítulo V). Estimando a permeabilidade de K⁺, P_K , através desses canais:

$$P_K = \gamma_K \cdot (P_{o1}[PTXE] + P_{o2}[PTXATP_a E]) \quad (6.09)$$

onde γ_K é uma constante de proporcionalidade e P_{o1} e P_{o2} são, respectivamente, as probabilidades de abertura dos canais nos subestados PTXE e PTXATP_aE.

A corrente de K⁺ (J_K), que corresponde à corrente induzida pela PTX, foi calculada pela equação de GHK de corrente (HILLE, 1992):

$$J_K = P_K z_K^2 \frac{F^2 V_m}{RT} \frac{[K]^i e^{\frac{z_K F V_m}{RT}} - [K]^o}{e^{\frac{z_K F V_m}{RT}} - 1} \quad (6.10)$$

onde V_m é o potencial transmembranar, F é a constante de Faraday, R a constante dos gases, T a temperatura absoluta e z_K a valência do K^+ .

VI.1.4 – Métodos e parâmetros do modelo

Para investigar as interações do íon K^+ com o complexo PTX-bomba, o efeito de cada reação envolvendo a PTX foi testado simulando manobras experimentais realizadas por ARTIGAS e GADSBY (2004), que permitem estimar a taxa de ativação e a amplitude de regime permanente da corrente induzida pela PTX quando a membrana é perfundida com soluções contendo K^+ e ATP. Nas simulações, o sistema de equações foi resolvido usando o método de diferenças finitas. O incremento de tempo entre iterações foi 0,01 ms. Para estimar os valores dos parâmetros que não podem ser obtidos da literatura, as curvas simuladas foram ajustadas aos dados experimentais. O processo de ajuste consistiu de dois passos: primeiro, um ajuste por inspeção visual e, segundo, um ajuste fino usando o método do gradiente.

Com o objetivo de normalização, a concentração total de enzimas Na/K-ATPase foi considerada igual a uma unidade de concentração. Portanto, em todas as simulações, a concentração de enzimas no subestado E1 foi iniciada com valor 1,00 e as outras concentrações de subestados com valor nulo.

Os valores das constantes do modelo de Albers-Post foram extraídos da literatura e se referem a experimentos realizados com células de rim. Baseando no trabalho de HEYSE *et al.* (1994), os valores usados para as constantes das taxas dos sentidos direto (α) e reverso (β) são: (i) reação 5 - $\alpha_5 = 1,50 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $\beta_5 = 1,64 \text{ s}^{-1}$; (ii) reação 3 - $\alpha_3 = 5,00 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ e $\beta_3 = 5,00 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$; (iii) reação 14 - $\alpha_{14} = 5,00 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $\beta_{14} = 5,00 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ (onde $Kd_{ATP} = \beta_{14}/\alpha_{14} = 0,100 \text{ mM}$ para os sítios de baixa afinidade); (iv) reação 15 - $\alpha_{15} = 2,41 \text{ s}^{-1}$. A constante β_{15} foi estimada usando o princípio da reversibilidade microscópica: $\beta_{15} = \alpha_{15}\beta_5\alpha_3\alpha_{14}/\alpha_5\beta_3\beta_{14} = 24,1 \text{ s}^{-1}$. Essas reações descrevendo a cinética da bomba não-modificada foram usadas em todas as simulações apresentadas.

Em relação às reações que descrevem as interações entre PTX e a bomba de Na/K, as constantes são referentes a experimentos realizados com células HEK293 (*human embryonic kidney*) e com células de rim de porco. Considerando os valores de constantes estimadas no Capítulo V: (i) reação p10 - $\alpha_{p10} = 1,50 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $\beta_{p10} = 1,64 \text{ s}^{-1}$; (ii) reação p1 - $\alpha_{p1} = 1,00 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $\beta_{p1} = 5,98 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; (iii) reação p21 - $\alpha_{p21} = 1,33 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $\beta_{p21} = 4,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. No caso da reação p21, analogamente ao que foi considerado por CAMPOS e BEAUGÉ (1994) para a bomba não-modificada, no presente trabalho foi admitido que a ligação de ATP ao sítio de baixa afinidade apresenta a mesma cinética estando ou não o íon K^+ ocluído no complexo PTX-bomba.

Utilizando as constantes estimadas no Capítulo IV: (i) reação p6 - $\alpha_{p6} = 1,06 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $\beta_{p6} = 0 \text{ s}^{-1}$; (ii) reação p7 - $\alpha_{p7} = 5,20 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $\beta_{p7} = 0 \text{ s}^{-1}$; (iii) reação p9 - $\alpha_{p9} = 2,15 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Considerando o princípio da reversibilidade microscópica: $\beta_{p9} = \alpha_{p9}\beta_3\alpha_{p1}\alpha_{p6} / \alpha_3\beta_{p1}\alpha_{p7} = 6,67 \times 10^2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. As constantes β_{p6} e β_{p7} foram consideradas nulas porque as reações p6 e p7, no Capítulo IV, foram representadas apenas pelo efeito resultante entre suas respectivas taxas do sentido direto e reverso.

As constantes das outras reações foram estimadas durante as simulações das manobras experimentais (descritas no subitem *Resultados*). A constante de dissociação do K^+ , Kd_K , foi considerada igual a 12 mM (HEYSE *et al.*, 1994) tanto para bombas não-modificadas quanto para o complexo PTX-bomba. Essa consideração é aceitável porque a PTX parece interferir principalmente com a taxa de liberação do íon K^+ (TOSTESON *et al.*, 2003).

A constante de proporcionalidade γ_K (Equação 6.09) foi assumida igual a 1,15 cm/s (Capítulo IV). Em relação à probabilidade de abertura dos canais induzidos (Capítulo V): (i) $\text{PTXE} - P_{o1} = 0,15$; (ii) $\text{PTXATP}_a\text{E} - P_{o2} = 0,24$.

VI.1.5 – Análise de sensibilidade dos parâmetros

Para estudar a sensibilidade dos parâmetros, foi utilizada uma análise de sensibilidade global (GSA – *global sensitivity analysis*) baseada no método de Monte Carlo, seguindo o procedimento descrito por CHO *et al.* (2003). De forma resumida, a GSA explora todo o espaço de parâmetros para analisar a sensibilidade de cada parâmetro testado (TANG *et al.*, 2006). Particularmente no presente trabalho, as

constantes envolvendo a PTX foram os parâmetros selecionados para a análise. Para cada parâmetro analisado, foi selecionado um intervalo com extremos em um quinto e cinco vezes o seu valor nominal (CHO *et al.*, 2003). Pode ser observado que esse intervalo para variação dos parâmetros é da ordem de grandeza dos intervalos de variação dos parâmetros das reações do ciclo funcional da bomba não-modificada, estimados por HEYSE *et al.* (1994). Amostrando em cada intervalo um valor, usando números aleatórios com uma distribuição uniforme, séries de conjuntos de valores dos parâmetros foram definidas. Uma vez definidos todos os conjuntos de valores, as simulações correspondentes foram computadas. Isso permitiu calcular a função objetiva, $f_{obj}(k)$, para cada parâmetro, considerando o valor k do parâmetro:

$$f_{obj}(k) = \sum_{i=1}^q (J_{nominal}(i) - J_{alterado}(i, k))^2 \quad (6.11)$$

onde $J_{nominal}(i)$ denota o valor da corrente induzida correspondente a i -ésima amostra temporal, obtida utilizando os valores nominais dos parâmetros; $J_{alterada}(i, k)$ denota a corrente induzida correspondente a i -ésima amostra temporal obtida na simulação com o valor k do parâmetro; q é o número de pontos amostrais no tempo.

Cada conjunto de valores dos parâmetros foi classificado como aceitável ou não-aceitável comparando o valor correspondente da função objetiva com um dado critério. O critério adotado foi a média dos valores de todas as funções objetivas calculadas. De acordo com CHO *et al.* (2003), esse critério permite identificar variações “relativamente” grandes. Adicionalmente, outros critérios considerando porcentagens do valor médio de todas as funções objetivas, objetivando identificar parâmetros associados com variações mais limitadas.

A sensibilidade de cada parâmetro foi estimada comparando as distribuições acumuladas dos valores dos parâmetros associados com os resultados aceitável ou não-aceitável. Se as duas distribuições de frequência acumulada, de valores aceitáveis e não-aceitáveis, são diferentes segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov e apresentam um coeficiente de correlação reduzido, o parâmetro é classificado como sensível. Caso contrário, o parâmetro é não-sensível.

VI.2 - Resultados

Para reproduzir as curvas dose-resposta da taxa de ativação e da amplitude de regime permanente da corrente induzida pela PTX na presença de K^+ intra- e extracelular e ATP intracelular (extraídas de ARTIGAS e GADSBY, 2004), as seguintes condições iniciais foram consideradas: $[PTX]^0 = 0$ mM, $[ATP]^i = 5$ mM, $[K^+]^i = 150$ mM, $[K^+]^o = 160$ mM. Após o sistema atingir o estado permanente sob essas condições, a $[PTX]^0$ foi alterada de 0 para valores no intervalo de 0,1 a 1000 nM e a taxa de ativação e a corrente de regime permanente foram determinadas.

As reações 3, 5, 14, 15, p1, p6, p7, p9, p10 e p21 são as únicas cujas constantes já foram estimadas. As simulações das curvas baseadas exclusivamente nessas reações são sempre inferiores (em amplitude) aos pontos (círculos) correspondentes aos dados experimentais (Figura VI.2A – simulação I). Analisando as concentrações dos subestados (Figura VI.2B-I), as bombas não-modificadas ocupam principalmente os subestados ATP_aE1 ($[ATP_aE1] \approx 0,52$) e $ATP_b(K^+)_2E2$ ($[ATP_b(K^+)_2E2] \approx 0,48$). As concentrações dos subestados E1 e $(K^+)_2E2$ são praticamente nulas, levando a valores reduzidos para as taxas das reações p1 e p9. Isso justifica porque a toxina apresentou atuação menos intensa na simulação.

Na simulação, os subestados ATP_aE1 e $ATP_b(K^+)_2E2$ apresentam valores de concentração relativamente elevados antes da aplicação da PTX. Como o K^+ é o principal inibidor fisiológico do efeito da PTX, aumentando a sua taxa de dissociação (HABERMANN, 1989; ARTIGAS e GADSBY, 2003a, 2003b e 2004), o subestado $ATP_b(K^+)_2E2$ deve apresentar baixa afinidade à toxina. Portanto, o subestado ATP_aE1 é o principal candidato para a ligação da toxina durante a ativação da corrente. Isso justifica considerar a reação p24, que descreve a ligação da toxina a esse subestado, durante as simulações das duas curvas do tipo dose-resposta. O valor da constante α_{p24} obtido para o melhor ajuste na Figura VI.2A (simulação II) foi igual a $6,00 \times 10^1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. A constante β_{p24} foi estimada considerando o princípio da reversibilidade microscópica: $\beta_{p24} = \alpha_{p24}\beta_{p10}\beta_{p1}\alpha_5/\alpha_{p10}\alpha_{p1}\beta_5 = 3,60 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Contudo, a curva da taxa de ativação simulada não correspondeu ao comportamento observado experimentalmente.

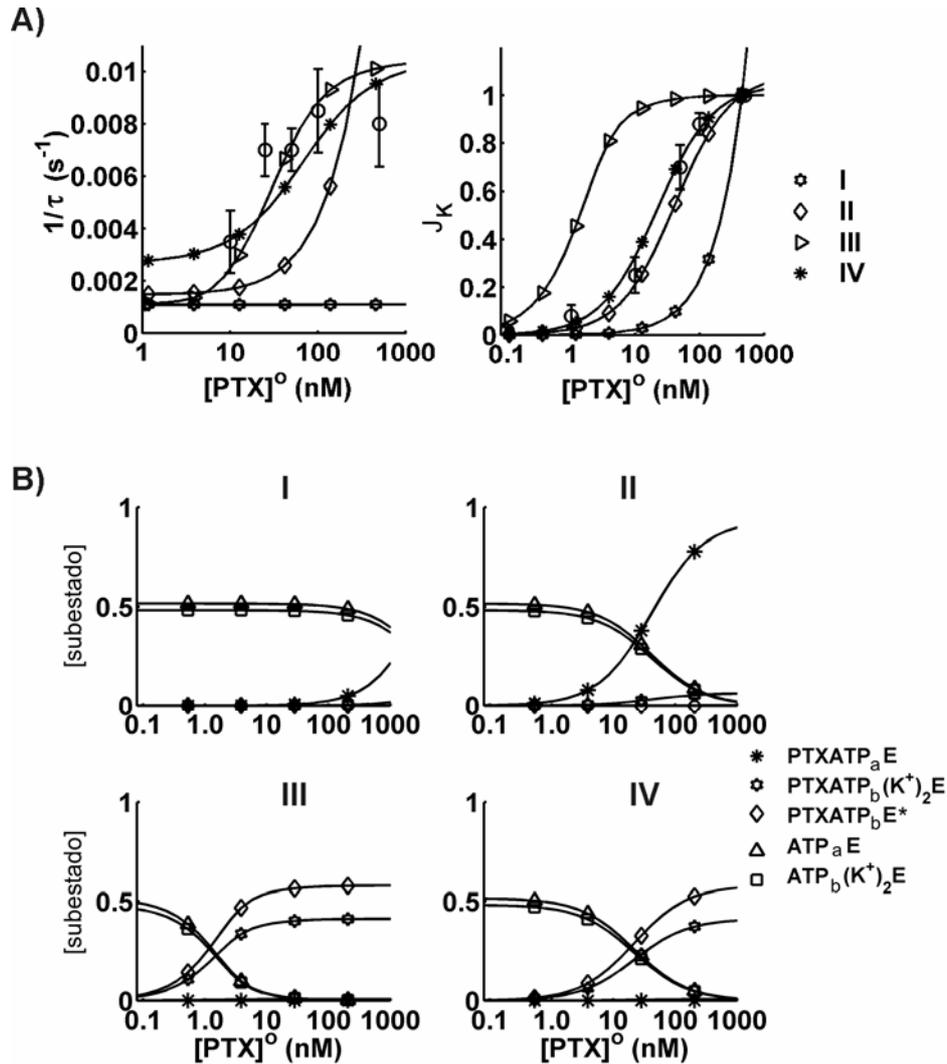


Figura VI.2 -Taxa de ativação e valor de regime permanente da corrente induzida pela PTX. (A) Comparação entre dados experimentais (círculos; Artigas e Gadsby, 2004) e simulações (I-IV). (B) Valores das concentrações dos subestados, durante o regime permanente, envolvidos na ativação da corrente.

A inclusão do bloqueio dos canais induzidos, representado pela transição entre os subestados PTXATP_aE e PTXATP_b(K⁺)₂E (reação p22), não mostrou efeito importante na simulação, a qual corresponde à simulação II (Figura VI.2). Nessa simulação, as constantes α_{p24} e α_{p22} foram ajustadas e, considerando o princípio da reversibilidade microscópica, β_{p24} e β_{p22} foram estimadas fazendo: $\beta_{p24} = \alpha_{p24}\beta_{p10}\beta_{p1}\alpha_5/\alpha_{p10}\alpha_{p1}\beta_5$ e $\beta_{p22} = \alpha_{p22}\beta_{p10}\alpha_{p6}\alpha_{p21}/\alpha_{p10}\alpha_{p7}\beta_{p21}$. O processo de ajuste não alterou os valores das constantes α_{p24} e β_{p24} estimados anteriormente ($\alpha_{p24} = 6,0 \times 10^1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $\beta_{p24} = 3,60 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). Isso ocorreu porque o valor da razão α_{p22}/β_{p22} foi igual a 13,5, fazendo com que PTXATP_aE fosse mais provável do que o subestado PTXATP_b(K⁺)₂E.

Apesar das simulações indicarem que o subestado $PTXATP_aE$ deve exercer uma função essencial para a indução de canais, é possível que esse não seja o subestado final responsável pela sustentação da corrente induzida. Portanto, devem existir outras transições a partir desse subestado, as quais não dependem diretamente da $[PTX]^o$ e que apresentam taxas máximas de transição aproximadamente iguais a $0,01 \text{ s}^{-1}$. Vários registros experimentais (ISHIDA *et al.*, 1983; GRELL *et al.*, 1988; ARTIGAS e GADSBY, 2003a, 2003b e 2004) indicam o íon K^+ como o principal inibidor fisiológico do efeito da PTX. ARTIGAS e GADSBY (2004) demonstraram que o K^+ extracelular bloqueia canais induzidos pela toxina. Portanto, é razoável considerar que o K^+ promove o bloqueio dos canais induzidos no subestado $PTXATP_aE$, causando a transição para o subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$ (reação p25 - $2K^{+,o} + PTXATP_aE \longleftrightarrow PTXATP_b(K^+)_2E$). A taxa correspondente dessa reação foi calculada por:

$$r_{p25} = \alpha_{p25} \frac{([K^+]^o)^2}{([K^+]^o + Kd_K)^2} [PTXATP_aE] + \beta_{p25} [PTXATP_b(K^+)_2E] \quad (6.12)$$

Como o subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$ representa canais induzidos fechados pela oclusão do K^+ , é necessário que ocorra uma transição desse subestado para outro em que o K^+ é liberado, permitindo a reabertura do canal. Essa transição é descrita pela reação p26: $PTXATP_b(K^+)_2E \longleftrightarrow PTXATP_bE^* + 2K^{+,i}$. A taxa dessa reação é dada por:

$$r_{p26} = \alpha_{p26} [PTXATP_b(K^+)_2E] - \beta_{p26} \frac{([K^+]^o)^2}{([K^+]^o + Kd_K)^2} [PTXATP_bE^*] \quad (6.13)$$

Baseado no Capítulo V, a inclusão do subestado $PTXATP_bE^*$ exige que sejam consideradas as seguintes reações: (i) reação p16 - $ATP^i + PTXE^* \longleftrightarrow PTXATP_bE^*$; (ii) reação p18 - $PTXE^* \longleftrightarrow PTXE$; (iii) reação p19 - $PTXATP_bE^* \longleftrightarrow PTX^o + ATP_bE2$; reação 11 - $ATP^i + E1 \longleftrightarrow ATP_bE2$. As equações das taxas dessas reações estão apresentadas na Tabela V.4 e os valores das respectivas constantes são: $\alpha_{p16} = 1,33 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\beta_{p16} = 4,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\alpha_{p18} = 3,42 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$,

$\beta_{p18} = 0 \text{ s}^{-1}$, $\alpha_{p19} = 1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $\beta_{p19} = 0 \text{ s}^{-1}$, $\alpha_{11} = 1,60 \times 10^{-1} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $\beta_{11} = 1,60 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$. As constantes β_{p18} e β_{p19} são nulas porque, no Capítulo V, as reações p18, p19 e p20 foram descritas apenas pelo sentido de ocorrência resultante da diferença entre as respectivas taxas do sentido direto e reverso.

A adição das reações p16, p18, p19, 11, p25 e p26 exige que sejam realizadas modificações de equações que descrevem as variações de concentração dos subestados (Equações 6.01, 6.05, 6.07 e 6.08) e inclusão de equações para os subestados $\text{PTXATP}_b\text{E}^*$, PTXE^* e $\text{ATP}_b\text{E}2$:

$$\frac{d[E1]}{dt} = -r_5 - r_3 - r_{p1} - r_{11} \quad (6.14)$$

$$\frac{d[PTXE]}{dt} = r_{p1} - r_{p6} + r_{p7} - r_{p10} + r_{p18} \quad (6.15)$$

$$\frac{d[PTXATP_aE]}{dt} = r_{p24} + r_{p10} + r_{p22} - r_{p25} \quad (6.16)$$

$$\frac{d[PTXATP_b(K^+)_2E]}{dt} = r_{p21} - r_{p22} + r_{p23} + r_{p25} - r_{p26} \quad (6.17)$$

$$\frac{d[PTXATP_bE^*]}{dt} = r_{p26} + r_{p16} - r_{p19} \quad (6.18)$$

$$\frac{d[PTXE^*]}{dt} = -r_{p16} - r_{p18} \quad (6.19)$$

$$\frac{d[ATP_bE2]}{dt} = r_{p11} + r_{p19} \quad (6.20)$$

Considerando que os subestados $\text{PTXATP}_b\text{E}^*$ e PTXE^* representam canais induzidos pela PTX, a permeabilidade do K^+ (Equação 6.09) passa a ser dada por:

$$P_K = \gamma_K \cdot (P_{o1}[PTXE] + P_{o2}[PTXATP_aE] + P_{o4}[PTXE^*] + P_{o6}[PTXATP_bE^*]) \quad (6.21)$$

onde $P_{o4} = 0,24$ e $P_{o6} = 0,90$ (Capítulo V).

Com essas modificações do modelo, o número de graus de liberdade, que antes era dois (somente α_{p22} e α_{p24} foram ajustadas), agora, aumentou para seis. A princípio, nessa simulação, seria necessário ajustar as constantes α_{p22} , α_{p24} , α_{p25} , β_{p25} , α_{p26} e β_{p26} . Com o objetivo de reduzir o número de graus de liberdade, as seguintes considerações foram feitas:

- (i) A reação p24 não deve ser a determinante da taxa de ativação final da corrente induzida pela PTX. Caso contrário, a taxa de ativação da corrente dependeria linearmente da $[PTX]^0$, contrariando as observações experimentais. Quando $[PTX]^0 = 10 \text{ nM}$, a taxa de ativação da corrente induzida é aproximadamente igual a $5,00 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Portanto, α_{p24} deve ser maior ou igual a $5,00 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Na simulação, α_{p24} foi considerada igual a $5,00 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e, seguindo o princípio da reversibilidade microscópica, β_{p24} foi calculada igual a $3,00 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$;
- (ii) Supondo que a reação p25 também não seja a determinante da taxa de ativação da corrente induzida, a oclusão do K^+ deve apresentar taxa maior ou igual a $5,00 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Na simulação, α_{p25} foi feita igual a $1,00 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$. A constante β_{p25} foi considerada nula, admitindo que o efeito resultante da reação p25 possa ser representado apenas pelo sentido direto, analogamente às reações p18 e p19.

As constantes α_{p22} (0,00), β_{p22} (0,00), α_{p26} ($6,16 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), β_{p26} ($4,92 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) foram estimadas para o melhor ajuste da simulação III (Figura VI.2A). Foi possível reproduzir os comportamentos da taxa de ativação e do valor de regime permanente da corrente induzida em função da $[PTX]^0$. Contudo, a afinidade aparente da PTX ($K_{0,5PTX} = 3 \text{ nM}$) foi superior à observada experimentalmente ($K_{0,5PTX} \approx 22 \pm 2 \text{ nM}$; ARTIGAS e GADSBY, 2004). Na simulação, a afinidade aparente da PTX depende da concentração do subestado $PTXATP_bE^*$ (Figura VI.2B – III), o qual é responsável pela sustentação da corrente induzida. Então, com o objetivo de reproduzir melhor a afinidade da toxina, a simulação foi repetida incluindo a reação p23 (Figura VI.2A, simulação IV). Essa inclusão é justificada por uma possível redução da $[PTXATP_b(K^+)_2E]$ que indiretamente pode alterar o comportamento da $[PTXATP_bE^*]$. Com a inclusão da reação p23, α_{p22} , β_{p23} , α_{p26} e β_{p26} foram ajustadas simultaneamente durante a simulação. Para o melhor ajuste (Figura VI.2A, simulação IV), α_{p22} , β_{p22} , α_{p26} e β_{p26} apresentaram os mesmos valores ajustados na simulação III, β_{p23} foi igual a $1,31 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ e α_{p23} foi calculada considerando o princípio da reversibilidade microscópica ($\alpha_{p23} = \beta_{p23}\beta_{14}\beta_{p9}\alpha_{p21}/\alpha_{14}\alpha_{p9}\beta_{p21} = 1,35 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$). As concentrações dos subestados durante a simulação (Figura VI.2B-IV) indicam que o complexo PTX-bomba ocupa principalmente os subestados $PTXATP_bE^*$ e $PTXATP_b(K^+)_2E$ no regime permanente.

Uma vez que os parâmetros foram ajustados (valores apresentados na Tabela VI.3), o modelo foi utilizado para simular a manobra experimental de ARTIGAS e GADSBY (2004) em que a corrente induzida pela PTX é ativada quando a membrana é perfundida com solução extracelular contendo K^+ e intracelular contendo K^+ e ATP. (Figura VI.3A). A simulação reproduz a manobra experimental mantendo o potencial transmembranar em -20 mV e as concentrações dos ligantes da bomba com os seguintes valores: $[K^+]^o = 160$ mM, $[K^+]^i = 150$ mM, $[ATP]^i = 5$ mM e $[PTX]^o = 0$ nM. Após o sistema ter atingido o regime permanente, a $[PTX]^o$ foi alterada como indicado na parte superior da Figura VI.3A. Em relação às concentrações dos subestados (Figura VI.3B), $[ATP_aE1]+[ATP_b(K^+)_2E2]$ foi aproximadamente igual a 1,00 antes da aplicação da toxina. Seguindo o aumento da $[PTX]^o$, $[PTXATP_b(K^+)_2E]$ e $[PTXATP_bE^*]$ aumentaram e $[ATP_aE1]$ e $[ATP_b(K^+)_2E2]$ reduziram.

Tabela V.3 – Constantes do modelo para o complexo PTX-bomba de Na/K.

Reação	Valores das constantes	
	α_j	β_j
p1	$1,00 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$5,98 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
p6	$1,06 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$	0,00
p7	$5,20 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	0,00
p9	$2,15 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$6,67 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
p10	$1,50 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,64 \text{ s}^{-1}$
p16	$1,33 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$4,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
p18	$3,42 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	0,00
p19	$1,50 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	0,00
p21	$1,33 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$4,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
p22	0,00	0,00
p23	$1,35 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$1,31 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
p24	$5,00 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$3,00 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
p25	$1,00 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$	0,00
p26	$6,16 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$4,92 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Para as reações envolvendo a PTX (Figura VI.3C), pode ser observado um aumento rápido das taxas das reações p24, promovendo a ligação da PTX a enzimas no subestado ATP_aE1 , e p25, causando a oclusão de K^+ e resultando no subestado

PTXATP_b(K⁺)₂E. A reação p26, que causa transição de PTXATP_b(K⁺)₂E para o subestado PTXATP_bE* (representando a reabertura de canais temporariamente bloqueados pela oclusão do K⁺), apresenta a menor taxa durante a aplicação da PTX. Após a ativação da corrente, durante o período em que [PTX]^o = 0 nM, a reação p26 ocorre apenas no sentido reverso causando a oclusão de K⁺ e a consequente transição para o subestado PTXATP_b(K⁺)E (trecho tracejado da curva). A reação p21, sempre ocorrendo no sentido reverso, causa a dissociação do ATP a partir do subestado PTXATP_b(K⁺)₂E e leva a formação do subestado PTX(K⁺)₂E. A partir desse subestado, a atividade da reação p7 promove a liberação do K⁺, resultando no subestado PTXE. A ligação de ATP a enzimas nesse subestado (reação p10) leva novamente à formação do subestado PTXATP_aE. Portanto, as reações p21, p7 e p10, nessa ordem, reduzem a [PTXATP_b(K⁺)₂E] e aumentam a [PTXATP_aE]. A reação p23 também apresenta uma contribuição significativa durante toda a simulação causando a dissociação da PTX a partir do subestado PTXATP_b(K⁺)₂E. As reações p1, p6, p9, p16, p18 e p19 não apresentaram atividades importantes durante a simulação ($< 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

A simulação apresentada na Figura VI.3 foi a escolhida para a análise de sensibilidade dos parâmetros do modelo. Essa simulação foi escolhida porque traduz a mesma informação que a simulação da Figura VI.2, permitindo testar a sensibilidade de cada parâmetro para os diferentes valores da [PTX]^o, e exige menos esforço computacional. Para cada constante das reações envolvendo a PTX, na Figura VI.4, são apresentados os valores P obtidos a partir da aplicação teste de Kolmogorov-Smirnov e o coeficiente de correlação entre as distribuições acumuladas de simulações aceitáveis e não-aceitáveis, considerando diferentes critérios. Quando o valor P é menor que o nível de significância ($\alpha = 0.05$) e o coeficiente de correlação é reduzido, o parâmetro é considerado sensível. Caso contrário, é não sensível. Como pode ser observado, quando o critério igual a media dos valores de todas as funções objetivas, todas as constantes são não sensíveis. Porém, quando o valor do critério é reduzido, as constantes β_{p23} , α_{p24} , α_{p26} e β_{p26} são identificadas como sensíveis e podem ser consideradas as mais importantes. Todas as outras constantes são classificadas como insensíveis.

Deve ser observado que o GSA é capaz de detectar quando a variação do valor do parâmetro corresponde a variações no processo analisado. Contudo, não detecta a essencialidade de um parâmetro. Isso significa que se uma reação é um passo essencial no processo permitindo o sistema atingir outro estado, mas na faixa de valores analisada

ela não corresponde a alterações significativas das simulações, então a reação não é detectada como sensível. Esse é o caso da reação p25. Pois, essa reação é particularmente essencial e, portanto, não pode ser desconsiderada nas simulações das Figuras VI.2 e VI.3, diferentemente das outras reações classificadas como não-sensíveis.

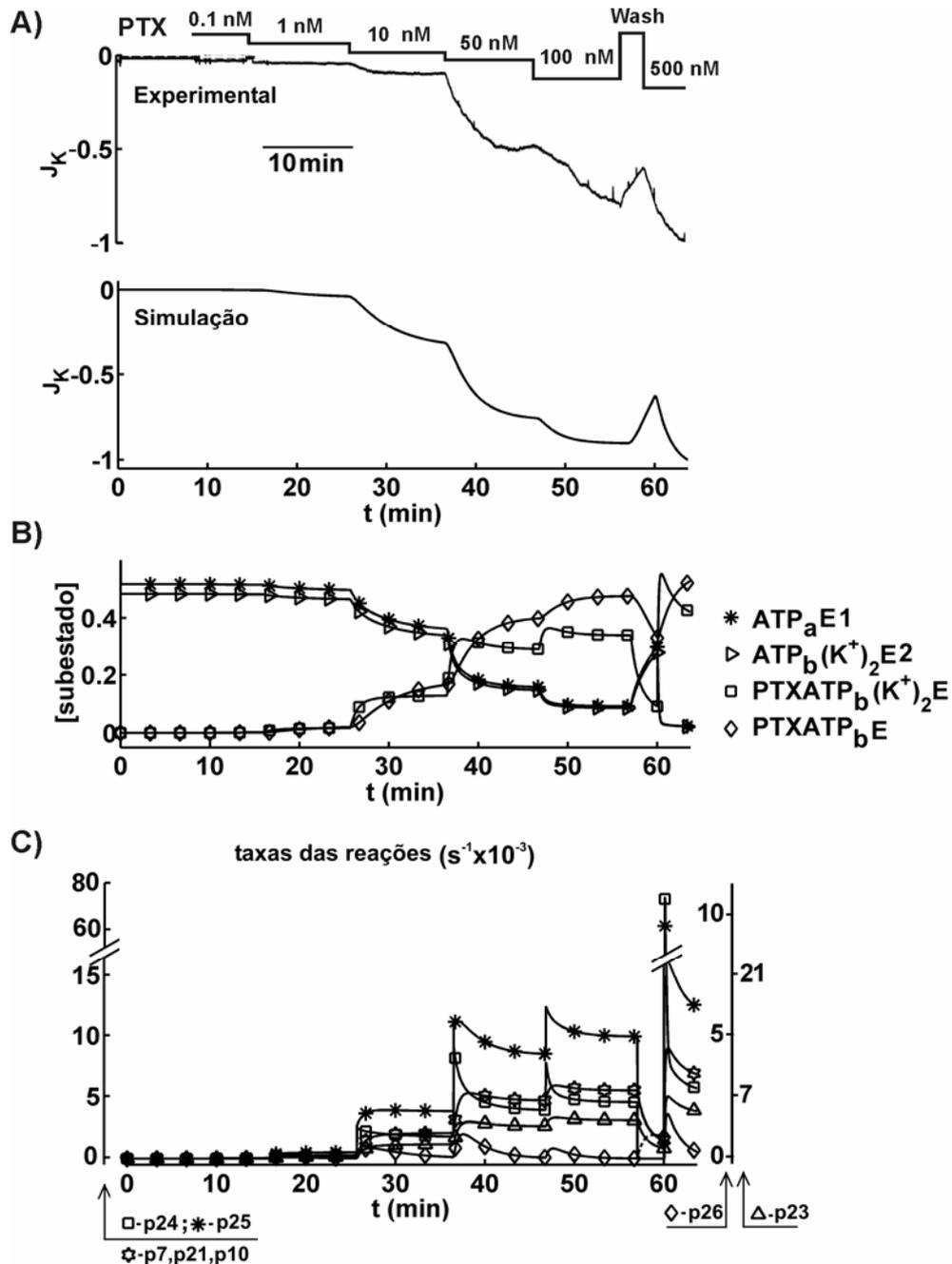


Figura VI.3 - Ativação da corrente induzida em função do aumento da $[PTX]^o$. (A) Comparação entre o registro experimental (Artigas e Gadsby, 2004) e a simulação. (B) Comportamento das concentrações dos subestados. Os demais subestados

apresentaram concentrações menores que 0,01 para as quatro simulações. (C) Taxas das reações envolvendo a PTX.

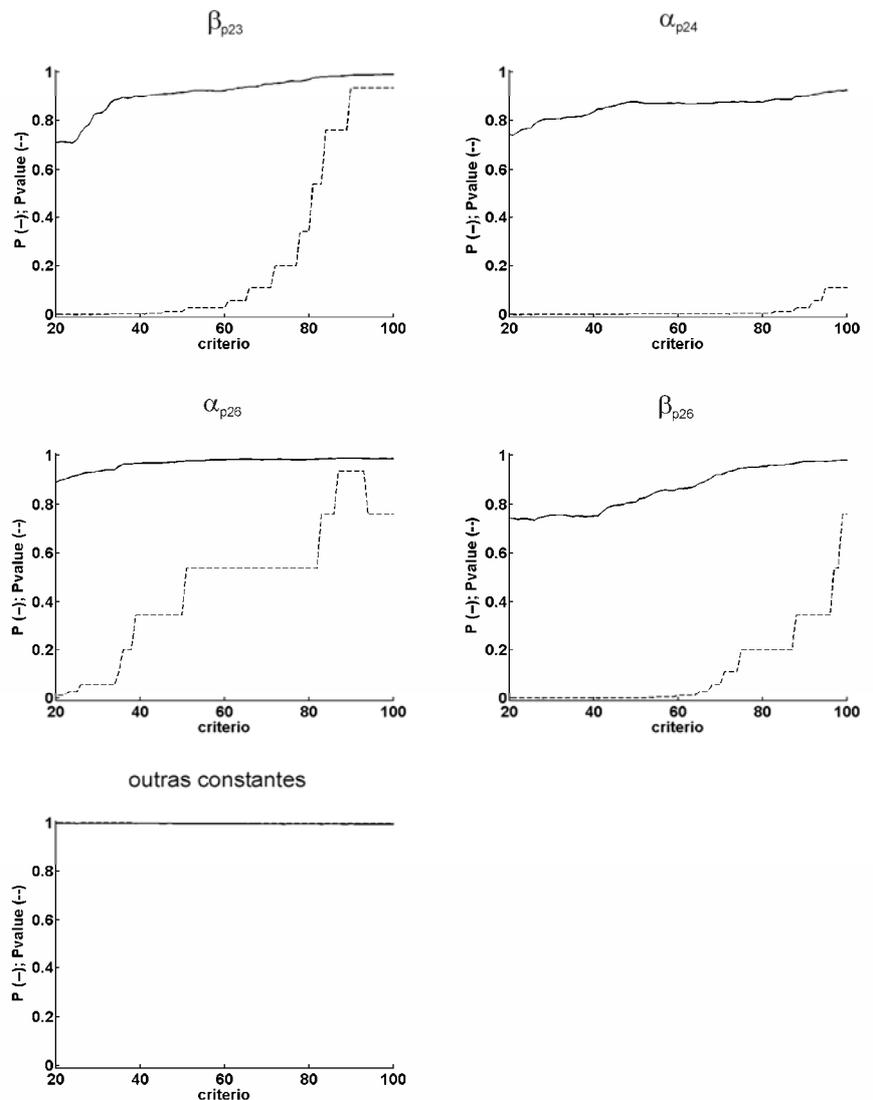


Figura VI.4 - Análise de sensibilidade dos parâmetros. Os Pvalues (curva tracejada) foram obtidos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O coeficiente de correlação (curva contínua) baseou-se na análise das distribuições acumuladas de simulações aceitáveis e não-aceitáveis, considerando diferentes critérios (eixo x – valores percentuais da média dos valores de todas as funções objetivas). A constante é considerada sensível quando o valor P é menor que 0,05 e o coeficiente de correlação é reduzido.

VI.3 - Discussão

O principal objetivo deste capítulo foi propor um modelo de reações para investigar os mecanismos envolvidos nas interações do K^+ com o complexo PTX-bomba de Na/K. No modelo, as reações envolvendo a PTX foram baseadas no modelo de Albers-Post (Figura VI.1). As atividades dessas reações promovendo a ativação da corrente induzida pela PTX foram testadas verificando a habilidade do modelo de simular os dados experimentais de ARTIGAS e GADSBY (2004) e reações adicionais foram propostas investigando mecanismos que ainda não estavam claros ou não foram identificados experimentalmente (Figura VI.2). Posteriormente, os parâmetros estimados foram validados simulando outra manobra experimental (Figura VI.3) e a sensibilidade dos parâmetros das reações foi analisada (Figura VI.4). Para as concentrações de ATP e K^+ consideradas, as simulações sugerem: (i) o subestado em que o ATP permanece ligado ao sítio de alta afinidade é o principal subestado da enzima ao qual a PTX se liga; (ii) a taxa de ativação da corrente induzida é limitada pela desocclusão de K^+ a partir do complexo PTX-bomba de Na/K; (iii) a oclusão de K^+ em canais induzidos pela PTX com ATP ligado ao sítio de baixa afinidade é o principal mecanismo responsável pela redução da afinidade da toxina.

Na simulação I (Figura VI.2), como $[(K^+)_2E2] \approx [E1] \approx 0$, a ligação da PTX aos subestados E1 e $(K^+)_2E2$ (descrita, respectivamente, pelas reações p1 e p9) não é suficiente para reproduzir os comportamentos da taxa de ativação e do valor de regime permanente da corrente induzida pela PTX. Portanto, foi necessária a adição da reação p24 (simulações II, III e IV), representando a ligação da toxina ao subestado ATP_aE1 . Posteriormente, também foi preciso incluir a reação p23 (simulação IV), prevendo que a PTX pode se ligar também a enzimas no subestado $ATP_b(K^+)_2E2$. Na análise de sensibilidade de parâmetros (Figura VI.4), dentre os parâmetros α_{p1} , α_{p9} , α_{p23} e α_{p24} , apenas α_{p24} foi classificada como sensível. Portanto, em relação às reações que descrevem a ligação da PTX à bomba, o sentido direto da reação p24 é o mais importante para a simulação da corrente induzida. Isso indica que variações da $[ATP_aE1]$ causam maiores alterações do comportamento da ativação da corrente induzida pela PTX do que variações das concentrações dos subestados E1, $(K^+)_2E2$ e $ATP_b(K^+)_2E2$.

As simulações sugerem que a toxina é capaz de reagir com diferentes subestados conformacionais da bomba, dando suporte às hipóteses de HABERMANN (1989) e ARTIGAS e GADSBY (2004). Contudo, como observado por ARTIGAS e GADSBY

(2003a, 2003b e 2004) e ARMEL e APELL (2006), as simulações indicam que a afinidade da bomba à PTX é alterada pela presença do K^+ . Comparando as reações p1 e p9, é possível observar que a afinidade da enzima à PTX ($K_{d_{PTX,p1}} = \beta_{p1}/\alpha_{p1} \approx 0,6$ nM e $K_{d_{PTX,p9}} = \alpha_{p9}/\beta_{p9} \approx 30$ nM) reduz aproximadamente 50 vezes. Similarmente, para as reações p23 e p24 ($K_{d_{PTX,p23}} = \beta_{p23}/\alpha_{p23} \approx 1,00 \times 10^1$ nM e $K_{d_{PTX,p24}} = \beta_{p24}/\alpha_{p24} \approx 0,07$ nM), novamente o K^+ reduz a afinidade, nesse caso de aproximadamente 100 vezes. Analisando os parâmetros relacionados com a dissociação da PTX (β_{p1} , β_{p9} , β_{p23} e β_{p24}), a constante β_{p23} (reação p23), associada com a taxa de dissociação a partir do subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$, foi a única classificada como sensível (Figura VI.4), indicando que esse é o principal caminho pelo qual a toxina se desliga da bomba. Todas essas observações a partir das simulações computacionais reforçam a suspeita de que o íon K^+ reduz a afinidade da bomba de Na/K a PTX desestabilizando a ligação da toxina e, conseqüentemente, aumentando principalmente a sua taxa de dissociação (ARTIGAS e GADSBY, 2004; HARMEL e APELL, 2006).

Resultados experimentais (TOSTESON *et al.*, 2003; ARTIGAS e GADSBY, 2003a, 2003b e 2004; HARMEL e APELL, 2006) permitem levantar a hipótese de que reações relacionadas com o ciclo do bombeamento iônico podem persistir mesmo quando a PTX permanece ligada à bomba. Esse é o caso das reações p6, p7, p10 e p21. As simulações não somente suportam essa hipótese mas também sugerem que a reação p22, que é análoga à reação 4 do ciclo de bombeamento, não deve ocorrer enquanto a PTX estiver ligada. Nas simulações III e IV (Figura VI.2), α_{p22} e β_{p22} foram obtidas nulas. Isso indica que a liberação do K^+ a partir do subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$, formando o subestado $PTXATP_aE$, é improvável.

Para reproduzir a taxa de ativação e a corrente de regime permanente (Figura VI.2, simulações III e IV), foi necessário incluir as reações p25 e p26. A partir das atividades dessas reações durante as simulações, é possível inferir que a oclusão do K^+ e a sua posterior liberação resultam no subestado $PTXATP_bE^*$. Portanto, as simulações sugerem que os canais induzidos com ATP ligado aos sítios de baixa afinidade como sendo os mais prováveis para sustentar a corrente induzida pela PTX. Apesar da reação p26 apresentar a menor taxa (Figura VI.3), dentre as reações que contribuem para a ativação da corrente, as suas constantes são sensíveis e, portanto, importantes para simulação. Portanto, a simulação sugere a reação p26 como determinante da baixa taxa

de ativação da corrente induzida na presença de K^+ , observada experimentalmente por ARTIGAS e GADSBY (2004).

Analisando os parâmetros das reações que descrevem a oclusão de K^+ no complexo PTX-bomba (reações p6, p25 e p26), somente a constante β_{p10} foi classificada como sensível (Figura VI.4). Assim, sob as condições simuladas, a oclusão de K^+ em subestados $PTXATP_bE^*$ (sentido reverso da reação p26), por bloquear canais responsáveis pela sustentação da corrente induzida, pode ser considerada a principal reação responsável pelo efeito inibitório do K^+ sobre atuação da PTX sobre a bomba.

No caso da reação p6, a contribuição dessa reação para as interações entre K^+ e o complexo PTX-bomba é mais marcante quando a concentração intracelular de ATP é nula. Pois, nesse caso, os canais induzidos são representados basicamente pelo subestado PTXE, o qual é afetado diretamente pela atividade da reação p6 (Capítulo IV). A reação p25, por outro lado, além de contribuir para o bloqueio de canais induzidos nas simulações apresentadas, deve ter uma atuação preponderante quando os canais induzidos podem ser fosforilados. Como a fosforilação da enzima favorece o efeito tóxico (ARTIGAS e GADSBY, 2004), a oclusão do K^+ , de acordo com as simulações levando à formação dos subestados $PTXATP_b(K^+)_2E$, deve reduzir a toxicidade da PTX. A ocupação do sítio de baixa afinidade pelo ATP impossibilita a fosforilação da enzima. Portanto, supondo uma alta afinidade do complexo PTX-bomba para oclusão do K^+ em comparação com a oclusão do Na^+ , esse mecanismo justificaria os valores reduzidos da taxa de ativação da corrente na presença do K^+ mesmo quando a PTX era aplicada durante a perfusão da membrana com solução intracelular contendo ATP e Na^+ (ARTIGAS e GADSBY, 2004).

Nos últimos anos, as interações da PTX com a bomba de Na/K têm ganhado grande atenção. Tem sido proposto que a PTX é uma ferramenta útil para investigar os estados conformacionais que a bomba de Na/K pode assumir. Nesse sentido, o estudo dos mecanismos cinéticos envolvidos nas interações entre a PTX e a bomba de Na/K contribuirá para a elucidação dos diferentes passos da bomba durante o seu funcionamento transportando Na^+ e K^+ através da membrana. Nesse capítulo, foi proposto um modelo de reações (Figura VI.5A) com o qual foi possível simular dados experimentais sobre a interferência de ATP e K^+ sobre a corrente induzida pela PTX através da bomba de Na/K. Para os casos simulados, em que as concentrações de ATP e o K^+ são mantidas constantes, a análise da sensibilidade do modelo aos parâmetros permite deduzir quais reações são realmente essenciais para reproduzir o

comportamento da corrente induzida pela PTX e, assim, é possível propor um modelo resumido para estudar o efeito da toxina nessa situação (Figura VI.5B).

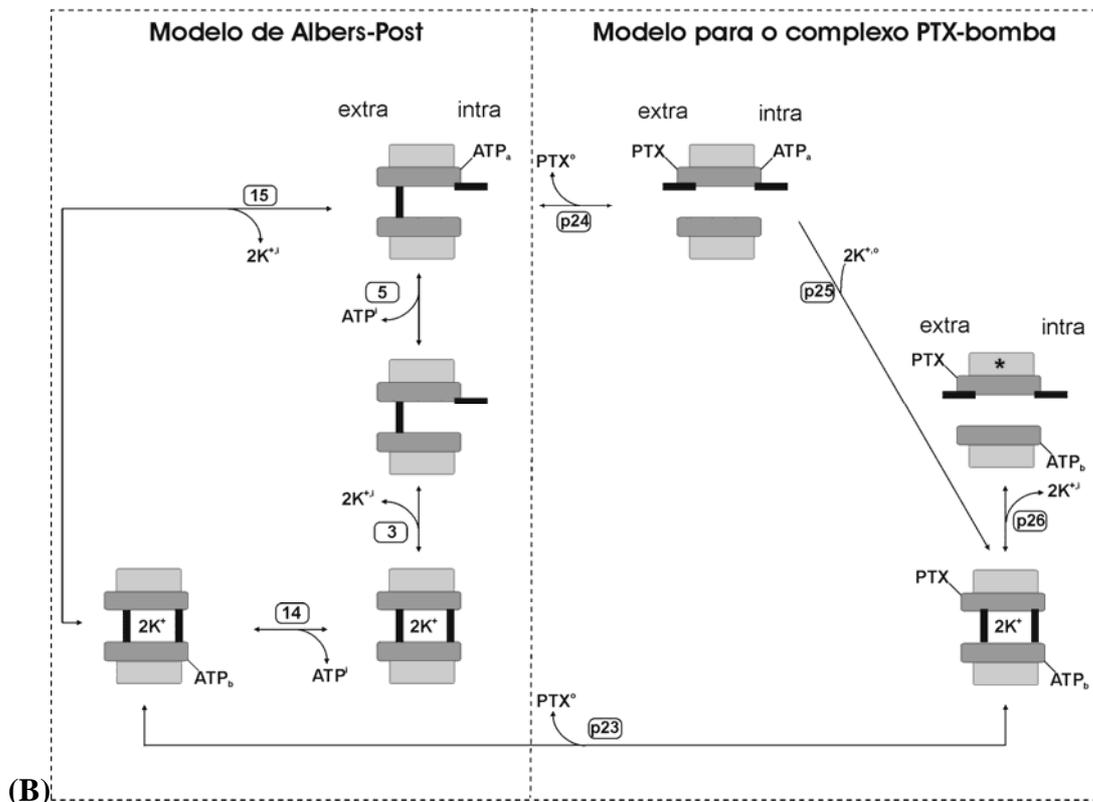
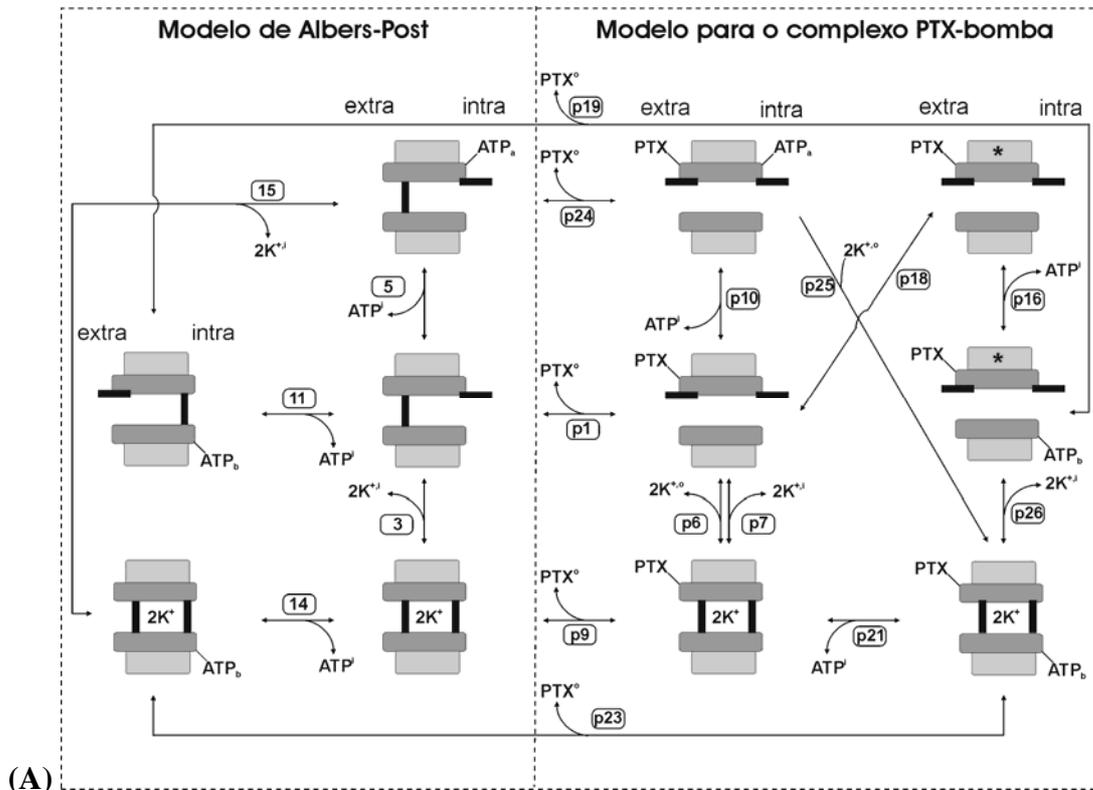


Figura VI.5 – Modelo de reações para as interações da PTX com a enzima Na/K-ATPase quando ATP e K^+ estão presentes. (A) Modelo completo. (B) Reações sensíveis e/ou essenciais para reproduzir a ativação da corrente induzida.

Capítulo VII – Efeitos simultâneos de K^+ e da fosforilação sobre os canais induzidos pela PTX

O modelo para explicar a atuação da PTX sobre a bomba de Na/K foi desenvolvido, nos capítulos anteriores, em três etapas. Na primeira (Capítulo IV), foram propostas reações para explicar as interações do complexo PTX-bomba com os íons Na^+ e K^+ , na ausência de ATP. Nessa situação não ocorre a fosforilação e, portanto, as reações dos íons Na^+ e K^+ com enzimas livres ou apenas ligadas a PTX são favorecidas. De forma diferente, na segunda etapa (Capítulo V), foi considerada a presença de ATP intracelular. Nesse capítulo, o íon K^+ não foi considerado e o modelo de reações proposto descreve a fosforilação e a desfosforilação do complexo PTX-bomba na presença do Na^+ . Na terceira etapa (Capítulo VI), o modelo de reações descreve o comportamento do complexo PTX-bomba de Na/K na situação em que a membrana é perfundida com soluções contendo K^+ e ATP e livres de Na^+ . No presente capítulo, o objetivo foi reunir todas as reações propostas nos capítulos anteriores em um único modelo para estudar a dinâmica do complexo PTX-bomba quando a membrana é perfundida com soluções contendo Na^+ , K^+ e ATP, simultaneamente. Portanto, foram estudados os efeitos simultâneos do K^+ e da fosforilação sobre o complexo PTX bomba de Na/K. Como foi discutido previamente, o íon K^+ é o principal inibidor do efeito da toxina e, por outro lado, a fosforilação favorece o seu efeito tóxico.

VII.1 - Métodos

Seguindo a metodologia empregada nos capítulos anteriores, o modelo de reações pode ser dividido em duas partes: uma consiste nas reações do modelo de Albers-Post e a outra compreende as reações propostas para explicar o efeito da PTX sobre a bomba. Como neste capítulo o número de parâmetros estudados em uma única simulação é elevado, o método de análise de sensibilidade do modelo aos parâmetros, descrito no Capítulo VI, também foi utilizado.

VII.1.1 – Modelo de reações de Albers-Post

A corrente induzida pela PTX foi estudada em situações em que os meios intra e extracelulares podem conter Na^+ ou K^+ . Além disso, em todos os casos o meio intracelular contém ATP. Portanto, todas as reações do modelo de Albers-Post descritas nos capítulos anteriores (Tabelas IV.1, V.1, V.5 e VI.1; reações 1-15) foram necessárias para descrever, no presente capítulo, as enzimas não-modificadas. Além dessas reações, foi necessário representar a desfosforilação da bomba facilitada pela oclusão do K^+ (Tabela VII.1): (i) reação 16 – oclusão de K^+ em enzimas no subestado PE2, que causa a transição para o subestado $(\text{K}^+)_2\text{E2}$; (ii) reação 17 – oclusão de K^+ em enzimas no subestado $\text{ATP}_b\text{PE2}$ que leva à formação do subestado $\text{ATP}_b(\text{K}^+)_2\text{E2}$.

Tabela VII.1 – Reações do modelo de Albers-Post para desfosforilação da bomba, acelerada pelo K^+ , e suas respectivas taxas. α_j e β_j são, respectivamente, as constantes das taxas do sentido direto e reverso da reação j e Kd_K é a constante de dissociação de K^+ .

Reação	Taxa da reação
16 $2\text{K}^{+,o} + \text{PE2} \longleftrightarrow (\text{K}^+)_2\text{E2} + \text{P}^i$	$r_{16} = \alpha_{16} \frac{([\text{K}]^o)^2}{([\text{K}]^o + Kd_K)^2} [\text{PE2}] - \beta_{16} [(\text{K}^+)_2\text{E2}] [\text{P}^i]$
17 $2\text{K}^{+,o} + \text{ATP}_b\text{PE2} \longleftrightarrow (\text{K}^+)_2\text{E2} + \text{P}^i$	$r_{17} = \alpha_{17} \frac{([\text{K}]^o)^2}{([\text{K}]^o + Kd_K)^2} [\text{ATP}_b\text{PE2}] - \beta_{16} [\text{ATP}_b(\text{K}^+)_2\text{E2}] [\text{P}^i]$

VII.1.2 – Modelo de reações para o complexo PTX-bomba

Neste capítulo, foram consideradas todas as reações propostas anteriormente (Figuras IV.5, V.5 e VI.5; reações p1-p26). Dentre essas reações, somente a reação p11 sofreu uma modificação para explicitar o efeito do Na^+ intracelular sobre a fosforilação dos canais induzidos: $3 \cdot \text{Na}^{+,i} + \text{PTXATP}_a\text{E} \longleftrightarrow \text{PTXPE} + 3\text{Na}^{+,o} + \text{ADP}^i + \text{P}^i$. Logo, a taxa dessa reação passou a ser dada por:

$$r_{p31} = \alpha_{p31} \frac{([\text{Na}^+]^i)^3}{([\text{Na}^+]^i + Kd_{\text{Na}})^3} [\text{PTXATP}_a\text{E}] - \beta_{p31} [\text{PTXPE}] [\text{ADP}^i] [\text{P}^i] \frac{([\text{Na}^+]^o)^3}{([\text{Na}^+]^o + Kd_{\text{Na}})^3} \quad (7.01)$$

Além dessas reações, neste capítulo foram incorporadas novas reações que descrevem mecanismos de bloqueio e fosforilação de canais induzidos (Tabela VII.2). A reação p27 representa a oclusão de K^+ em canais induzidos no subestado PTXE* resultando na formação do subestado $PTX(K^+)_2E$. No caso da reação p28, além da oclusão do K^+ em canais do tipo PTXPE formar o subestado $PTX(K^+)_2E$, ocorre a liberação de P. A inclusão dessas duas reações é justificada pelo fato de que o íon K^+ aumenta a taxa de decaimento da corrente induzida mesmo quando a $[ATP]^i$ é igual a $1 \mu M$ (ARTIGAS e GADSBY, 2003b). Nessa condição, como indicam as simulações do capítulo V, a corrente induzida pela PTX é sustentada principalmente por canais induzidos nos subestados PTXPE e PTXE*.

Tabela VII.2 – Reações propostas para o complexo PTX-bomba de Na/K e suas respectivas taxas. α_j e β_j são, respectivamente, as constantes das taxas do sentido direto e reverso da reação j e Kd_K é a constante de dissociação de K^+ .

Reações		Taxas das reações
p27	$2 \cdot K^{+,o} + PTXE^* \longleftrightarrow PTX(K^+)_2E$	$r_{p27} = \alpha_{p27} \frac{([K^+]^o)^2}{([K^+]^o + Kd_K)^2} [PTXE^*] - \beta_{p27} [PTX(K^+)_2E]$
p28	$2 \cdot K^{+,o} + PTXPE \longleftrightarrow PTX(K^+)_2E + P^i$	$r_{p28} = \alpha_{p28} \frac{([K^+]^o)^2}{([K^+]^o + Kd_K)^2} [PTXPE] - \beta_{p28} [PTX(K^+)_2E] [P]^i$
p29	$2 \cdot K^{+,o} + PTXATP_bE^* \longleftrightarrow PTXATP_b(K^+)_2E$	$r_{p29} = \alpha_{p29} \frac{([K^+]^o)^2}{([K^+]^o + Kd_K)^2} [PTXATP_bE^*] - \beta_{p29} [PTXATP_b(K^+)_2E]$
p30	$2 \cdot K^{+,o} + PTXATP_bPE \longleftrightarrow PTXATP_b(K^+)_2E + P^i$	$r_{p30} = \alpha_{p30} \frac{([K^+]^o)^2}{([K^+]^o + Kd_K)^2} [PTXATP_bPE] - \beta_{p30} [PTXATP_b(K^+)_2E] [P]^i$
p31	$3 \cdot Na^{+,o} + PTXATP_aE \longleftrightarrow PTXPE + ADP^i + P^i + 3Na^{+,o}$	$r_{p31} = \alpha_{p31} \frac{([Na^+]^o)^3}{([Na^+]^o + Kd_{Na})^3} [PTXATP_aE] - \beta_{p31} [PTXPE] [ADP]^i [P]^i$

ARTIGAS e GADSBY (2003b) mostraram que o K^+ extracelular também acelera o decaimento da corrente quando a $[ATP]^i$ é igual a 5 mM . Segundo as simulações do capítulo V, nessa condição, a corrente induzida pela PTX é sustentada principalmente pelos canais induzidos nos subestados $PTXATP_bE^*$ e $PTXATP_bPE$. Portanto, foi necessário incorporar uma reação que descrevesse a oclusão de K^+ em

enzimas ocupando esses dois subestados (reações p29 e p30, respectivamente). As duas reações formam o subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$, porém, no caso da reação p30 ocorre também a liberação do P.

ARTIGAS e GADSBY (2004) observaram que a taxa de ativação da corrente induzida depende linearmente da $[PTX]^o$ quando a solução de perfusão extracelular contém apenas Na^+ , dentre os ligantes da bomba, e a intracelular, ATP e K^+ ou Na^+ . Por outro lado, quando o íon K^+ está incluído na solução extracelular, os autores observaram que a taxa de ativação da corrente permanece reduzida mesmo para valores elevados da $[PTX]^o$. Esses resultados sugeriram que o íon Na^+ pode causar a fosforilação de canais induzidos mesmo a partir da face extracelular, justificando a inclusão da reação p31.

VII.1.3 – Modelo matemático

Considerando as taxas das reações 1-17 e p1-p31, as variações das concentrações dos subestados foram calculadas resolvendo as seguintes equações:

$$\frac{d[E1]}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 - r_4 - r_5 - r_{11} + r_{13} - r_{p1} \quad (7.02)$$

$$\frac{d[E2]}{dt} = -r_1 + r_7 - r_{10} - r_{p2} \quad (7.03)$$

$$\frac{d[Na_3^+ E1]}{dt} = r_2 - r_{p3} \quad (7.04)$$

$$\frac{d[(Na^+)_2 E2]}{dt} = r_4 + r_{p8} \quad (7.05)$$

$$\frac{d[(K^+)_2 E2]}{dt} = r_3 - r_{14} + r_{16} + r_{p9} \quad (7.06)$$

$$\frac{d[ATP_a E1]}{dt} = r_5 - r_6 + r_{15} - r_{p24} \quad (7.07)$$

$$\frac{d[PE2]}{dt} = r_6 - r_7 + r_8 - r_{16} + r_{p14} \quad (7.08)$$

$$\frac{d[ATP_b PE2]}{dt} = r_8 - r_9 - r_{12} - r_{17} + r_{p15} \quad (7.09)$$

$$\frac{d[ATP_b E2]}{dt} = r_9 + r_{10} + r_{11} + r_{p19} \quad (7.10)$$

$$\frac{d[ATP_b PE1]}{dt} = r_{12} - r_{13} - r_{p20} \quad (7.11)$$

$$\frac{d[ATP_b(K^+)_2 E_2]}{dt} = r_{14} - r_{15} + r_{17} - r_{p23} \quad (7.12)$$

$$\frac{d[PTXE]}{dt} = r_{p1} + r_{p2} + r_{p3} - r_{p4} + r_{p5} - r_{p6} + r_{p7} - r_{p10} + r_{p18} \quad (7.13)$$

$$\frac{d[PTXE^*]}{dt} = r_{p12} - r_{p16} - r_{p18} - r_{p27} \quad (7.14)$$

$$\frac{d[PTX(K^+)_2 E]}{dt} = r_{p6} - r_{p7} - r_{p9} + r_{p27} + r_{p28} \quad (7.15)$$

$$\frac{d[PTX(Na^+)_2 E]}{dt} = r_{p4} - r_{p5} - r_{p8} \quad (7.16)$$

$$\frac{d[PTXATP_a E]}{dt} = r_{p10} - r_{p11} + r_{p24} - r_{p25} - r_{p31} \quad (7.17)$$

$$\frac{d[PTXATP_b E^*]}{dt} = r_{p16} + r_{p17} - r_{p19} + r_{p26} - r_{p29} \quad (7.18)$$

$$\frac{d[PTXPE]}{dt} = r_{p11} - r_{p12} - r_{p13} - r_{p14} + r_{p31} - r_{p28} \quad (7.19)$$

$$\frac{d[PTXATP_b PE]}{dt} = r_{p13} - r_{p15} - r_{p17} + r_{p20} - r_{p30} \quad (7.20)$$

$$\frac{d[PTXATP_b(K^+)_2 E]}{dt} = r_{p21} + r_{p23} + r_{p25} - r_{p26} + r_{p29} + r_{p30} \quad (7.21)$$

Considerando todos os subestados que representam canais induzidos abertos, as permeabilidades dos íons Na^+ e K^+ foram calculadas por:

$$P_{ion}^{PTX} = \gamma_{ion} \cdot (P_{o1}[PTXE] + P_{o2}[PTXATP_a E] + P_{o3}[PTXPE] + P_{o4}[PTXE^*] + P_{o5}[PTXATP_b PE] + P_{o6}[PTXATP_b E^*]) \quad (7.22)$$

onde P_{ion}^{PTX} é a permeabilidade do íon (Na^+ ou K^+), γ_{ion} é uma constante de proporcionalidade e P_{oj} ($j = 1, \dots, 6$) são coeficientes que traduzem a probabilidade de abertura dos canais nos subestados correspondentes.

A corrente induzida pela PTX foi calculada fazendo $J_{total}^{PTX}(t) = J_{Na} + J_K$, onde

$$J_{ion} = P_{ion}^{PTX} z_{ion}^2 \frac{F^2 V_m}{RT} \frac{[ion]^i e^{\frac{z_{ion} F V_m}{RT}} - [ion]^o}{e^{\frac{z_{ion} F V_m}{RT}} - 1}, \quad (7.23)$$

VII.1.4 – Métodos e parâmetros do modelo

Os procedimentos para solução das equações diferenciais, ajuste de parâmetros e simulação da corrente induzida pela PTX foram os mesmos empregados nos capítulos anteriores.

Na tabela VII.3, são apresentados os valores das constantes das reações do modelo de Albers-Post, que foram os mesmos valores usados nas simulações anteriores. Foram incluídos também os valores das constantes das reações 16 e 17. No caso da reação 16, as suas constantes foram extraídas do trabalho de HEYSE *et al.* (1994). Supondo que a ligação de ATP aos sítios de baixa afinidade não altera a afinidade da enzima fosforilada à oclusão de K^+ (CAMPOS e BEAUGÉ, 1994), as constantes α_{17} e β_{17} foram admitidas iguais, respectivamente, às constantes α_{16} e β_{16} .

Tabela VII.3 – Constantes das reações do modelo de Albers-Post.

Reação	Valores das constantes	
	α_j	β_j
1	$1,00 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$	$1,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
2	$2,00 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$8,00 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
3	$5,00 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$	$5,00 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
4	$1,00 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$	$5,00 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$
5	$1,50 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,64 \text{ s}^{-1}$
6	$1,99 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$	$1,00 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
7	$1,90 \text{ s}^{-1}$	$6,00 \times 10^1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
8	$1,60 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,60 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
9	$1,90 \text{ s}^{-1}$	$6,00 \times 10^1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
10	$1,60 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,60 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
11	$1,60 \times 10^{-1} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,60 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
12	$6,67 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	0,00
13	$1,35 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$	0,00
14	$5,00 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$5,00 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$
15	$2,20 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$	$2,41 \text{ s}^{-1}$
16	$1,00 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$	$5,00 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
17	$1,00 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$	$5,00 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Os valores das constantes das reações envolvendo a PTX, estimados nos capítulos anteriores, estão representados na tabela VII.4. No presente capítulo, foram estimadas somente as constantes das reações p27 – p31.

Tabela VII.4 – Constantes do modelo para o complexo PTX-bomba de Na/K.

Reação	Valores das constantes	
	α_j	β_j
p1	$1,00 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	$5,98 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
p2	$1,00 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	$5,98 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
p3	$1,00 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	0,00
p4	$2,12 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	0,00
p5	$1,70 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	0,00
p6	$1,06 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$	0,00
p7	$5,20 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	0,00
p8	$8,80 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	0,00
p9	$2,15 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$6,67 \times 10^2 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$
p10	$1,50 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1,64 \text{ s}^{-1}$
p11	$6,67 \text{ s}^{-1}$	0,00
p12	$1,45 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	0,00
p13	$1,33 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	$4,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
p14	$5,00 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$1,23 \times 10^2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$
p15	$7,33 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$1,20 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$
p16	$1,33 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	$4,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
p17	$1,45 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	0,00
p18	$3,42 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	0,00
p19	$1,50 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	0,00
p20	$2,16 \times 10^5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	$4,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
p21	$1,33 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	$4,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
p23	$1,35 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$	$1,31 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
p24	$5,00 \times 10^2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	$3,00 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
p25	$1,00 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$	0,00
p26	$6,16 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$4,92 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Para as demais constantes, foram considerados os mesmos valores utilizados nas simulações dos capítulos anteriores: (i) $\gamma_{Na} = 1,00$ e $\gamma_K = 1,15$ (Equação 7.22); (ii) $Kd_{Na} = 4$ mM e $Kd_K = 12$ mM; (iii) $P_{o1} = 0,15$, $P_{o2} = 0,24$; $P_{o3} = 0,24$, $P_{o4} = 0,24$, $P_{o5} = 0,90$ e $P_{o5} = 0,90$ (equação 7.22).

VII.2 - Resultados

VII.2.1 – Ativação da corrente induzida nas presenças de Na^+ extracelular e K^+ e ATP intracelular

ARTIGAS e GADSBY (2004) investigaram a ativação da corrente induzida pela PTX quando a membrana é perfundida com Na^+ extracelular e K^+ e ATP intracelular (Figura VII.1 – círculos). Nessas condições, a taxa de ativação depende linearmente da $[PTX]^o$ de forma semelhante ao caso em que as soluções de perfusão contém apenas Na^+ , extra- e intracelular, e ATP, intracelular (Figura V.4). A curva dose-resposta da corrente de regime permanente em função da $[PTX]^o$ indica uma afinidade aparente da toxina menor do que a observada na Figura V.4, porém maior do que quando as soluções de perfusão contém K^+ , intra- e extracelular, e ATP, intracelular (Figura VI.2).

Simulando esses dados experimentais, foram adotadas as seguintes condições iniciais: $[Na^+]^o = 160$ mM, $[K^+]^i = 150$ mM, $[ATP]^i = 5$ mM, $[PTX]^o = [K^+]^o = [Na^+]^i = [ADP]^i = [P]^i = 0$ mM e $V_m = -20$ mV. Após o sistema atingir o regime permanente sob essas condições, a $[PTX]^o$ foi alterada de 0 para valores no intervalo de 0,1 a 200 mM e a taxa de ativação e a corrente de regime permanente foram determinadas. Considerando somente as reações p1-p26, cujas constantes já foram estimadas, juntamente com a reação do ciclo de bombeamento do modelo de Albers-Post (reações 1-17) os valores da taxa de ativação e da corrente de regime permanente foram sempre inferiores aos valores experimentais. Isso é justificado pelo fato de que, sob as condições consideradas, as enzimas da bomba se encontram principalmente nos subestados ATP_aE1 ($[ATP_aE1] \approx 0,95$) e $ATP_b(K^+)_2E2$ ($[ATP_b(K^+)_2E2] \approx 0,05$). Pois, a aplicação da PTX causa a formação do subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$ por meio da reação p23 e, também, da ocorrência em cadeia das reações p24, p10 (sentido inverso), p6 e p21. Pode-se observar no capítulo VI que a transição do subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$

para $\text{PTXATP}_b\text{E}^*$, que representa a abertura de canais induzidos, é lenta (como indicam os valores reduzidos da constante da reação p26).

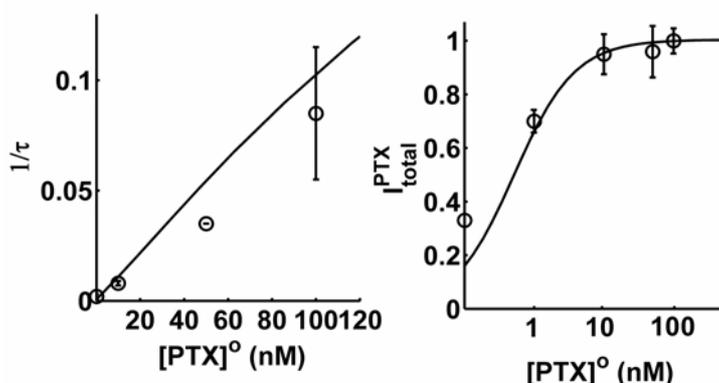


Figura VI.1 -Taxa de ativação e valor de regime permanente da corrente induzida pela PTX nas presenças de Na^+ extracelular e ATP e K^+ intracelulares. Comparação entre dados experimentais (círculos; Artigas e Gadsby, 2004) e simulação.

Para aumentar a afinidade aparente da PTX e, assim, reproduzir melhor o comportamento da corrente de regime permanente, foi necessário considerar uma reação de desocclusão do K^+ a partir do subestado $\text{PTXATP}_b(\text{K}^+)_2\text{E}$. Como para a reação p25 foi considerado apenas o sentido direto nas simulações do capítulo VI, a constante β_{p25} do sentido reverso (que causa a liberação do K^+) pode ser ajustada para a simulação deste capítulo. Considerando que os íons de Na^+ , mesmo na face extracelular, podem ter acesso aos seus respectivos sítios nos canais induzidos no subestado PTXATP_aE , a reação p31 deve ter uma contribuição importante para a indução da corrente, causando a fosforilação das enzimas. Isso indica também que a reação p24, por formar o subestado PTXATP_aE (a partir do qual pode ocorrer a fosforilação), deve ser necessária para reproduzir os dados experimentais. As constantes dessas reações (α_{p24} e β_{p24}) puderam ser reajustadas para $\alpha_{p24} \geq 500 \text{ s}^{-1}$ (capítulo VI).

A constante α_{p31} foi considerada igual a α_{p11} ($6,67 \text{ s}^{-1}$). Essa consideração é razoável porque a fosforilação da enzima depende apenas da presença de 3Na^+ e ATP em seus respectivos sítios, não importando se eles tenham originado do meio intra- ou extracelular. Ajustando simultaneamente as constantes α_{p24} ($1,00 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), β_{p24} ($\beta_{p24} = \alpha_{p24}\beta_{p10}\beta_{p1}\alpha_5/\alpha_{p10}\alpha_{p1}\beta_5 = 1,10 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) e β_{p25} ($1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$), foi possível reproduzir os comportamentos da taxa de ativação e do valor de regime permanente da corrente induzida (simulação II).

Para estudar a contribuição de cada reação e subestado, uma nova simulação foi realizada aumentando gradativamente a $[PTX]^0$ durante a ativação da corrente induzida (Figura VII.2A). Como pode ser observado, $[PTXATP_bE^*]$ e $[PTXATP_bPE]$ aumentam simultaneamente à redução de $[ATP_aE1]$ e $[ATP_b(K^+)_2E2]$ (Figura VII.2B).

Analisando as reações que apresentaram taxas superiores a $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (Figura VII.2C), conclui-se que a reação p24 é essencial para a ligação da PTX às enzimas. A reação p31 causa a fosforilação dos canais induzidos e, em seqüência, a reação p13 causa a ligação de ATP aos sítios de baixa afinidade formando o subestado $PTXATP_bPE$. Esse é um dos subestados responsáveis pela sustentação da corrente induzida, como mostrado na Figura VII.2B. A desfosforilação da enzima a partir desse subestado (reação p17) leva à formação do subestado $PTXATP_bE^*$, que é o principal subestado responsável pela sustentação da corrente induzida. A reação p26 causa a oclusão de K^+ que resulta no bloqueio de canais induzidos formando o subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$. A partir desse subestado, a desocclusão de K^+ por meio do sentido reverso da reação p25 permite a reabertura de canais induzidos, os quais podem ser fosforilados novamente. As reações p15 e p19 contribuem reduzindo a corrente induzida, causando a dissociação da PTX, e a reação p23 causa a ligação da PTX às enzimas, formando o subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$.

A simulação da Figura VII.2 foi a escolhida para a análise de sensibilidade dos parâmetros do modelo. Utilizando o mesmo método (GSA) descrito no Capítulo VI, foram analisadas todas as constantes das reações descritas na Figura VII.2. Como se pode observar, somente a constante α_{p24} , da taxa de ligação da PTX a enzimas no subestado ATP_aE1 , foi classificada como sensível (Figura VII.3). As demais constantes apresentaram P-values (obtidos por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov) e coeficientes de correlação ambos aproximadamente iguais a 1 e, conseqüentemente, foram classificadas como não-sensíveis. Portanto, a reação p24 é a mais importante para a simulação de ativação da corrente induzida nas presenças de Na^+ extracelular e ATP e K^+ intracelulares.

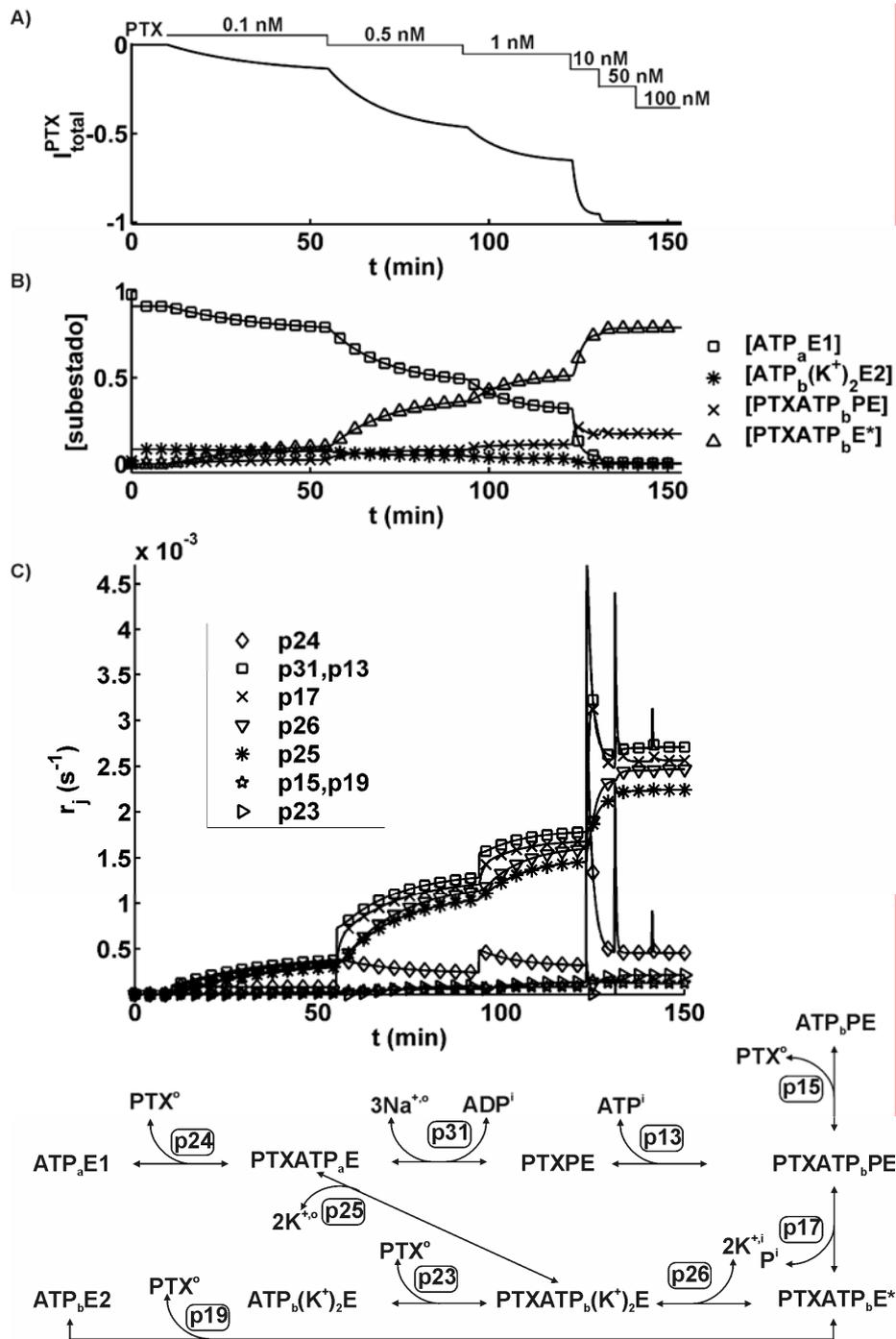


Figura VII.2 – Ativação da corrente induzida em função do aumento da $[PTX]^0$, quando a membrana é perfundida com Na^+ extracelular (160 mM) e K^+ (150 mM) e ATP (5 mM) intracelulares. (A) Corrente induzida durante a simulação. (B) Comportamento das concentrações dos subestados. Os demais subestados apresentaram concentrações menores que 0,01. (C) Taxas das reações envolvendo a PTX.

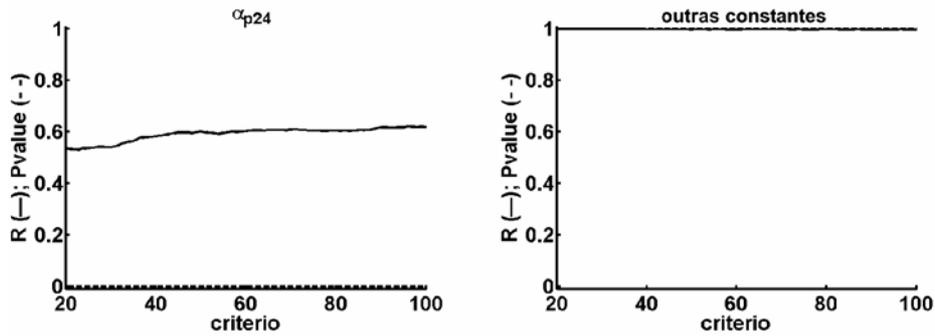


Figura VII.3 – Análise de sensibilidade dos parâmetros durante a simulação de ativação da corrente induzida nas presenças de Na^+ extracelular e ATP e K^+ intracelulares. São apresentados os valores P (curvas tracejadas), obtidos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e do coeficiente de correlação (curvas contínuas) para a análise das distribuições acumuladas de simulações aceitáveis e não-aceitáveis, considerando diferentes critérios (eixo x – valores percentuais da média dos valores de todas as funções objetivas).

VII.2.2 – Decaimento da corrente induzida promovido por K^+ extracelular

ARTIGAS e GADSBY (2003b) observaram que o decaimento da corrente induzida promovido pelo K^+ é mais lento quando a solução intracelular de perfusão contém ATP. Reproduzindo a manobra experimental, foram consideradas as seguintes condições iniciais: $[\text{PTX}]^o = 0 \text{ mM}$, $[\text{Na}^+]^o = 160 \text{ mM}$, $[\text{Na}^+]^i = 150 \text{ mM}$, $[\text{K}^+]^o = [\text{K}^+]^i = [\text{ADP}]^i = [\text{P}]^i = 0$, $[\text{ATP}]^i = 1 \mu\text{M}$ e $V_m = -20 \text{ mV}$. Após o sistema atingir o regime permanente sob essas condições, a $[\text{PTX}]^o$ foi alterada para 100 nM , provocando a ativação da corrente induzida, como indicado na figura VII.4A. Posteriormente, o decaimento da corrente induzida foi estudado alterando, simultaneamente, a $[\text{PTX}]^o$ de 100 nM para 0 nM , a $[\text{Na}^+]^o$ de 160 para 0 mM e a $[\text{K}^+]^o$ de 0 para 160 mM .

Sem considerar as reações p27 e p28, o decaimento da corrente induzida foi mais lento na simulação. Isso indicou a necessidade de incluir as reações p27 e p28, que causam o bloqueio de canais induzidos. Para reduzir os graus de liberdade, a reação p27 foi suposta apresentando somente um sentido de ocorrência, representando o efeito resultante da reação. Nesse caso, β_{p27} foi considerada nula. No caso da reação p28, β_{p28} foi admitida nula porque a concentração de P intracelular foi igual a zero na simulação. A constante α_{p28} foi considerada igual α_{p27} , admitindo que os subestados PTXPE e PTXE* tenham a mesma afinidade para a oclusão de K^+ . Ajustando α_{p27} ($3,20 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)

e α_{p28} ($3,20 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), foi possível reproduzir a aceleração, provocada pelo K^+ , do decaimento da corrente induzida (Figura VII.4A – curva contínua).

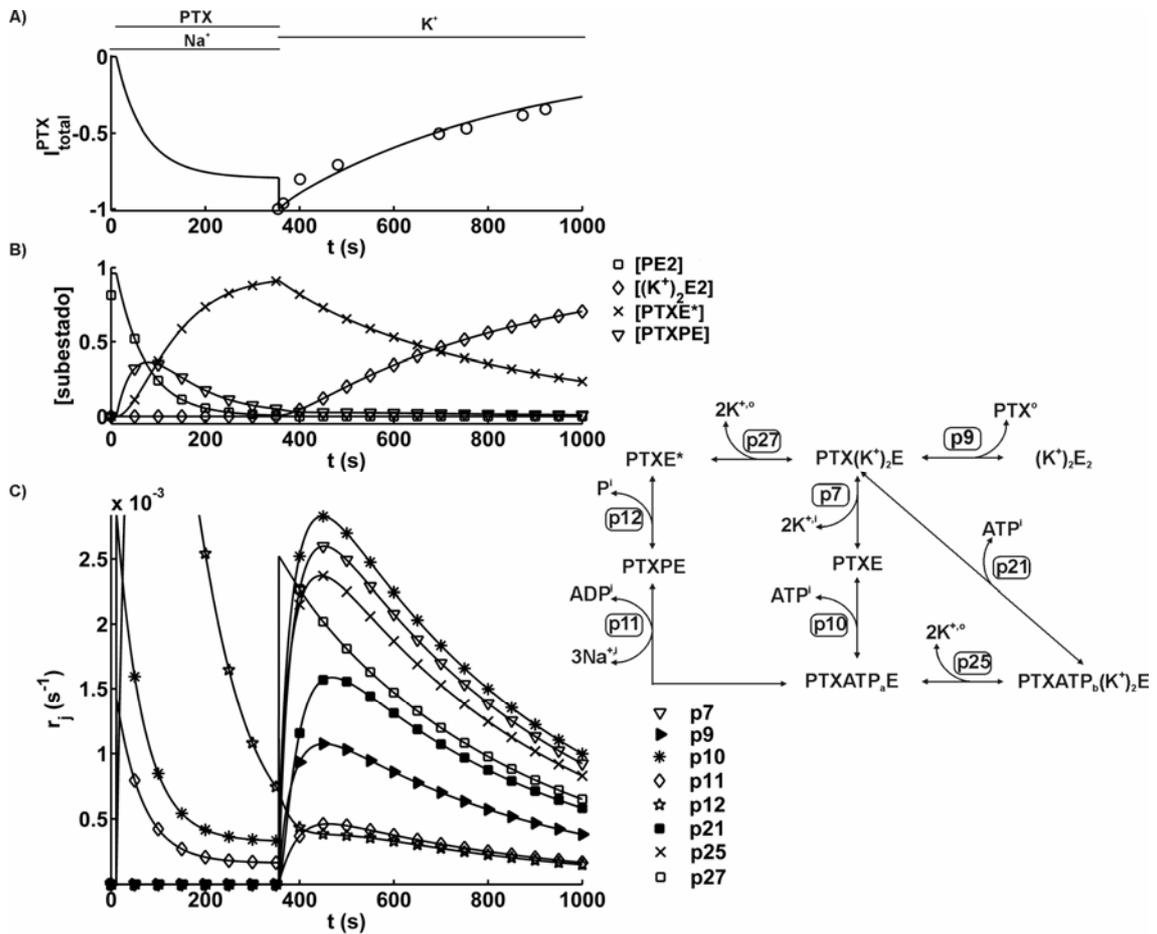


Figura VII.4 – Decaimento da corrente induzida provocado por K^+ extracelular. (A) Comparação entre os dados experimentais (círculos, ARTIGAS e GADSBY, 2003b) e simulação (curva contínua). Após atingir o estado permanente, dadas as condições iniciais e de contorno ($[\text{Na}^+]^o = 160 \text{ mM}$, $[\text{Na}^+]^i = 150 \text{ mM}$, $[\text{PTX}]^o = 100 \text{ nM}$, $[\text{ATP}]^i = 1 \text{ }\mu\text{M}$, $[\text{ADP}]^i = [\text{P}]^i = [\text{K}^+]^i = [\text{K}^+]^o = 0 \text{ mM}$ e $V_m = -20 \text{ mV}$), o decaimento da corrente foi simulado fazendo as seguintes alterações simultâneas: $[\text{PTX}]^o = 0 \text{ nM}$, $[\text{Na}^+]^o = 0 \text{ mM}$ e $[\text{K}^+]^o = 160 \text{ mM}$. (B) Comportamento das concentrações dos subestados PTXE, Na^+_3E_1 e $\text{PTX}(\text{K}^+)_2\text{E}$. Os demais subestados apresentaram concentrações menores que 0,01 durante a perfusão com K^+ . (C) Taxas das reações envolvidas na simulação e o diagrama esquemático correspondente.

Nas Figuras VII.4B e 4C, são apresentadas, respectivamente, as concentrações dos subestados e taxas das reações envolvidas na simulação. Antes da perfusão com K^+ extracelular, a corrente induzida é sustentada por canais nos subestados PTXE^*

([PTXE*] \approx 0,95) e PTXPE ([PTXPE] \approx 0,05). Durante a aplicação do K^+ , as atividades das reações p27 e p28 bloqueiam esses canais, formando o subestado $PTX(K^+)_2E$, e causam o decaimento da corrente. A partir do subestado $PTX(K^+)_2E$, a dissociação da PTX por meio da reação p9 promove o decaimento permanente da corrente induzida. Por outro lado, a desocclusão do K^+ a partir desse subestado (reação p7) permite que o ATP se ligue ao sítio de alta afinidade (reação p10), levando posteriormente à formação dos subestados PTXPE (reação p11) e PTXE* (reação p12), retardando o decaimento provocado pelo K^+ da corrente induzida. Esse retardamento do decaimento da corrente somente não é maior por causa das atividades em cadeia das reações p25 e p21, que contribuem para o bloqueio dos canais formando o subestado $PTX(K^+)_2E$.

A sensibilidade das constantes das reações descritas na Figura VII.4 foi analisada durante o decaimento provocado pelo K^+ da corrente induzida pela PTX. Como se pode observar, somente a constante α_{p27} , da taxa do sentido direto da reação p27, foi classificada como sensível (Figura VII.5). As demais constantes apresentaram P-values (obtidos por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov) e coeficientes de correlação ambos com valores elevados (\sim 1) e, conseqüentemente, foram classificadas como não-sensíveis. Portanto, a reação p27 foi a mais importante para a simulação em que o K^+ extracelular acelera o decaimento da corrente induzida pela PTX na presença de 1 μ M de ATP intracelular.

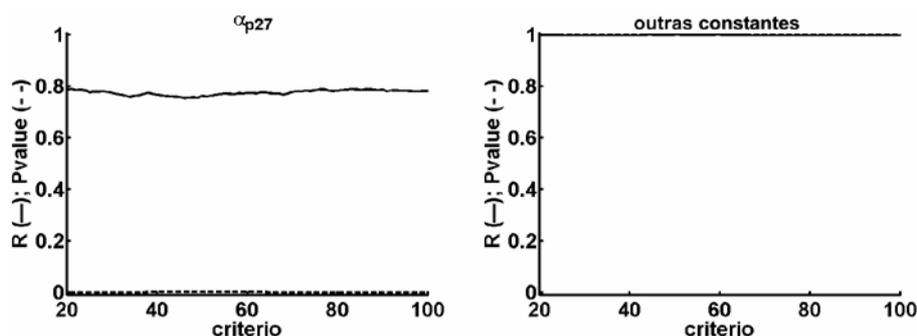


Figura VII.5 - Análise de sensibilidade dos parâmetros durante a simulação do decaimento da corrente induzida, promovido pelo K^+ extracelular, na presença de 1 μ M de ATP intracelular. São apresentados os valores P, obtidos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e do coeficiente de correlação para a análise das distribuições acumuladas de simulações aceitáveis e não-aceitáveis, considerando diferentes critérios (eixo x – valores percentuais da média dos valores de todas as funções objetivas).

ARTIGAS e GADSBY (2003b) observaram que o decaimento provocado por K^+ da corrente induzida pela PTX é ainda mais lento quando a $[ATP]^i$ é igual a 5 mM (Figura VII.6A-círculos). Para simular a manobra experimental, o procedimento foi igual ao usado na simulação da Figura VII.4. A única diferença é o valor da $[ATP]^i$, que agora é igual a 5mM. Se as reações p29 e p30 não são consideradas na simulação, o decaimento da corrente induzida é mais lento do que o observado nos dados experimentais. Isso indica a necessidade dessas duas reações, que promovem o bloqueio de canais induzidos nos subestados $PTXATP_bE^*$ e $PTXATP_bE$. Pois, para esse valor da $[ATP]^i$ e na presença de Na^+ intracelular, esses dois subestados sustentam a corrente induzida. Para reduzir os graus de liberdade, de forma análoga à reação p27, a reação p29 foi considerada ocorrendo apenas no sentido que deve ser o resultante da reação. Portanto, β_{p29} foi assumida igual a 0. Além disso, α_{p30} foi considerada igual a α_{p29} supondo que não existe diferença para a oclusão do K^+ nos subestados $PTXATP_bE^*$ e $PTXATP_bE$. β_{p30} foi considerada nula, pois $[P]^i = 0$. Ajustando as constantes α_{p29} ($1,50 \times 10^{-3} s^{-1}$) e α_{p30} ($1,50 \times 10^{-3} s^{-1}$), a simulação reproduziu o comportamento dos dados experimentais (Figura VII.6A – curva contínua).

As concentrações dos subestados estão apresentadas na Figura VII.6B. A perfusão com K^+ extracelular reduz as concentrações dos subestados $PTXATP_bE$ e $PTXATP_bE^*$ e, simultaneamente, aumenta a $[ATP_b(K^+)_2E2]$. A partir das taxas das reações (Figura VII.6C) pode ser observado que as reações p29 e p30 causam o decaimento da corrente induzida, formando o subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$. As reações p23 e p19 promovem o decaimento permanente, causando a dissociação da PTX. Por outro lado, a desocclusão de K^+ por meio do sentido reverso da reação p25 retarda o decaimento da corrente, permitindo que os canais sejam reabertos no subestado $PTXATP_aE$. A partir desse subestado, a reação p11 causa novamente a fosforilação dos canais induzidos e, posteriormente, as reações p13 e p17 formam, respectivamente, os subestados $PTXATP_bPE$ e $PTXATP_bE^*$.

A análise de sensibilidade das constantes das reações descritas na Figura VII.7 indicou que apenas a constante α_{p29} é sensível. Portanto, a reação p29 é a mais importante para descrever o decaimento da corrente na presença de K^+ extracelular.

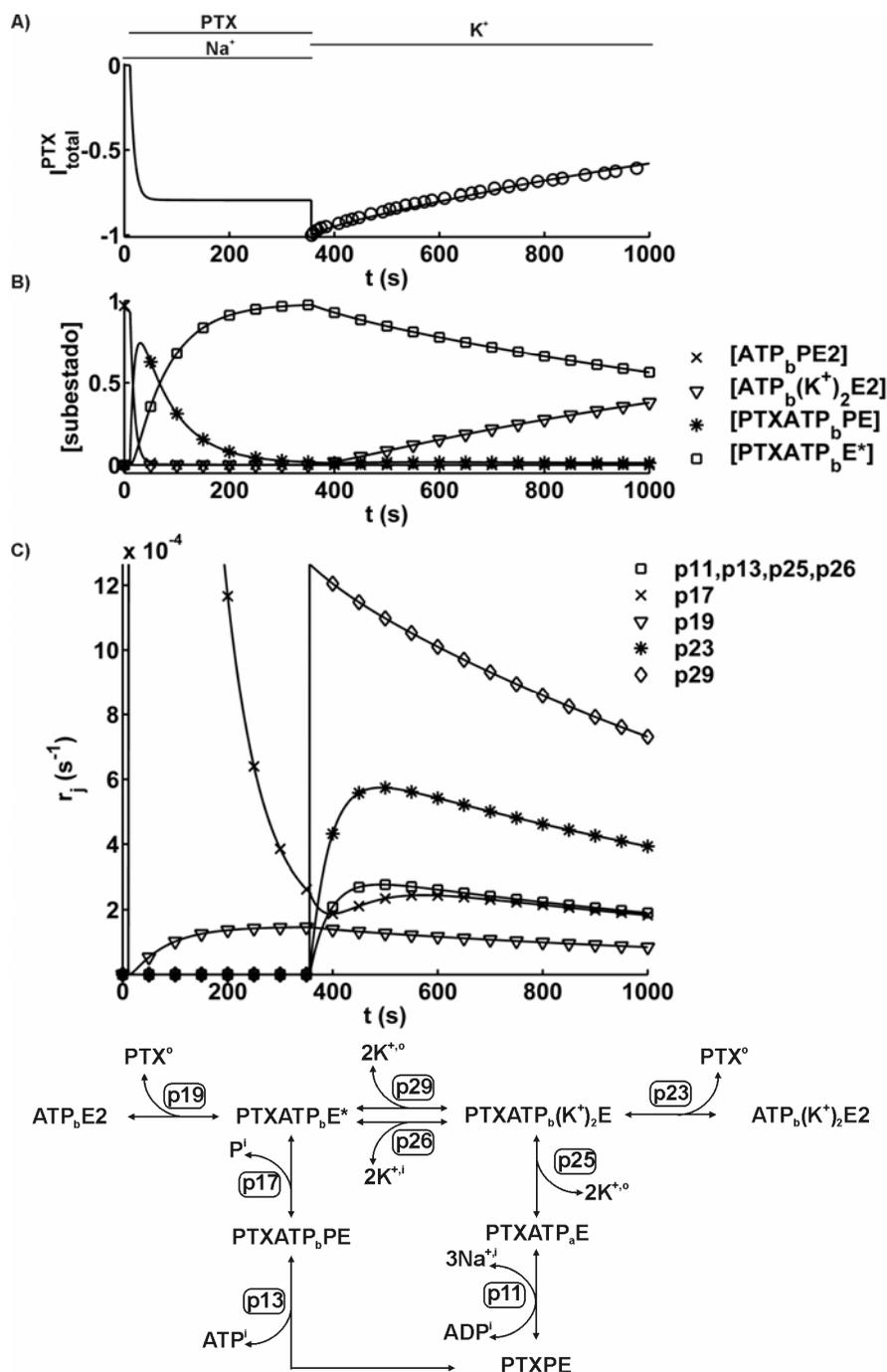


Figura IV.6 – Decaimento da corrente induzida provocado por K^+ extracelular. (A) Comparação entre os dados experimentais (círculos, ARTIGAS e GADSBY, 2003b) e simulação (curva contínua). Condições iniciais: $[Na^+]^o = 160$ mM, $[Na^+]^i = 150$ mM, $[PTX]^o = 100$ nM, $[ATP]^i = 5$ mM, $[ADP]^i = [P]^i = [K^+]^i = [K^+]^o = 0$ mM e $V_m = -20$ mV. O decaimento da corrente foi simulado fazendo as seguintes alterações simultâneas: $[PTX]^o = 0$ nM, $[Na^+]^o = 0$ mM e $[K^+]^o = 160$ mM. (B) Comportamento das concentrações dos subestados ATP_bPE_2 , $ATP_b(K^+)_2E_2$, $PTXATP_bPE$ e $PTXATP_bE^*$. Os demais subestados apresentaram concentrações menores que 0,01 durante a perfusão com K^+ . (C) Taxas das reações envolvidas e o diagrama esquemático correspondente.

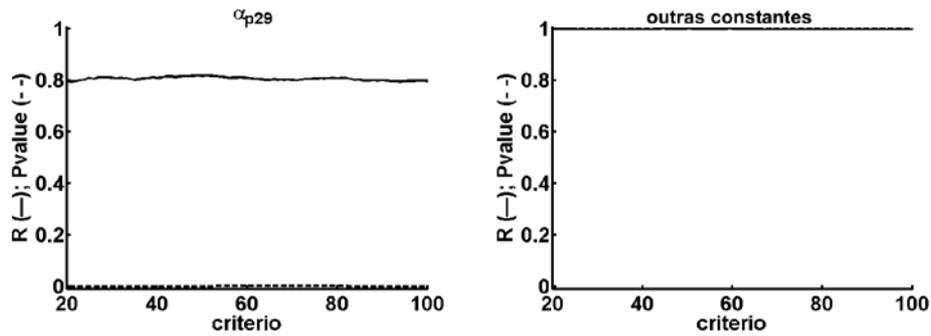


Figura VII.7 - Análise de sensibilidade dos parâmetros durante a simulação do decaimento da corrente induzida, promovido pelo K^+ extracelular na presença de 5 mM de ATP intracelular. São apresentados os valor P, obtidos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e do coeficiente de correlação para a análise das distribuições acumuladas de simulações aceitáveis e não-aceitáveis, considerando diferentes critérios (eixo x – valores percentuais da média dos valores de todas as funções objetivas).

VII.3 – Ativação da corrente induzida nas presenças de K^+ extracelular e Na^+ e ATP intracelular

ARTIGAS e GADSBY (2004) também estudaram a ativação da corrente induzida pela PTX durante a perfusão da membrana com soluções contendo K^+ , na face extracelular, e Na^+ e ATP, na face intracelular (Figura VII.8A – círculos). Nessa situação, foi observado que a taxa de ativação permanece reduzida mesmo para valores elevados da $[PTX]^o$, de forma semelhante ao que acontece quando as soluções contêm apenas K^+ e ATP (como pode ser observado na Figura VI.2). Além disso, a afinidade aparente da PTX é reduzida.

Reproduzindo a manobra experimental, as seguintes condições iniciais foram consideradas: $[K^+]^o = 160$ mM, $[Na^+]^i = 150$ mM, $[ATP]^i = 5$ mM, $[PTX]^o = [ADP]^i = [P]^i = [K^+]^i = [Na^+]^o = 0$ e $V_m = -20$ mV. Após atingir o regime permanente nessas condições, a $[PTX]^o$ foi alterada de 0 para valores no intervalo de 0,1 a 200 nM e as taxas de ativação e as correntes de regime permanente foram estimadas. A comparação entre a simulação (Figura VII.8 – curvas contínuas) e os resultados experimentais mostra que o modelo, sem nenhum novo ajuste de constante, captura os comportamentos dos dados experimentais.

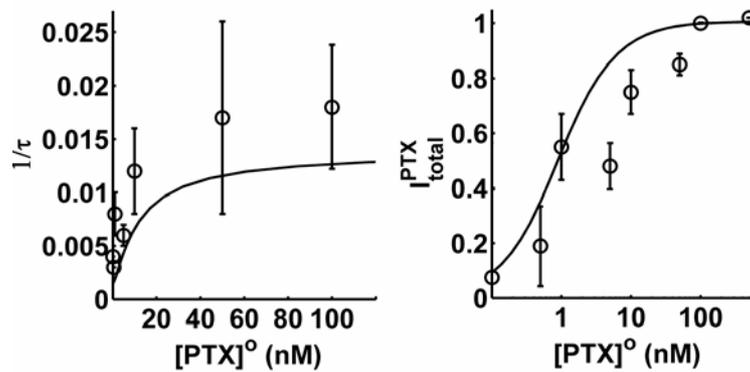


Figura VI.8 -Taxa de ativação e valor de regime permanente da corrente induzida pela PTX nas presenças de K^+ extracelular e ATP e Na^+ intracelulares. Comparação entre dados experimentais (círculos; Artigas e Gadsby, 2004) e simulação.

Para estudar o efeito de cada reação envolvida na ativação da corrente, uma nova simulação foi realizada (Figura VII.9). Nessa simulação, partindo das mesmas condições iniciais descritas no parágrafo anterior, a $[PTX]^0$ foi aumentada de forma gradativa durante a ativação da corrente (Figura VII.9A). Simultaneamente, podem ser observadas as concentrações dos subestados (Figura VII.9B) e as taxas de cada uma das reações envolvidas (com valores maiores que $10^{-6} s^{-1}$) (Figura VII.9C). Pode-se observar que $PTXATP_bE^*$ é o principal subestado responsável pela sustentação da corrente. A sua concentração aumenta durante a simulação, simultaneamente à redução da concentração de enzimas no subestado $ATP_b(K^+)_2E2$. Por meio das taxas das reações, pode-se observar que a ligação da PTX ocorre principalmente por meio da reação p23, formando o subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$. A partir desse subestado, ocorre a desocclusão do K^+ (sentido reverso da reação p25), resultando no subestado $PTXATP_aE$. Posteriormente, a ocorrência em seqüência das reações p11, p13 e p15 levam à formação do subestado $PTXATP_bE^*$. A reação p26, por causar a desocclusão do K^+ a partir do subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$, também contribui para a formação do subestado $PTXATP_bE^*$.

Analisando a sensibilidade dos parâmetros das reações descritas na Figura VII.9, foi observado que somente a constante α_{p23} , da taxa do sentido direto da reação p23 (que causa a ligação da toxina a enzimas no subestado $ATP_b(K^+)_2E2$), é classificada como sensível. Isso indica que a reação p23 é a mais importante para essa simulação. Nos casos das reações p25 e p26, diferentemente das demais constantes não-sensíveis, as constantes β_{p25} e β_{p26} apresentaram valores P relativamente reduzidos (obtidos pelo método de Kolmogorov Smirnov) e coeficientes de correlação.

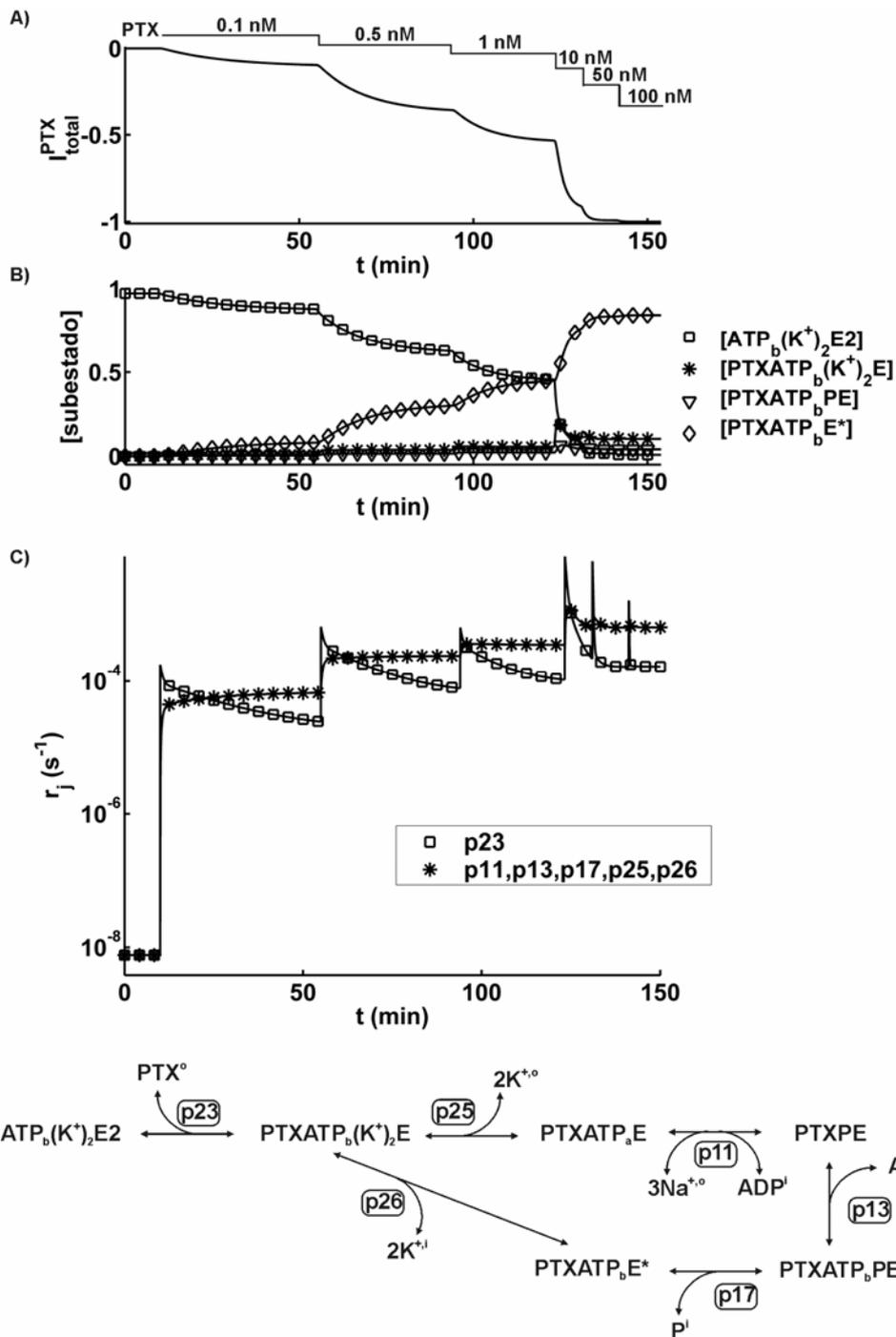


Figura VII.9 – Ativação da corrente induzida em função do aumento da $[PTX]^o$, quando a membrana é perfundida com K^+ extracelular (160 mM) e Na^+ (150 mM) e ATP (5 mM) intracelulares. (A) Corrente induzida durante a simulação. (B) Comportamento das concentrações dos subestados. (C) Taxas das reações envolvendo a PTX.

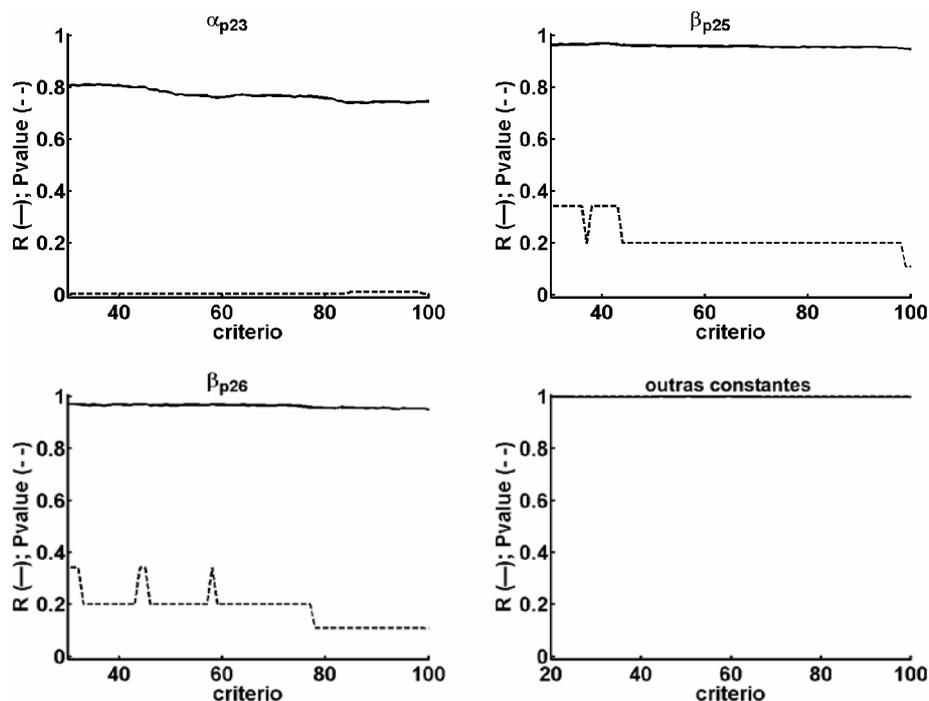


Figura VII.10 - Análise de sensibilidade dos parâmetros durante a ativação da corrente induzida nas presenças de K^+ extracelular e Na^+ e ATP intracelulares. São apresentados os valores P, obtidos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e do coeficiente de correlação para a análise das distribuições acumuladas de simulações aceitáveis e não-aceitáveis, considerando diferentes critérios (eixo x – valores percentuais da média dos valores de todas as funções objetivas).

VII.3 - Discussão

Neste capítulo, todas as reações e subestados propostos nos capítulos anteriores para explicar a cinética da bomba de Na/K na presença da PTX foram reunidos em um único modelo para simular manobras experimentais que fazem diferentes combinações de Na^+ e K^+ nas faces da membrana, na presença de ATP intracelular. Mostrando a necessidade de descrição de novos mecanismos cinéticos, reações (p27-p31) foram incorporadas no modelo para reproduzir melhor os dados experimentais.

ARTIGAS e GADSBY (2004) realizaram experimentos de indução de corrente com a PTX sob duas condições: uma em que a membrana é perfundida com Na^+ extracelular e K^+ e ATP intracelulares e outra na presença de K^+ extracelular e ATP e Na^+ intracelulares. Os autores tinham como objetivo examinar qual dos íons, e em qual face da membrana, é responsável pelas diferenças observadas para a ativação da corrente nos casos em que a membrana é perfundida com soluções contendo somente

Na^+ (Figura V.4) ou K^+ (Figura VI.2), na presença de ATP intracelular. Além de reproduzir os dados experimentais, as simulações indicam que, para os valores utilizados para a concentração da toxina, a taxa de ativação varia linearmente em função da $[\text{PTX}]^0$ quando as enzimas podem ser fosforiladas e a $[\text{K}^+]^0$ é nula (Figura VII.2). Nessa situação, as taxas de ligação da PTX às enzimas, que dependem linearmente da $[\text{PTX}]^0$, são menores do que as taxas de fosforilação dos canais induzidos. Isso pode ser exemplificado, na Figura VII.2C, observando que a taxa da reação p24 (responsável pela ligação da toxina à bomba) é menor do que a taxa da reação p31 (que causa a fosforilação dos canais induzidos e permite a ocorrência posterior das reações p13 e p17). Somando-se isso ao fato de que α_{p24} é a única constante classificada como sensível nessa simulação (Figura VII.3), a reação p24 pode ser sugerida determinante da taxa de ativação da corrente induzida.

Na simulação da Figura VII.1, a necessidade de incluir a reação p31 para reproduzir os dados experimentais indica que a PTX, por causar a abertura da porta externa, permite que o Na^+ tenha acesso aos seus respectivos sítios de alta afinidade a partir da face extracelular, levando à fosforilação do complexo PTX-bomba de Na/K. Este resultado reforça a hipótese de ARTIGAS e GADSBY (2004) de que os canais induzidos pela toxina incluem de alguma forma o caminho iônico do bombeamento normal de Na^+ e K^+ .

As análises de sensibilidade de parâmetros durante as simulações do decaimento da corrente induzida na presença de K^+ reforçam as observações experimentais que indicam que esse íon é o principal inibidor fisiológico da atuação da toxina (ISHIDA *et al.*, 1983; GRELL *et al.*, 1988; HABERMANN, 1989; ARTIGAS e GADSBY, 2004). De fato, as reações de oclusão do K^+ nos subestados PTXE^* e $\text{PTXATP}_b\text{E}^*$ foram as únicas classificadas como sensíveis (Figuras VII.5 e 7), sendo as mais importantes para essas simulações. Por outro lado, essas simulações sugerem que a fosforilação dos canais induzidos aumenta a afinidade aparente da PTX de duas formas. Na primeira, como discutido no capítulo V, a fosforilação da Na^+/K^+ -ATPase reduz a taxa de dissociação da toxina, reduzindo a sua constante de dissociação. Na segunda forma, a fosforilação reduz a capacidade de oclusão do K^+ , que é o principal inibidor fisiológico do efeito da PTX. A redução da oclusão do K^+ pode ser observada comparando as constantes das taxas das reações p6 ($\alpha_{p6} = 1,06 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$) e p25 ($\alpha_{p25} = 1,00 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$) com as constantes das taxas das reações p27 ($\alpha_{p27} = 3,20 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) e p28 ($\alpha_{p28} = 3,20 \times$

10^{-3} s^{-1}). Essa diferença na oclusão do K^+ se reflete numa menor taxa de decaimento da corrente, na presença desse íon na face extracelular, quando o meio intracelular contém $1 \mu\text{M}$ de ATP (Figura VII.4). Quando a $[\text{ATP}]^i$ é igual a 5 mM , a redução da capacidade de oclusão do K^+ é ainda maior (Figura VII.6). Isso ocorre porque, nessa situação, a corrente induzida é sustentada principalmente pelos subestados $\text{PTXATP}_b\text{E}^*$ e PTXATP_bPE , os quais apresentam maior resistência à oclusão do K^+ (reação p29 - $\alpha_{p29} = 1,50 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; reação p30 - $\alpha_{p30} = 1,50 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Essa baixa probabilidade de oclusão de K^+ nesses dois subestados também é responsável pela alta afinidade aparente da PTX na simulação da Figura VII.1, aproximadamente igual ao caso em que as soluções contêm apenas Na^+ e ATP (Capítulo V; Figura V.4).

ARTIGAS e GADSBY (2004) propuseram que a fosforilação dos canais induzidos, por contribuir mantendo a porta externa aberta, aumenta a afinidade da PTX porque aumenta a probabilidade de abertura da porta externa. Os autores levantaram essa hipótese considerando que a PTX somente se desliga se o canal estiver fechado. Nesse sentido, a redução da oclusão do K^+ quando as enzimas são fosforiladas pode estar associada ao fato de que os subestados PTXPE e PTXE^* devem apresentar maior resistência ao fechamento da porta externa. No caso dos subestados PTXATP_bPE e $\text{PTXATP}_b\text{E}^*$, além da abertura da porta extracelular ser favorecida pela fosforilação, a ligação de ATP aos sítios de baixa afinidade contribui para a aumentar a probabilidade de abertura da porta intracelular. Isso pode explicar porque esses dois subestados são os que apresentam maior resistência à oclusão do K^+ .

Em relação ao subestado PTXATP_aE , com o ATP presente no sítio de alta afinidade, a probabilidade simulada de oclusão do K^+ foi alta (reação p25 - $\alpha_{p25} = 1,00 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$). Isso pode estar associado ao fato de que, em bombas não-modificadas, a ligação do ATP aos sítios de alta afinidade tende a causar o fechamento da porta intracelular e a fosforilação da enzima quando os íons Na^+ estão presentes em seus respectivos sítios (HEYSE *et al.*, 1994). No caso dos canais induzidos no subestado PTXATP_aE , a abertura da porta externa aumenta a afinidade para os íons K^+ extracelulares e, de alguma forma, esses íons devem mimetizar parte do efeito dos íons Na^+ , causando o fechamento das portas da bomba, mas sem levar à fosforilação do canal induzido.

A alta probabilidade de ocorrência da oclusão do K^+ em canais induzidos do tipo PTXATP_aE (reação p25) explica porque, na presença desse íon na face extracelular, a

taxa de ativação da corrente permanece com valores reduzidos mesmo quando a $[PTX]^o$ é aumentada (Figura VII.9). Nessa simulação, como indica a análise de sensibilidade dos parâmetros (Figura VII.10), a reação p23, que causa a ligação da PTX formando subestado $PTXATP_b(K^+)_2E_2$, é a mais importante (α_{p23} é a única constante sensível). Apesar disso, a formação dos subestados $PTXATP_bE^*$ e $PTXATP_bPE$, que sustentam a corrente induzida, depende das atividades das reações p26 (sentido direto) e p25 (sentido reverso), as quais apresentam taxas com valores relativamente baixos. A reação p26 promove transições de $PTXATP_b(K^+)_2E$ para o subestado $PTXATP_bE^*$, causando a desocclusão do K^+ na face intracelular. A desocclusão do K^+ na face extracelular, segundo o sentido reverso da reação p25, forma canais induzidos do tipo $PTXATP_aE$. Esses canais podem ser fosforilados (reação p11) e, posteriormente, ocorre a formação dos subestados $PTXATP_bPE$ (reação p13) e $PTXATP_bE^*$ (reação p17). Nesse caso, a soma das atividades das reações p25 (sentido reverso) e p26 (sentido direto) determina o valor reduzido da taxa de ativação da corrente induzida.

A oclusão de K^+ em canais induzidos do tipo $PTXATP_aE$ (reação p25) também é responsável pela baixa afinidade aparente da PTX quando esse íon está na face extracelular. Pois, ao formar o subestado $PTXATP_b(K^+)_2E$, além de bloquear os canais induzidos, causa o aumento da taxa de dissociação da toxina (reação p23 - $\beta_{p23} = 1,31 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) e inibe a fosforilação da enzima. Todas essas observações apontam a reação p25 como principal mecanismo envolvido na cinética da inibição do K^+ sobre a atuação da PTX sobre a bomba de Na/K.

Capítulo VIII – Efeito da PTX durante a Indução de Atividades Epileptiformes Não-Sinápticas

VIVAS (2005), durante sua dissertação de mestrado, estudou o efeito da PTX sobre as atividades epileptiformes não-sinápticas, objetivando interferir sobre a atividade da bomba de Na/K durante essas atividades neuronais intensas. Esse trabalho foi motivado por simulações computacionais que indicam que a atividade da bomba de Na/K é essencial para o controle da excitabilidade neuronal, sendo responsável pela finalização de crises epileptiformes não-sinápticas (RODRIGUES, 2003).

Trabalhos mostram que a aplicação da PTX em tecidos neuronais causa despolarizações da membrana celular, acúmulo de Ca^{2+} intracelular e alterações de pH (HABERMANN, 1989; VALE-GONZALEZ *et al.*, 2007). Nesses trabalhos, pode-se observar que a concentração de PTX utilizada é sempre relativamente elevada (na ordem de 1 μ M). Por causa da afinidade elevada da bomba à PTX, esse valor de concentração deve causar a ligação da toxina em praticamente todas as enzimas. Além disso, como pode ser observado a partir dos valores reduzidos das constantes das taxas de dissociação (capítulos anteriores), a PTX permanece ligada a seus sítios por um tempo muito longo. Assim, no trabalho de VIVAS (2005), concentrações mais altas poderiam lesionar o tecido, o que não seria interessante, uma vez que o objetivo desse estudo foi submeter o tecido a um mínimo de interferências sobre sua homeostase. Portanto, as concentrações das soluções de PTX para perfusão foram de: 0,0466 nM, 0,0933 nM, 0,4664 nM, 4,6640 nM e 9,3280 nM. Pois, dessa forma, em função das diluições devidas aos volumes do tubo e da câmara, as soluções atingiram as fatias com concentrações estimadas de: 0,0081 nM, 0,0162 nM, 0,0809 nM, 0,8100 nM, e 1,7520 nM, respectivamente.

Investigando o efeito da toxina, VIVAS (2005) observou que há uma redução no tempo de duração da ocorrência de atividades epileptiformes com o aumento da concentração de PTX (Figura VIII.1). Além disso, as análises morfológicas dos eventos, para as concentrações estabelecidas, mostraram que o término das atividades epileptiformes, em nenhum dos casos de aplicação da PTX, envolve a transição para DA, como ocorre nos casos controle. Há a transição para eventos com características morfológicas que geralmente não são observadas.

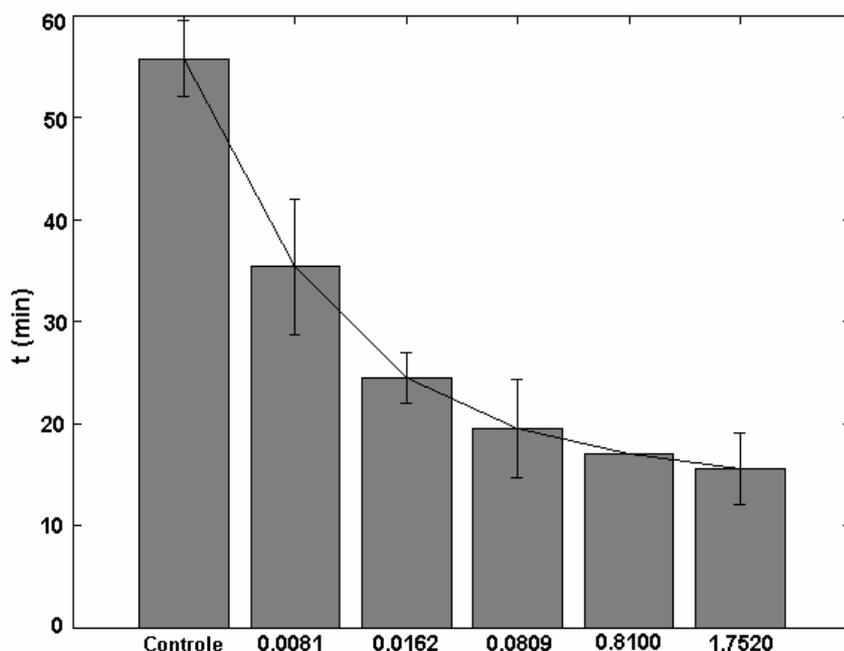


Figura VIII.1 – Gráfico de barras que representa o tempo de duração da ocorrência de atividades epileptiformes nos experimentos controle e nos experimentos em que houve perfusão de PTX nas concentrações de 0,0081 nM, 0,0162 nM, 0,08009 nM, 0,8100 nM e 1,7520 nM (VIVAS, 2005).

Durante a indução de atividades epileptiformes não-sinápticas, observa-se que podem ocorrer tipos diferentes de eventos (CARVALHO, 2003): (i) tipo A – o evento é caracterizado apenas por um deslocamento lento e negativo da linha de base do potencial elétrico extracelular, sem a presença de *population spikes* (são variações rápidas que são observadas em medidas do potencial extracelular quando ocorrem descargas neuronais síncronas e por isso têm a morfologia do potencial de ação); (ii) tipo B – apesar do potencial elétrico no início apresentar apenas uma variação lenta e negativa, os *population spikes* surgem durante o evento e suas amplitudes aumentam progressivamente; (iii) tipo C – a variação lenta e negativa do potencial extracelular é superposta às variações rápidas (*population spikes*) durante todo o evento. Dos 13 experimentos feitos por VIVAS (2005), envolvendo a aplicação da PTX, 12 apresentaram eventos classificados como tipo B e apenas 1 classificado como tipo C. Essa diferença de ocorrências entre os dois tipos de eventos já havia sido observada por CARVALHO (2003). Na Figura VIII.2, na coluna da esquerda, são mostrados um caso típico de evento do tipo B (parte A) e o registro de evento do tipo C (parte B). À direita de cada evento, são mostrados os correspondentes eventos atípicos resultantes da aplicação de PTX.

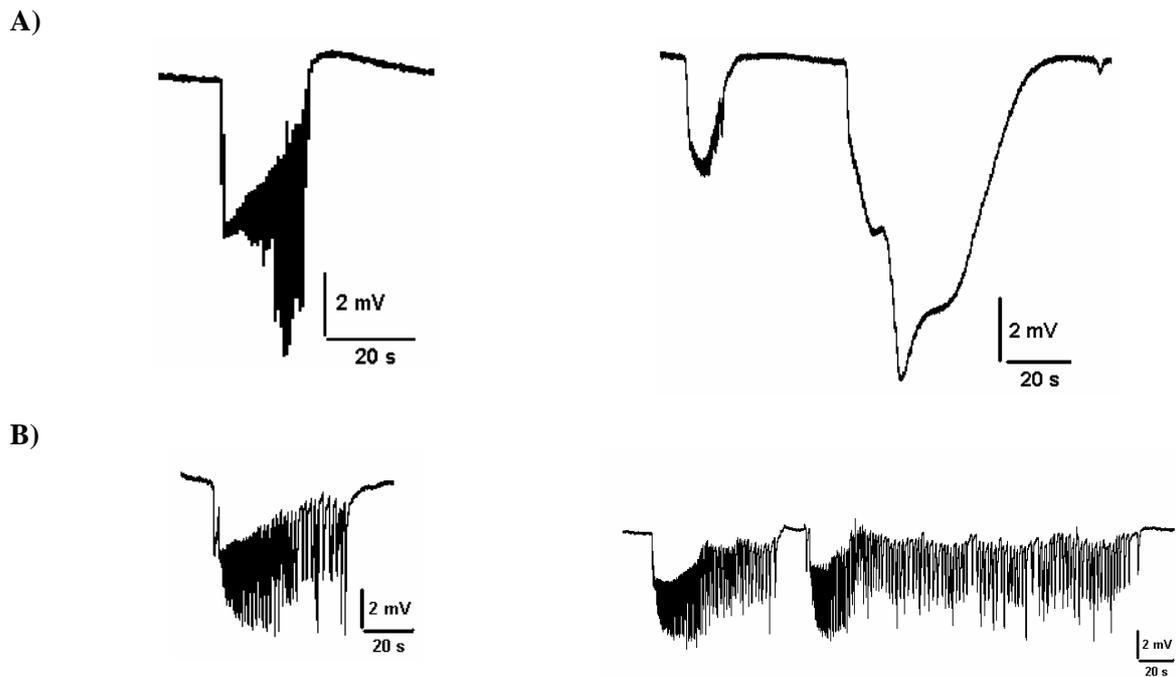


Figura VIII.2 – Exemplos dos eventos registrados nos experimentos com perfusão com PTX.

Na coluna da esquerda, são mostrados casos típicos de eventos do tipo B (A) e C (B). À direita de cada evento são mostrados os correspondentes eventos atípicos resultantes da aplicação de PTX (VIVAS, 2005).

Para os experimentos onde figuram eventos do tipo B, a aplicação da PTX induz a ocorrência de eventos caracterizados por uma redução significativa dos *population spikes* e uma morfologia mais arredondada para a componente DC. Posteriormente, com a intensificação da atuação da PTX, os registros são caracterizados pela ocorrência intermitente de eventos que se iniciam com os já descritos e, subitamente, a componente DC sofre um deslocamento negativo abrupto, da ordem de 10 mV, que, após o valor mínimo, retorna à linha de base (Figura VIII.2A). Já para os eventos do tipo C, observa-se a transição para eventos que se iniciam como os do tipo C, porém, após a redução da componente DC, os *population spikes* continuam a ocorrer, por um período de tempo 2 ou 3 vezes maior que o evento típico (Figura VIII.2 B).

Trabalhando em conjunto com VIVAS (2005) e, assim, pretendendo contribuir para a interpretação de seus resultados experimentais, o modelo desenvolvido para o complexo PTX-bomba de Na/K foi incorporado em um modelo que reproduz atividades epileptiformes não-sinápticas (RODRIGUES, 2003) para simular a aplicação da PTX durante a indução desse tipo de atividade epileptiforme.

VIII.1 – Modelo matemático para atividades epileptiformes sustentada por conexões não-sinápticas

O estudo das atividades epileptiformes não-sinápticas, no giro dentado de hipocampo de rato, é um instrumento importante para a investigação da influência dos mecanismos subcelulares não-sinápticos durante crises epiléticas. Isso motivou o desenvolvimento de um modelo computacional, que descreve as propriedades eletroquímicas desses mecanismos, para simular atividades epileptiformes sustentadas apenas por modulações não-sinápticas (RODRIGUES, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2004). Esse modelo considera o meio extracelular formado por uma rede tridimensional de compartimentos (Figura VIII.3). A cada um dos compartimentos extracelulares mais internos (cinza escuro) são conectados dois corpos celulares (esferas pretas), um glial e outro neuronal, representando a camada de corpos celulares do giro dentado. Os compartimentos extracelulares intermediários (cinza claro) não são conectados a compartimentos intracelulares e representam as regiões, do giro dentado, formadas principalmente por arborizações dendríticas. Os planos de compartimentos extracelulares das bordas laterais e da base (brancos) têm suas concentrações iônicas mantidas constantes e representam a solução de perfusão do tecido em experimentos.

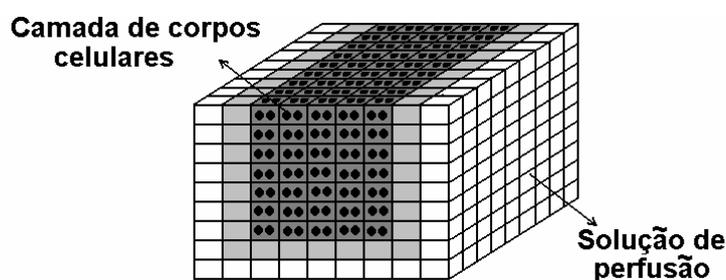


Figura VIII.3 – Estrutura tridimensional do modelo para representar o tecido banhado pela solução de perfusão (RODRIGUES, 2003).

Na^+ , K^+ e Cl^- são as espécies iônicas representadas. O Ca^{2+} não é incluído, pois, objetiva-se simular atividades epileptiformes não-sinápticas características de protocolos experimentais com zero- Ca^{2+} extracelular. A movimentação de cada espécie iônica no meio extracelular é descrita por uma equação de eletrodifusão (ALMEIDA *et al.*, 2004).

$$\frac{\partial [w]^o}{\partial t} = \frac{D_w}{\lambda^2} \nabla^2 [w]^o + \frac{z_w F D_w}{RT \lambda^2} \bar{\nabla} [w]^o \bar{\nabla} V^o + \frac{z_w F D_w}{RT \lambda^2} [w]^o \nabla^2 V^o, \quad (8.1)$$

onde $[w]^o$ (mM) e D_w (cm²/s) são, respectivamente, a concentração extracelular e a constante de difusão do íon w (Na⁺, K⁺ e Cl⁻), F (C/mMol) é a constante de Faraday, R (mVC/KmMol) é a constante de Boltzmann, T (K) a temperatura do tecido, λ a tortuosidade do meio, z_w a valência e V^o (mV) é o potencial extracelular.

$\bar{\nabla} V^o$ é calculado considerando que a variação de V^o , durante as descargas epileptiformes, é a soma de uma componente em nível DC, V_{DC} , com outra em alta frequência, V_{AF} . Para o cálculo de $\bar{\nabla} V_{DC}$ utiliza-se a equação derivada por ALMEIDA *et al.* (2004):

$$\bar{\nabla} V_{DC} = -\frac{RT}{F} \frac{z_{Na} D_{Na} \bar{\nabla} [Na]^o + z_K D_K \bar{\nabla} [K]^o + z_{Cl} D_{Cl} \bar{\nabla} [Cl]^o}{z_{Na}^2 D_{Na} [K]^o + z_K^2 D_K [K]^o + z_{Cl}^2 D_{Cl} [Cl]^o} \quad (8.2)$$

Para a componente em alta frequência V_{AF} , denominada *population spike*, utiliza-se uma equação de campo quase-estacionário:

$$V_{AF} = \sum_{n=1}^N \frac{1}{4\pi\sigma} \frac{I_n^m}{\xi d_n}, \quad (8.3)$$

sendo N o número total de neurônios e d_n (cm) a distância entre o n -ésimo neurônio e o ponto onde está sendo calculado o potencial. σ (S/cm) é a condutividade elétrica efetiva do tecido, ξ é um fator de contração do volume extracelular e I_n^m (mA) é a corrente transmembranar total do n -ésimo neurônio.

A movimentação iônica através da membrana neuronal, entre os meios intra- e extracelular, é descrita por canais iônicos dependentes de voltagem, bomba de Na/K e co-transporte K-Cl (KCC) (Figura VIII.4A). Além desses mecanismos, são consideradas também as *gap-junctions* promovendo a interconexão entre os citoplasmas de células adjacentes. Para a membrana glial, foram considerados canais iônicos com permeabilidades constantes, bomba de Na/K e o co-transporte Na-K-2Cl (NKCC) (Figura VIII.4B).

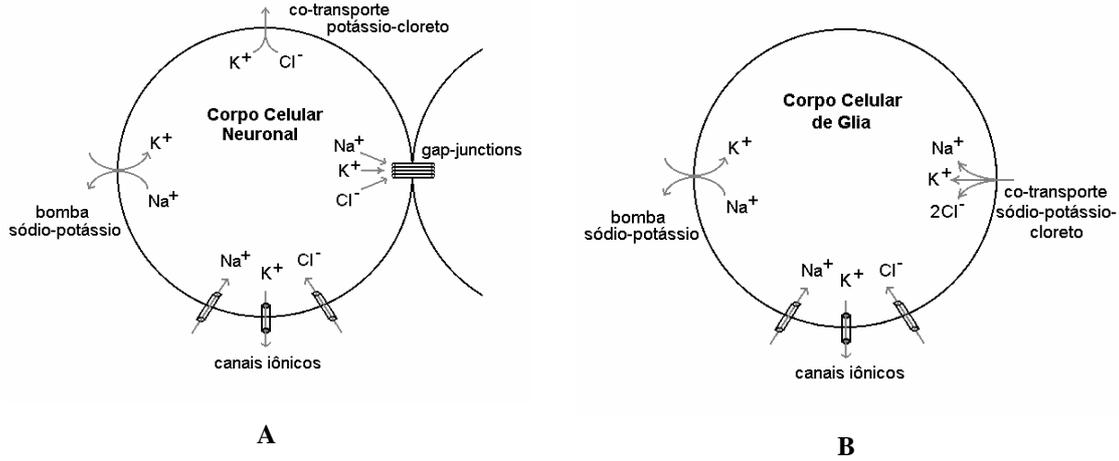


Figura VIII.4: Representação esquemática dos mecanismos transmembranares de transporte iônico para neurônios (A) e glia (B) (RODRIGUES, 2003).

A densidade de corrente iônica do íon w , J_w^{ci} (mA/cm²), através dos canais correspondentes, é calculada pela equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) para corrente (HILLE, 1992):

$$J_w^{ci} = \frac{P_w F^2 z_w^2 Vm}{RT} \times \frac{[w]^i - [w]^o e^{-\frac{z_w F Vm}{RT}}}{1 - e^{-\frac{z_w F Vm}{RT}}}, \quad (8.4)$$

onde Vm (mV) é o potencial transmembranar e P_w (cm/s) é a permeabilidade que é calculada de acordo com as condutâncias do modelo de HODGKIN e HUXLEY (1952). $[w]$ (mM) é a concentração de w , sendo que os índices i e o indicam os meios intra- e extracelulares, respectivamente.

A densidade de corrente da bomba de Na/K, $J_{Na/K}$ (mA/cm²), é calculada associando-a à corrente de um íon fictício A^+ e aplicando a equação de GHK de corrente a esse íon:

$$J_A = \frac{P_A F^2 Vm}{RT} \times \frac{[A]^i - [A]^o e^{-\frac{F Vm}{RT}}}{1 - e^{-\frac{F Vm}{RT}}}, \quad (8.5)$$

Para estimar as concentrações desse íon A^+ , considera-se o equilíbrio instantâneo das reações de Na⁺, K⁺, ATP, ADP e P com a bomba, no modelo de Albers-Post, e derivam-se as seguintes equações:

$$[A]^i = Ke_A^i \frac{[ATP]^i}{[ATP]^i + Kd_{ATP}^i \left(1 + \frac{[ADP]^i [P]^i}{Kd_{ADP,P}^i}\right)} \times \quad , \quad (8.6)$$

$$\times \frac{([Na]^i)^3}{\left[[Na]^i + Kd_{Na}^i \left(1 + \frac{[K]^i}{Kd_K^i}\right) \right]^3} \frac{([K]^o)^2}{\left[[K]^o + Kd_K^o \left(1 + \frac{[Na]^o}{Kd_{Na}^o}\right) \right]^2}$$

$$[A]^o = Ke_A^o \frac{[ADP]^i [P]^i}{[ADP]^i [P]^i + Kd_{ADP,P}^i \left(1 + \frac{[ATP]^i}{Kd_{ATP}^i}\right)} \times \quad , \quad (8.7)$$

$$\times \frac{(C_{Na}^o)^3}{\left[[Na]^o + Kd_{Na}^o \left(1 + \frac{[K]^o}{Kd_K^o}\right) \right]^3} \frac{([K]^i)^2}{\left[[K]^i + Kd_K^i \left(1 + \frac{[Na]^i}{Kd_{Na}^i}\right) \right]^2}$$

onde Kd_y (mM) é a constante de dissociação de y (ATP, ADP/P, Na^+ ou K^+), Ke_A a constante de equilíbrio da reação de formação de íons A^+ .

A densidade de fluxo devido ao KCC, ϕ_{KCC} (mmol/scm²), é calculada (Equação 8.8) considerando as reações desses íons com a proteína do co-transporte em estado de equilíbrio, em cada instante de tempo.

$$\phi_{KCC} = Q_{KCC} \frac{[K]^i [Cl]^i - [K]^o [Cl]^o}{(Kd_K^{KCC} + [K]^i + [K]^o)(Kd_{Cl}^{KCC} + [Cl]^i + [Cl]^o)} \quad , \quad (8.8)$$

onde Kd_K^{KCC} e Kd_{Cl}^{KCC} , em mM, são as constantes de dissociação de K^+ e Cl^- , respectivamente, e Q_{KCC} (mmol/cm²s) uma constante de proporcionalidade relacionada à densidade de enzimas cotransportadoras.

Analogamente ao KCC, a densidade de fluxo do NKCC, ϕ_{NKCC} (mMol/scm²), é determinada considerando o equilíbrio instantâneo das reações de Na^+ , K^+ e Cl^- com a enzima co-transportadora:

$$\phi_{NKCC} = Q_{NKCC} \frac{[Na]^i [K]^i ([Cl]^i)^2 - [Na]^o [K]^o ([Cl]^o)^2}{ABC} \quad , \quad (8.9)$$

onde ,

$$A = Kd_{Na}^{NKCC} + [Na]^i + [Na]^o \quad ,$$

$$B = Kd_K^{NKCC} + [K]^i + [K]^o \quad ,$$

$$C = (Kd_{Cl}^{NKCC} + [Cl]^i + [Cl]^o)^2,$$

sendo Kd_{Na}^{NKCC} , Kd_K^{NKCC} e Kd_{Cl}^{NKCC} , em mM, as constantes de dissociação de Na^+ , K^+ e Cl^- e Q_{NKCC} (mmol/scm²) uma constante de proporcionalidade relacionada ao número de enzimas.

Para calcular a densidade de corrente, J_w^{gj} (mA/cm²), através das *gap-junctions*, a equação de Nernst-Planck (HILLE, 1992) é aplicada de forma discreta a cada uma das espécies iônicas:

$$J_w^{gj} \approx -z_w F k D_w \left(\frac{[w]^{(1)} - [w]^{(2)}}{l} + \frac{z_w F D_w [w]^{(1)}}{RT} \frac{V_m^{(1)} - V_m^{(2)}}{l} \right), \quad (8.10)$$

onde k (cm⁻¹) é uma constante de proporcionalidade, os índices (1) e (2) representam dois neurônios adjacentes quaisquer, l (cm) é a distância entre os centros dos neurônios (1) e (2) e D_w (cm/s) é a constante de difusão do íon w (Na^+ , K^+ ou Cl^-).

Para o efeito de campo elétrico entre neurônios, que é outro tipo de conexão não-sináptica, é assumido que a densidade de corrente total, J_{ef} (mA/cm²), provocada por uma população de neurônios, que atravessa a membrana de um neurônio seja dada por:

$$J_{ef} = \sum_{n=1}^N \tau \cdot \frac{I_n^m}{d_n}, \quad (8.11)$$

onde I_n^m (mA) é a corrente transmembranar total do neurônio n , d_n (cm) é a distância entre o n -ésimo neurônio e a célula na qual a corrente está sendo calculada, N é o número de neurônios e τ (cm⁻¹) é uma constante de proporcionalidade.

Para calcular o potencial transmembranar, admite-se o equilíbrio dinâmico para o qual o somatório das correntes transmembrânicas é nulo e deriva-se uma equação modificada em relação à equação de GHK de potencial:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{Na}[Na]^o + P_K[K]^o + P_{Cl}[Cl]^i + P_A[A]^o + f + f_2}{P_{Na}[Na]^i + P_K[K]^i + P_{Cl}[Cl]^o + P_A[A]^i + 2} \right), \quad (8.12)$$

onde,

$$f = -\frac{A_{gj}}{A_m} \sum J_w^{gj} \left(e^{\frac{FV_m}{RT}} - 1 \right) \frac{RT}{F^2 V_m} + e^{\frac{FV_m}{RT}},$$

$$f_2 = -J_{ef} \cdot \left(e^{\frac{FV_m}{RT}} - 1 \right) \cdot \frac{RT}{F^2 V_m} + e^{\frac{FV_m}{RT}},$$

sendo A_{gj} a área total das *gap-junctions* e A_m e a área total da membrana celular.

O modelo também considera a variação dos volumes extra- e intracelulares. A equação para o cálculo do volume intracelular, Vol_i (dm³), neuronal ou glial, é derivada admitindo o equilíbrio osmótico em cada instante de tempo e que o volume total, Vol_{total} (dm³), extracelular mais neuronal e glial, é constante (Equação 8.13). Com a última consideração, a variação do volume extracelular é igual ao negativo da soma das variações dos volumes neuronal e glial.

$$Vol_i = \frac{Vol_{total} (\sum \eta_w^i + \eta_s^i)}{\sum \eta_w^o + \eta_s^o + \sum \eta_w^i + \eta_s^i}, \quad (8.13)$$

sendo η_w (mMol) o número de mols do íon w e η_s (mMol) o número de mols de outros solutos presentes no tecido, os quais não são considerados neste modelo.

Para simular a indução de atividades epileptiformes não-sinápticas características do GD, quando se usa protocolo experimental com alto-K⁺ e zero-Ca²⁺ (XIONG e STRINGER, 2000; CARVALHO, 2003), a concentração extracelular de K⁺ dos compartimentos que figuram a solução de perfusão é aumentada. A representação da perfusão com zero-Ca²⁺ está originalmente incluída na estrutura do modelo, uma vez que as conexões sinápticas não foram incorporadas.

VIII.2 - Métodos

VIII.2.1 - Inclusão do efeito da PTX no modelo matemático para atividades epileptiformes não-sinápticas

Para simular o efeito da PTX sobre as atividades epileptiformes não-sinápticas, além das reações do ciclo funcional da bomba (reações 1-17), todas as reações envolvendo a toxina propostas nos capítulos IV-VII (reações p1-p31) foram consideradas. Portanto, as equações das taxas de variação das concentrações dos subestados da bomba (Equações 7.1-7.21) foram incorporadas no modelo matemático para atividades epileptiformes (descrito no subitem VIII.1).

Considerando que a ligação da PTX às enzimas inibe o bombeamento de Na^+ e K^+ , a permeabilidade do íon fictício A^+ , P_A (Equação 8.5) foi reescrita em função da concentração de enzimas ligadas a moléculas de PTX:

$$P_A = P_A^{\max} (1 - [\text{PTXE}] - [\text{PTX}(\text{K}^+)_2\text{E}] - [\text{PTX}(\text{Na}^+)_2\text{E}] - [\text{PTXATP}_a\text{E}] - [\text{PTXATP}_b\text{E}^*] - [\text{PTXE}^*] - [\text{PTXATP}_b(\text{K}^+)_2\text{E}] - [\text{PTXPE}] - [\text{PTXATP}_b\text{PE}]), \quad (8.14)$$

onde concentrações de compostos que contém enzimas ligadas a PTX estão normalizadas em relação à concentração total de enzimas da bomba de Na/K na membrana celular (capítulos IV-VII). P_A^{\max} é a permeabilidade máxima do íon fictício A^+ .

Segundo a Equação 8.14, a ligação de enzimas a moléculas de PTX causa o bloqueio da bomba de Na/K, uma vez que, se todas as enzimas estiverem ligadas a toxina, a permeabilidade de A^+ é nula e, conseqüentemente, a corrente da bomba também será nula. Além de bloquear a bomba, a PTX induz canais através das moléculas que permitem os fluxos dissipativos de Na^+ e K^+ por eletrodifusão. Como descrito nos Capítulos IV-VII, esse fenômeno é descrito calculando as correntes de Na^+ e K^+ através da equação de corrente de GHK, na qual a permeabilidade iônica é calculada em função da concentração de enzimas ligadas a PTX que representam canais abertos:

$$P_{ion}^{PTX} = \gamma_{ion} \cdot (P_{o1}[\text{PTXE}] + P_{o2}[\text{PTXATP}_a\text{E}] + P_{o3}[\text{PTXPE}] + P_{o4}[\text{PTXE}^*] + P_{o5}[\text{PTXATP}_b\text{PE}] + P_{o6}[\text{PTXATP}_b\text{E}^*]) \quad (8.15)$$

onde P_{ion}^{PTX} é a permeabilidade do íon (Na^+ ou K^+), γ_{ion} é uma constante de proporcionalidade e P_{oj} ($j = 1, \dots, 6$) são coeficientes que traduzem a probabilidade de abertura dos canais nos subestados correspondentes.

O fato de induzir canais permeáveis a Na^+ e K^+ , aumentando as permeabilidades totais transmembranares desses íons, faz com que a PTX também tenha influência direta sobre o potencial transmembranar, segundo a seguinte equação para a permeabilidade:

$$P_{ion}^{total} = P_{ion}^{Vm} + P_{ion}^{PTX} \quad (8.16)$$

onde P_{ion}^{total} é a permeabilidade total do íon (Na^+ ou K^+) e P_{ion}^{Vm} a permeabilidade através de canais dependentes de voltagem.

O efeito da PTX sobre a bomba de Na/K, durante a simulação de atividades epileptiformes com o modelo de RODRIGUES (2003), pode ser visualizado no fluxograma da Figura VIII.5. Esse fluxograma representa como são feitos os cálculos da comunicação entre os meios intra- e extracelulares com esse modelo (modificado de RODRIGUES, 2003). Como mostra o bloco em cinza, a simulação da aplicação de PTX tem efeito direto sobre o cálculo da corrente da bomba de Na/K, devido ao seu bloqueio, e sobre o cálculo das correntes de Na^+ e K^+ , através dos canais iônicos, por causa dos aumentos das permeabilidades de Na^+ e K^+ , devido à indução de canais nas enzimas da bomba.

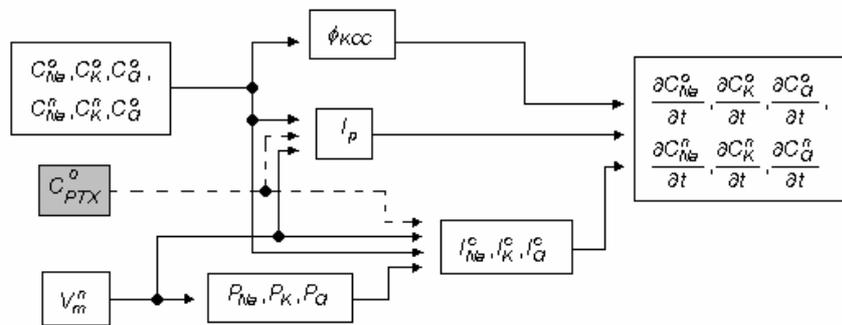


Figura VIII.5 – Inclusão do efeito da PTX no fluxograma para os cálculos da comunicação entre os meios intra e extracelulares durante a simulação das atividades epileptiformes. C_{ion} representa a concentração do íon (Na^+ , K^+ ou Cl^-), C_{PT} é a concentração de PTX extracelular, V_m^n é o potencial transmembranar neuronal, P_{ion} a permeabilidade do íon, I_p a corrente da bomba, ϕ_{KCC} o fluxo do KCC, I_{ion}^c a corrente do íon através dos respectivos canais e os índices i e o representam os meios intra- e extracelular. As linhas pontilhadas e o bloco em realce representam as inclusões dos efeitos da PTX no modelo. (adaptado de RODRIGUES, 2003).

Nos experimentos, a solução de PTX é perfundida durante 1 min e 30 s. A fim de simular essa perfusão, é considerada uma equação diferencial (Equação 8.17), que representa a diluição da solução de PTX, em razão dos volumes do tubo e do compartimento onde as fatias são depositadas na câmara de interface.

$$\frac{\partial [PTX]^o}{\partial t} = \frac{\phi_{sol}}{Vol_{tubo} + Vol_{comp}} ([PTX]^{sol} - [PTX]^o), \quad (8.17)$$

onde ϕ_{sol} (em mL/min) representa o fluxo da solução na câmara de interface, Vol_{tubo} (em mL) é o volume do tubo que conduz a solução até as fatias, Vol_{comp} é o volume do compartimento onde as fatias são depositadas na câmara de interface e $[PTX]^{sol}$ é a concentração de PTX da solução de perfusão.

VIII.2.2 – Parâmetros do modelo e simulações

O sistema de equações foi resolvido utilizando o método das diferenças finitas. Devido ao fato do modelo matemático exigir um grande esforço computacional, por causa do número de mecanismos subcelulares descritos e da necessidade numérica de se utilizar um intervalo de iteração temporal de 1×10^{-5} s, por causa do modelo dos canais induzidos de PTX, foram considerados apenas 11 neurônios dispostos em uma única direção, descrevendo uma linha de neurônios representativos da camada granular do giro denteado (Figura VIII.6). Essa rede de neurônios foi conectada a uma rede extracelular com 13 compartimentos, sendo que os compartimentos 1 e 13 não contêm neurônio e glia, e representam a solução de perfusão.

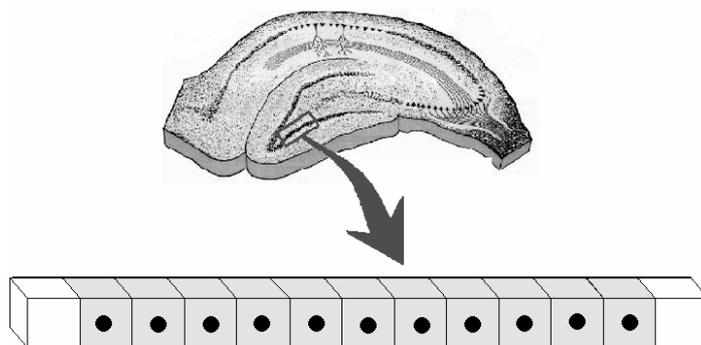


Figura VIII.6 – Descrição da estrutura do modelo. As esferas pretas representam os neurônios, que foram considerados com mesmas condições iniciais e parâmetros iguais. O primeiro e o último compartimentos não contêm neurônios, sendo representativos da solução de perfusão.

As atividades epileptiformes foram induzidas aumentando a concentração extracelular de K^+ , nos dois compartimentos de borda, de 4 para 8 mM. Posteriormente, a aplicação da PTX foi simulada alterando a $[PTX]^o$ para os valores utilizados por VIVAS (2005): 0,0466 nM, 0,0933 nM, 0,4664 nM, 4,6640 nM ou 9,3280 nM.

Na Tabela VIII.1, são apresentados os valores dos parâmetros do modelo matemático para as atividades epileptiformes não-sinápticas. Os parâmetros utilizados para o modelo que descreve o complexo PTX-bomba de Na/K são os mesmos estimados nos capítulos IV-VII.

Tabela VIII.1 – Valores das constantes do modelo computacional para atividades epileptiformes não-sinápticas (RODRIGUES, 2003). \bar{P}_w é a permeabilidade máxima do íon w utilizada para calcular a sua permeabilidade segundo o formalismo de HODGKIN e HUXLEY (1952).

Reação	Taxa da reação	
λ		1,60
$\Delta x = \Delta y = \Delta z$		$2,00 \times 10^{-3}$ cm
D_{Na}		$1,33 \times 10^{-5}$ cm ² /s
D_K		$1,96 \times 10^{-5}$ cm ² /s
D_{Cl}		$2,03 \times 10^{-5}$ cm ² /s
σ		$3,96 \times 10^{-5}$ S.cm ⁻¹
ξ		0,13
K		$5,00$ cm ⁻¹
\bar{P}_{Na}	$1,2 \times 10^{-7}$ cm/s (neurônio)	$1,00 \times 10^{-13}$ cm/s (glia)
\bar{P}_K	$3,6 \times 10^{-8}$ cm/s (neurônio)	$3,20 \times 10^{-11}$ cm/s (glia)
\bar{P}_{KA}	$2,00 \times 10^{-9}$ cm/s (neurônio)	$3,00 \times 10^{-12}$ cm/s (glia)
\bar{P}_{Cl}	$7,50 \times 10^{-10}$ cm/s (neurônio)	$1,20 \times 10^{-9}$ cm/s (glia)
Kd_K^{KCC}		7,34 mM
Kd_{Cl}^{KCC}		91,02 mM
Q_{KCC}		$1,00 \times 10^{-5}$ mmol.s ⁻¹ .cm ⁻²
Kd_K^{NKCC}		2,30 mM
Kd_{Na}^{NKCC}		70,00 mM
Kd_{Cl}^{NKCC}		25,00 mM
Q_{NKCC}		$1,00 \times 10^{-5}$ mmol.s ⁻¹ .cm ⁻²
Kd_K^i		4,831 mM
Kd_{Na}^i		0,856 mM
Kd_K^o		0,094 mM
Kd_{Na}^o		34,70 mM
Kd_{ATP}^i		0,155 mM
Ke_A^o/Ke_A^i		0,012
P_A		$3,00 \times 10^{-7}$ cm.s ⁻¹
τ		$0,04$ cm ⁻¹
η_s^o		500 mM
R		8,314 mV.C/(K.mmol)
F		6,487 C/mmol
T		310,16 K

VIII.3 - Resultados

Considerando todos os neurônios idênticos, representando uma simetria perfeita ao longo de toda a camada granular, com mesmas condições iniciais e parâmetros iguais, a indução de atividades epileptiformes não-sinápticas resultou em atividades cujo potencial extracelular se assemelha a um evento tipo C, exatamente o de menor ocorrência nos registros experimentais (Figura VIII.7A). Como se pode observar, a simulação da ação da PTX sobre atividades epileptiformes resultou na transição das atividades para eventos com características semelhantes às dos eventos, porém com duração muito maior, em acordo com o que foi registrado experimentalmente (Figura VIII.7B).



Figura VIII.7 - Em (A), simulação da ação da PTX provocando a transição das atividades epileptiformes para eventos não-típicos no GD. Em (B), trecho do registro experimental do potencial extracelular que caracteriza a ação da PTX sobre a atividade epileptiforme prolongando de forma excessiva o evento (VIVAS, 2005).

A partir dessa simulação, foi possível levantar os comportamentos das correntes correspondentes ao efluxo de Na^+ pela bomba de Na/K, influxo pelos canais dependentes de voltagem, influxo pelos canais induzidos por PTX e o influxo total de Na^+ (Figura VIII.8). Observa-se que o crescente aumento de Na^+ pelos canais induzidos faz com que o efeito eletrogênico da bomba de Na/K não promova o fechamento em cascata dos canais de Na^+ dependentes de voltagem, como se observa nos quatro primeiros eventos. No último evento, o influxo de Na^+ pelos canais induzidos por PTX, que não são sensíveis a voltagem, chega a um nível tal que o efeito eletrogênico da

bomba de Na/K é anulado pelo efeito desses canais e não ocorre o ponto crítico característico do término do evento.

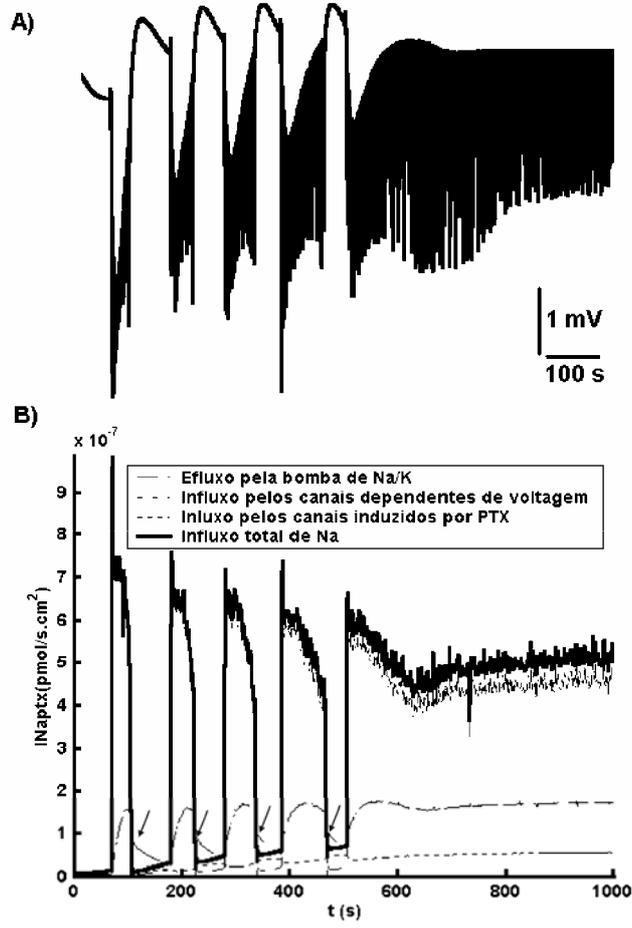
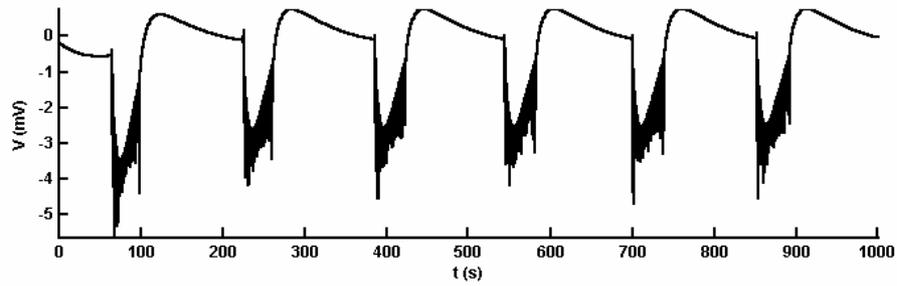


Figura VIII.8 – Efluxos e influxos de Na^+ durante as atividades epileptiformes, sob a ação de PTX. Os pontos críticos são indicados pelas setas e correspondem ao momento em que o influxo de Na^+ pelos canais é menor que o efluxo pela bomba de Na/K.

A mesma simulação, realizada subtraindo-se o efeito da PTX com a criação dos canais induzidos, persistindo apenas o efeito de bloqueio das bombas de Na/K, é apresentada na Figura VIII.9 . A baixa concentração de PTX utilizada (1,752 nM) não tem um efeito bloqueador significativo sobre as bombas de Na/K, o que não oferece alteração significativa sobre a duração dos eventos e nem leva à ocorrência do evento que caracteriza a ação da PTX.

A)



B)

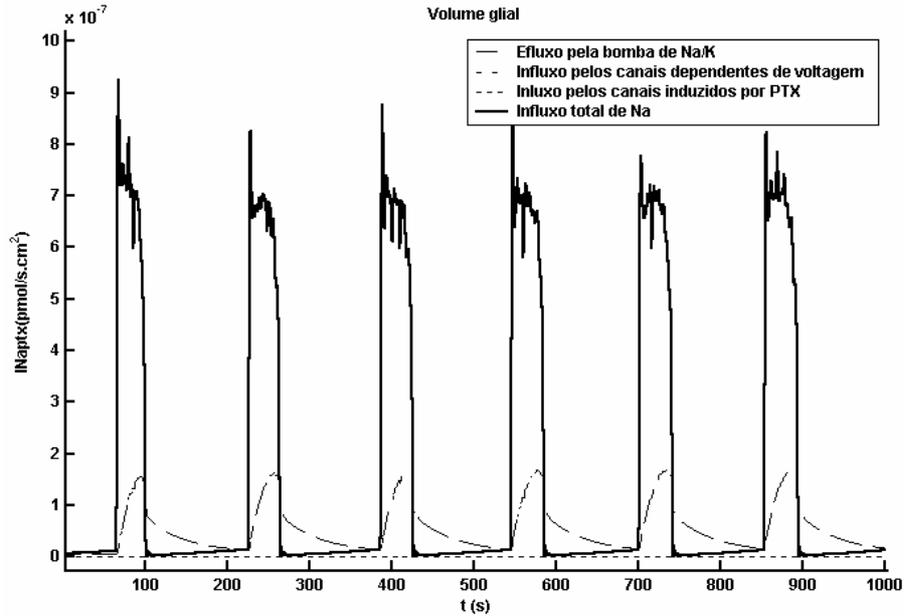


Figura VIII.9 – Em (A), os eventos foram simulados sob as mesmas condições da simulação anterior, porém, foi suspensa a indução de canais pela PTX, figurando, portanto, apenas o efeito bloqueador da bomba de Na/K. Em (B) os influxos de Na^+ durante as atividades epileptiformes sob as mesmas condições. As curvas correspondentes ao influxo pelos canais dependentes de voltagem e influxo total de Na^+ se sobrepõem.

Na Figura VIII.10, a simulação foi realizada sem considerar a criação de canais induzidos por PTX, porém reduzindo o efeito eletrogênico da bomba de Na/K gradativamente. Como pode ser observada, essa redução provoca uma transição para um evento característico da ação da PTX.

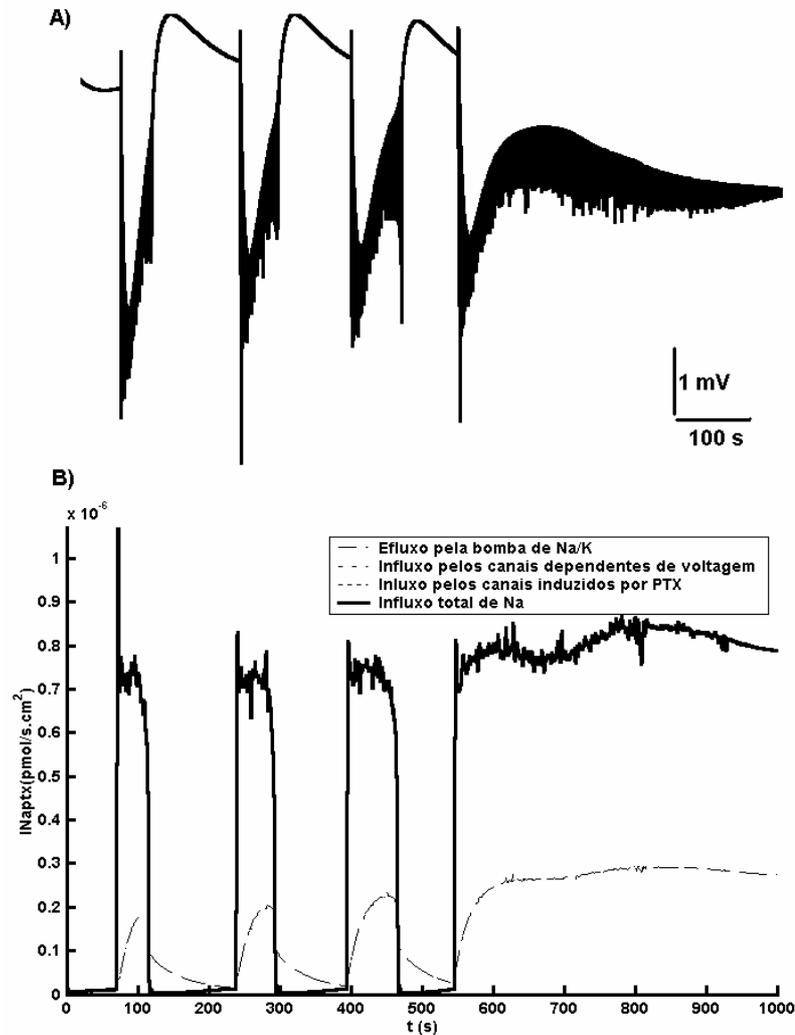


Figura VIII.10 – Em (A), os eventos foram simulados sob as mesmas condições da simulação anterior, porém, com redução gradativa do efeito eletrogênico da bomba de Na/K. Em (B) os influxos de Na⁺ durante as atividades epileptiformes sob as mesmas condições. As curvas correspondentes ao influxo pelos canais dependentes de voltagem e influxo total de Na⁺ se sobrepõem

Nos experimentos de VIVAS (2005), na maioria dos casos (Figura VIII.2), com a aplicação da PTX, ocorre uma grande variação lenta e negativa do potencial elétrico extracelular, indicando um possível acúmulo de K⁺ extracelular e concomitante acúmulo de Na⁺ intracelular. Após diversas tentativas de simular essa situação, alterando parâmetros correspondentes aos diferentes mecanismos subcelulares, verificou-se que somente com a alteração da estrutura da rede de neurônios esse tipo de acúmulo poderia ser reproduzido. Essa alteração da estrutura da rede teve como base alguns achados experimentais que demonstram uma diferença de excitabilidade

neuronal entre as seções infra- e suprapiramidal da camada granular (SCHARFMAN et al, 2002; PEREIRA, 2005). Com o objetivo de simular esses experimentos, o modelo, com 11 neurônios, foi ajustado de forma que apenas os neurônios nos compartimentos em cinza escuro (Figura VIII.11) apresentam eventos epileptiformes sob alta concentração extracelular de K^+ (8 mM). Para que os outros neurônios não entrassem em atividade, suas permeabilidades máximas de K^+ , nos canais dependentes de voltagem, foram aumentadas de 36×10^{-8} para 80×10^{-8} cm/s. Além disso, a fim de mimetizar o efeito de um número maior de neurônios, as correções dos volumes celulares dos neurônios pertencentes aos compartimentos em cinza claro foram feitas mais sensíveis aos gradientes osmóticos (η_s^o foi reduzido de $9,31 \times 10^{-10}$ para $2,79 \times 10^{-10}$ mmol), permitindo um maior acúmulo de K^+ extracelular.

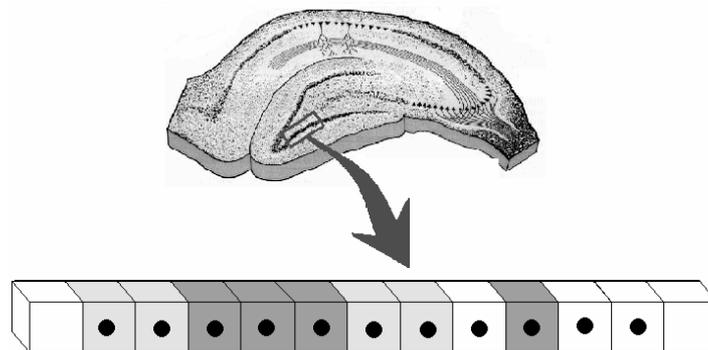


Figura VIII.11 – Descrição da estrutura do modelo. As esferas pretas representam os neurônios.

Nos compartimentos em cinza escuro estão os neurônios que apresentam eventos epileptiformes sob alta concentração extracelular de K^+ (8 mM). Os volumes celulares dos neurônios nos compartimentos em cinza claro, foram considerados podendo variar mais para permitir um maior acúmulo de K^+ extracelular. Os volumes dos neurônios nos compartimentos em branco não variam. O primeiro e o último compartimentos não contém nenhum neurônio, sendo representativos da solução de perfusão.

Inicialmente, foi realizada uma simulação da atividade epileptiforme sem aplicação de PTX (Figura VIII.12A) e traçadas as curvas do influxo de Na^+ correspondentes (Figura VII.12B). A simulação da aplicação de PTX resultou na transição das atividades para eventos em que há um aumento da variação lenta do potencial elétrico e da duração (Figura VIII.13A) reproduzindo os resultados experimentais (Figura VIII.13C). Na Figura VIII.13B, são apresentadas as curvas

correspondentes aos fluxos transmembranares de Na^+ , através da bomba de Na/K e de canais dependentes de voltagem e induzidos por PTX. Nota-se que as curvas correspondentes ao influxo pelos canais dependentes de voltagem e influxo total de Na^+ são muito próximas em comportamento e intensidade. Durante o evento atípico, em que ocorre o aumento do DC do potencial extracelular, observa-se que a bomba de Na/K, apesar de trabalhar com maior intensidade, leva mais tempo para superar o influxo de Na^+ através dos canais iônicos.

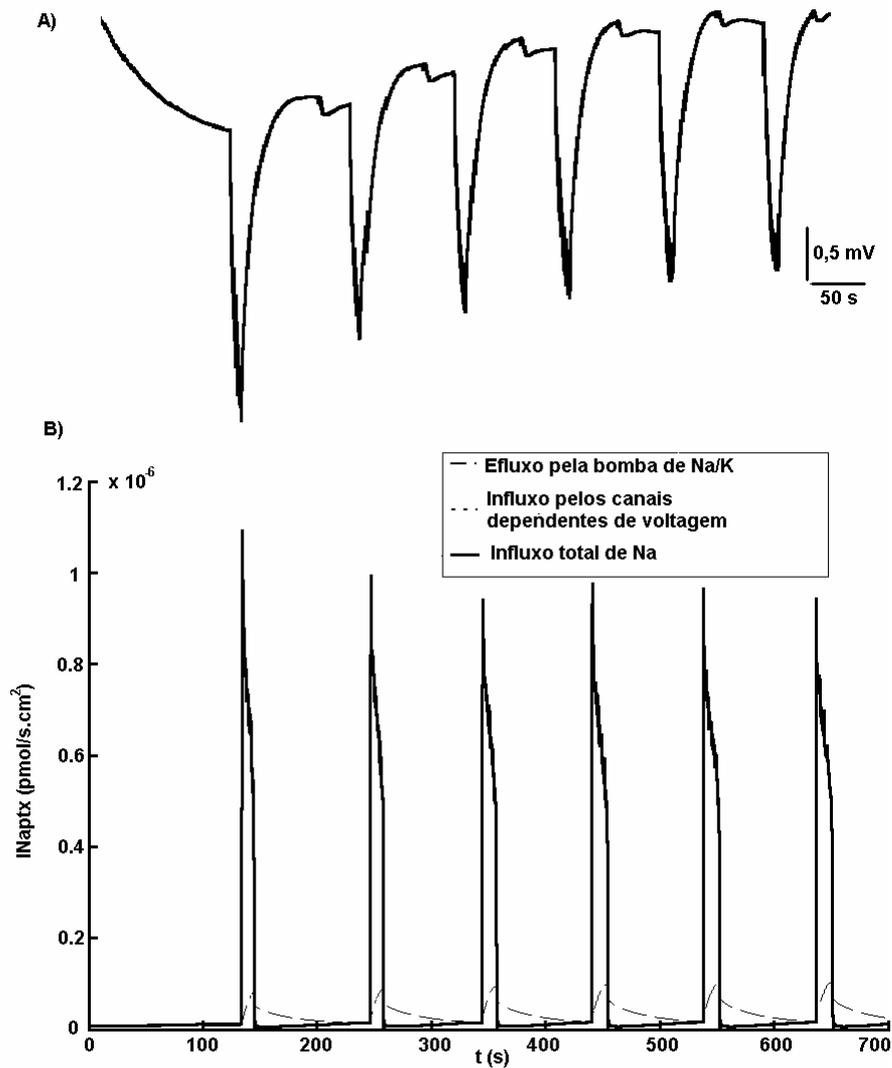


Figura VIII.12 – (A) Simulação do potencial extracelular sem aplicação de PTX. (B) Influxos de Na^+ durante as atividades epileptiformes sob as mesmas condições da simulação (A).

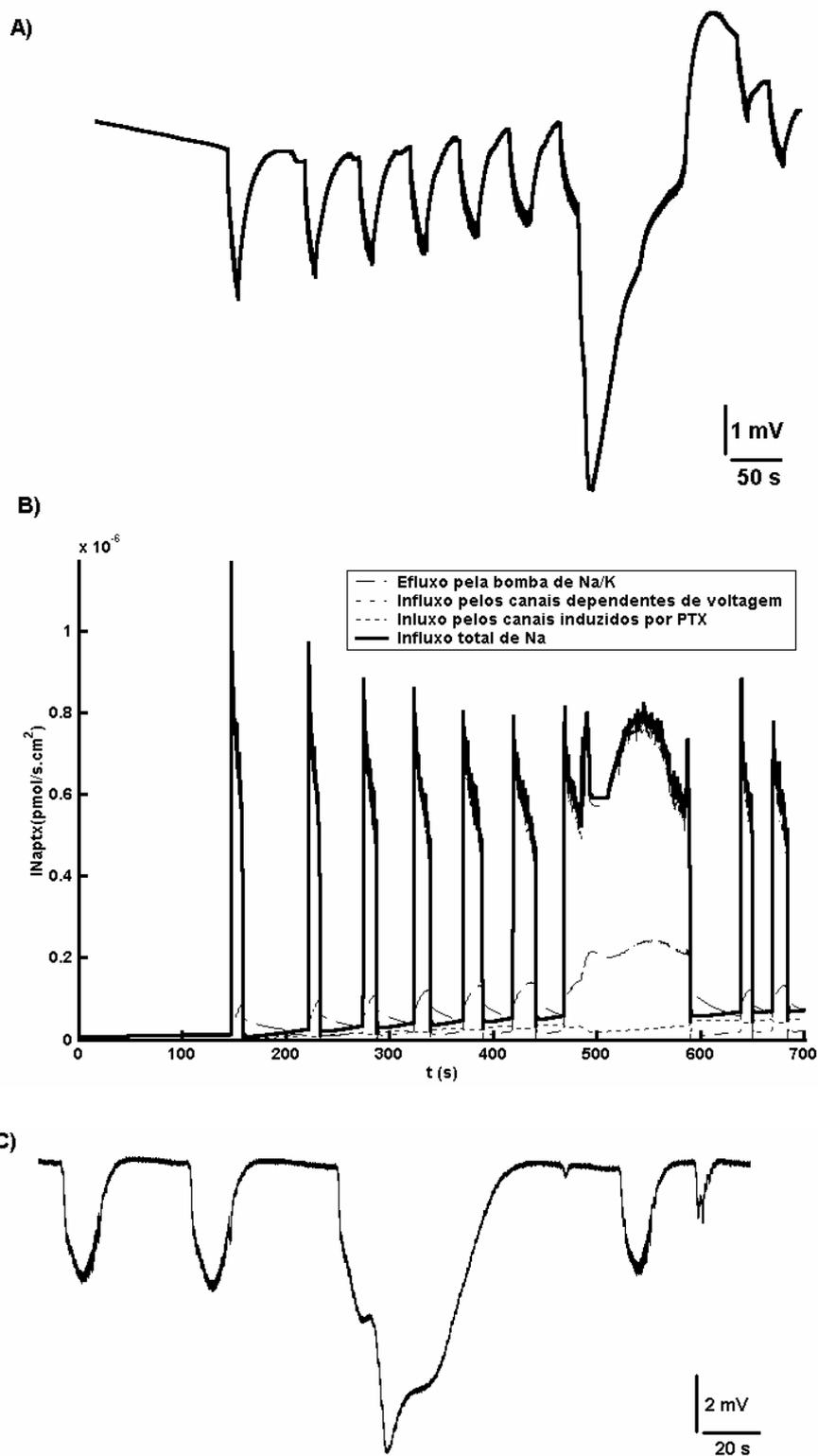


Figura VIII.13 – (A) Simulação do potencial extracelular com perfusão de PTX. (B) Influxos de Na⁺ durante as atividades epileptiformes sob as mesmas condições da simulação (A). As curvas correspondentes ao influxo pelos canais dependentes de voltagem e influxo total de Na⁺ se sobrepõem. Para comparação com (A), em (C) é apresentado um registro experimental do potencial elétrico extracelular com aplicação de PTX.

VIII.4 - Discussão

O estudo do efeito da PTX sobre as atividades epileptiformes demonstrou a ação complexa dessa toxina. Analisando seus dados experimentais, VIVAS (2005) observou que os parâmetros do potencial elétrico extracelular (amplitude da componente DC, duração do evento, duração do intervalo entre eventos e contribuição dos *population spikes*) que caracterizam um evento epileptiforme típico (tipo A, B ou C) não apresentam alterações em função da aplicação da PTX. Como sugerem as simulações, a condutância dos canais induzidos aumenta muito lentamente e, portanto, inicialmente, as correntes iônicas através desses canais são muito pequenas comparadas com aquelas através dos canais dependentes de voltagem e das bombas de Na/K, de tal modo que alterações sobre os parâmetros dos eventos, enquanto com morfologias típicas, são muito pouco claras. As simulações indicam que a transição para os eventos atípicos se dá de forma abrupta. A partir do momento em que as correntes Na⁺ dos canais induzidos de PTX, os quais não são dependentes de voltagem, compensam a ação do efeito eletrogênico, que reduz a permeabilidade dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem, o ponto crítico deixa de ser atingido como se esperaria para um caso típico, resultando em um sinal extracelular cuja morfologia não se enquadra dentro das observadas em experimentos controle. Daí a denominação evento atípico.

Como mostrado na Figura VIII.2, dois grupos de eventos atípicos resultam da aplicação de PTX. As simulações revelam que para eventos de redes mais uniformes, que resultam em alto nível de sincronismo de toda a rede, não ocorre a acumulação de K⁺ extracelular, uma vez que não figura no potencial extracelular aumento significativo do nível DC do sinal, com concomitante redução dos *population spikes*. Nesse caso, as simulações dos influxos e efluxos de Na⁺ indicam que para o caso ideal de uma rede perfeitamente homogênea, após a corrente dos canais induzidos de PTX compensar a ação do efeito eletrogênico da bomba de Na/K sobre os canais dependentes de voltagem, estabelece-se um potencial transmembranar que se equilibra em nível de despolarização transmembranar, impedindo que o ponto crítico ocorra. Isso justifica os eventos com duração extremamente longa. Além disso, a simulação da redução do efeito eletrogênico, apresentada na Figura VIII.10, sugere que o efeito fundamental da perfusão com PTX é reproduzido exclusivamente a partir da redução do efeito eletrogênico da bomba de Na/K.

No caso dos eventos atípicos simulados para redes não-homogêneas, com sítios de neurônios, ao longo da camada granular e com diferentes níveis de excitabilidade, os registros extracelulares mostram que ocorre uma acumulação de K^+ extracelular, à qual deve corresponder um aumento de Na^+ intracelular. Os influxos e efluxos de Na^+ simulados mostram que a partir do momento em que o sistema não atinge o ponto crítico, K^+ acumula no meio extracelular, na região de maior excitabilidade, sustentando a despolarização neuronal. Com isso, mais Na^+ é acumulado no meio intracelular, reduzindo o gradiente transmembranar desse íon e, por conseguinte, seu influxo. Adicionalmente, ao acúmulo de K^+ extracelular, sendo esse o principal inibidor fisiológico do efeito da toxina, corresponde uma redução da permeabilidade de Na^+ dos canais induzidos pela PTX, contribuindo, mais uma vez, para a redução do influxo desses íons através desses canais induzidos. Assim, se através dos canais induzidos de PTX passam menos Na^+ , logo, as correntes desses canais que se opunham à ação do efeito eletrogênico da bomba de Na/K sobre os canais de Na^+ dependentes de voltagem decrescem e o efeito eletrogênico consegue fazer o sistema atingir o ponto crítico, finalizando o evento. É interessante observar que, como as correntes de Na^+ dos canais induzidos de PTX decrescem a níveis comparáveis aos anteriores aos eventos atípicos, então, como mostram os registros experimentais e reforçam as simulações, após a ocorrência de um evento atípico há a intermitência de eventos típicos.

Capítulo IX – Conclusão

O modelo de reações proposto para o complexo PTX-bomba de Na/K com estrutura similar ao modelo de Albers-Post, permitiu investigar o efeito da PTX sobre a Na^+/K^+ -ATPase. Todas as reações desse modelo estão representadas esquematicamente na Figura IX.1. Utilizando um modelo matemático derivado a partir desse modelo de reações, foi possível simular manobras experimentais da literatura, contribuindo para a elucidação das interações da PTX com a bomba de Na/K e das interferências dos ligantes fisiológicos da bomba sobre essas interações. Na ausência do ATP, segundo o modelo, as oclusões de ambos Na^+ e K^+ no complexo PTX-bomba contribuem para o bloqueio de canais. Porém, o complexo apresenta uma afinidade menor para a oclusão de Na^+ e, no caso do K^+ , a sua oclusão aumenta a taxa de dissociação da toxina. A presença de ATP no meio intracelular, causando a fosforilação da enzima e/ou reagindo com sítios de baixa afinidade, aumentam o efeito tóxico da PTX. Pois, nessa situação, ocorrem transições para subestados (PTXE^* e $\text{PTXATP}_b\text{E}^*$) em que a enzima não pode ser fosforilada e a afinidade à toxina é aumentada. Além disso, as formações desses dois subestados reduzem o efeito inibitório do K^+ sobre os canais induzidos, reduzindo a afinidade da enzima à oclusão desse íon. Mesmo nessa situação em que há a redução de sua afinidade, o K^+ continua sendo o principal inibidor fisiológico do efeito da toxina, pois, acelera o fechamento desses canais e aumenta a taxa de dissociação da PTX. O modelo sugere ainda que o principal mecanismo envolvido na cinética do efeito inibidor do K^+ sobre a atuação da PTX é a sua oclusão em canais induzidos em que o ATP permanece ligado a sítios de alta afinidade, pois, esse subestado apresenta alta afinidade aos íons K^+ , a partir da face extracelular, e a oclusão desses íons impede que ocorra a fosforilação do complexo PTX-bomba.

O modelo proposto, além de contribuir para elucidação das interações entre a PTX e a bomba de Na/K, pode ser usado para estudar o efeito dessa toxina em tecidos celulares, onde a atuação da Na/K-ATPase é fundamental. No presente trabalho, o modelo foi usado para investigar o efeito da PTX durante a indução de atividade epileptiformes não-sinápticas, no giro denteado do hipocampo de ratos. As simulações, comparadas aos dados experimentais, evidenciam a importância da bomba de Na/K para o término dos eventos epileptiformes. Segundo o modelo de atividades epileptiformes, a

corrente produzida pela atividade da bomba de Na/K induz uma componente de polarização da célula neuronal, a qual interfere sobre os canais de Na⁺ dependentes de voltagem, reduzindo suas permeabilidades. Os canais induzidos pela PTX não são dependentes de voltagem e, portanto, são insensíveis ao efeito eletrogênico da bomba. Como resultado, com a aplicação da PTX, ocorrem eventos epileptiformes atípicos, de longa duração, os quais também podem ser simulados interferindo exclusivamente sobre o efeito eletrogênico da bomba. Adicionalmente, as simulações, em comparação com os dados experimentais da aplicação de PTX, mostraram que os eventos atípicos, de maior ocorrência nesse tipo de manobra, podem ser associados a acumulações de K⁺ no extracelular, com concomitante acúmulo de Na⁺ intracelular. Esses acúmulos são causados por uma distribuição não-homogênea de excitabilidade neuronal ao longo da camada granular.

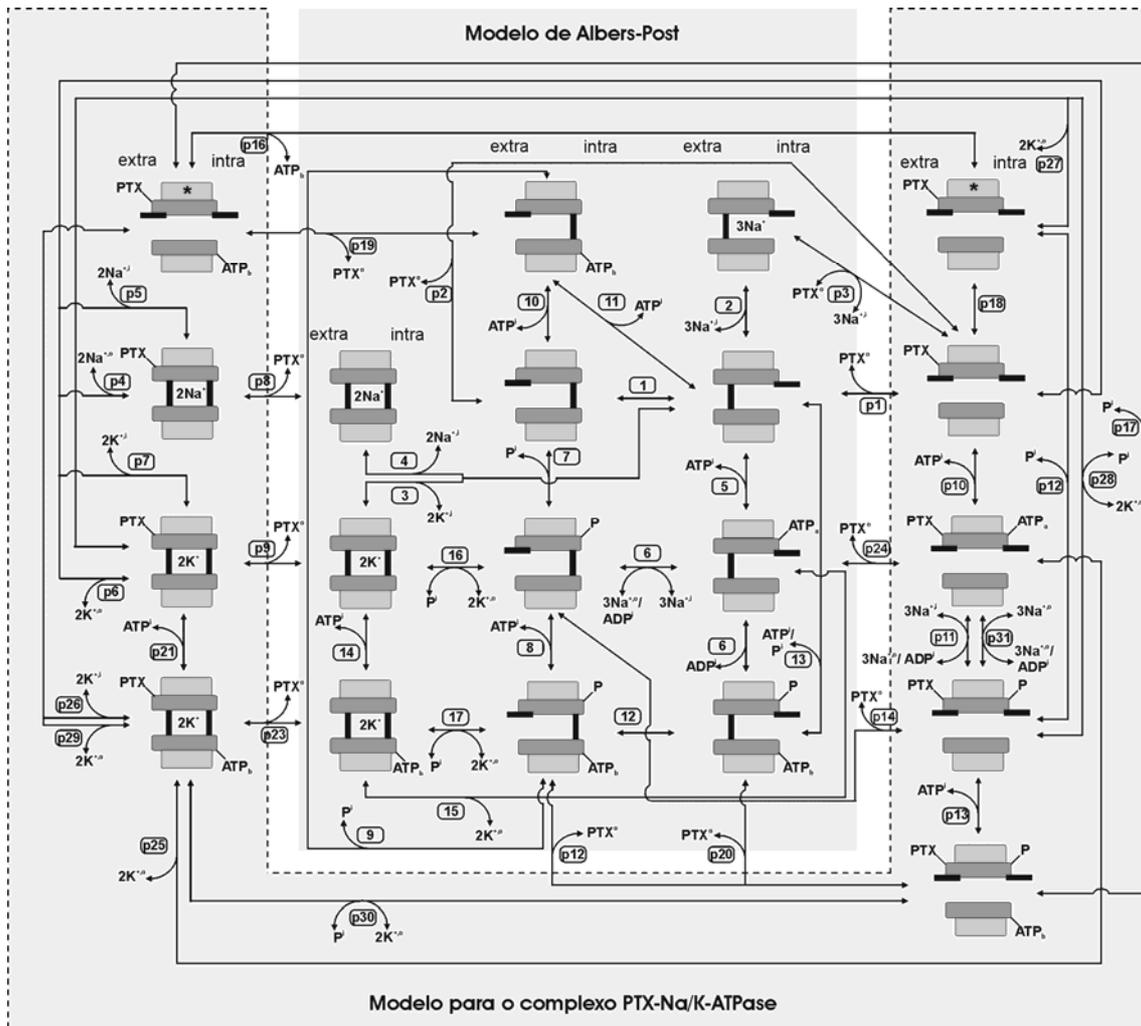


Figura IX.1 – Modelo de reações proposto para explicar a atuação da PTX sobre a bomba de Na/K.

Trabalhos publicados

- RODRIGUES, A. M.; ALMEIDA, A. C. G. de; INFANTOSI, A. F. C.; DUARTE, M. A., 2004, “A Bomba de Na/K como Canal Iônico: Modelo Matemático”. In: *Anais do III Congresso Latinoamericano de Engenharia Biomédica*, v. 5, pp. 1479-1482., João Pessoa, Paraíba, Setembro.
- RODRIGUES, A. M.; ALMEIDA, A. C. G. de; INFANTOSI, A. F. C.; DUARTE, M. A., 2006, “Efeito Bloqueador do K^+ sobre canais fosforilados induzidos pela Palitoxina: modelo e simulação”. In: *Anais III do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, v. 01, pp. 1455-1458, São Pedro, São Paulo, Setembro.
- RODRIGUES, A. M.; ALMEIDA, A. C. G. de; INFANTOSI, A. F. C.; DUARTE, M. A., 2006, “Interações entre K^+ e o complexo Palitoxina-Bomba de Na/K”. In: *Anais III do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, v. 01, pp. 1435-1438, São Pedro, São Paulo, Setembro.
- RODRIGUES, A. M., ALMEIDA, A. C. G., INFANTOSI, A. F. C., DUARTE, M. A., TEIXEIRA, H. Z. 2007. “Modelo e simulação das interações entre K^+ e o complexo palitoxina-bomba de Na/K”. In: *Anais da XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental*, v. 01, resumo nº 50.006, Águas de Lindóia, São Paulo, Agosto.
- RODRIGUES, A. M., ALMEIDA, A. C. G., INFANTOSI, A. F. C., TEIXEIRA, H. Z., DUARTE, M. A., 2007, “Model and simulation of Na^+/K^+ pump phosphorylation in the presence of palytoxin”. *Computational Biology and Chemistry*, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2007.08.001.
- RODRIGUES, A. M., ALMEIDA, A. C. G., INFANTOSI, A. F. C., TEIXEIRA, H. Z., DUARTE, M. A., 2007, “Investigating the potassium interactions with the palytoxin induced channels in Na^+/K^+ pump”. *Computational Biology and Chemistry*, submetido para publicação.
- RODRIGUES, A. M., ALMEIDA, A. C. G., INFANTOSI, A. F. C., TEIXEIRA, H. Z., DUARTE, M. A., 2007, “Effect of Palytoxin on the Sodium-Potassium Pump: Model and Simulation”. *Physical Review E*, submetido para publicação.

Referências Bibliográficas

- ALBERS, R. W., FAHN, S., KOVAL, G. J., 1963, "The role of sodium ion in the activation of electrophorus electric organ adenosine triphosphatase", *Biochemistry*, v. 50, pp. 474-481.
- ALMEIDA, A.C., TEIXEIRA, H.Z., DUARTE, M. A., INFANTOSI, A.F.C., 2004, "Modeling extracellular space electrodiffusion during Leão's spreading depression", *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, v. 51, pp. 240-458.
- APELL, H. J., SCHNEEBERGER, A., SOKOLOV, V. S., 1998, "Partial reactions of the Na,K-ATPase: kinetic analysis and transport properties", *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, v. 643, pp. 235-245.
- APELL, H. J., 2001, "How do P-type ATPases transport ions?", *Bioelectrochemistry*, v. 63, n. 1-2, pp. 149-156.
- APELL, H. J., KARLISH, S. J., 2001, "Functional properties of Na,K-ATPase, and their structural implications, as detected with biophysical techniques", *J. Membr. Biol.*, v. 180, pp. 1-9.
- APELL, H. J., 2004, "How do P-type ATPases transport ions?", *Bioelectrochemistry*, v. 976, pp. 31-40.
- ARTIGAS, P., GADSBY, D. C., 2002, "Ionic channel-like properties of the Na⁺/K⁺ pump", *Ann NY Acad Sci*, v. 976, pp. 31-40.
- ARTIGAS, P., GADSBY, D. C., 2003a, "Na⁺/K⁺ pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels", *Proc. Natl. Acad Sci.*, v. 100, n. 2, pp. 501-505.
- ARTIGAS, P., GADSBY, D. C., 2003b, "Ion occlusion/deocclusion partial reactions in individual palytoxin modified Na/K pumps", *Ann NY Acad Sci.*, v. 986, pp. 116-126.
- ARTIGAS, P., GADSBY, D. C., 2004, "Larger diameter of palytoxin-induced Na/K pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands", *J. Gen. Physiol.*, v. 123, n. 4, pp. 357-376.

- ARTIGAS, P., GADSBY, D.C., 2006, "Ouabain affinity determining residues lie close to the Na/K pump ion pathway". *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* v. 103, pp.12613–12618.
- BEUAGÉ, L., Di POLO, R., 1981, "The effects of ATP on the interactions between monovalent cations and the sodium pump in dialysed squid axons", *J. Physiol.*, v. 314, pp. 457-480.
- BEUAGÉ, L., 2001, "Breakdown of Na⁺/K⁺-exchanging ATPase phosphoenzymes formed from ATP and from inorganic phosphate during Na⁺-ATPase activity", *Eur. J. Biochem.*, v. 268, n. 22, pp. 5627-5632.
- BRAND, S. C., WHITTAM, R., 1985, "The activation of the sodium pump in pig red blood cells by internal and external cations", *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 845, n. 2, pp. 139-150.
- CAMPOS, M., BEAUGÉ, L., 1992, "Effects of magnesium and ATP on pre-steady-state phosphorylation kinetics of the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase", *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1105, n. 1, pp. 51-60.
- CAMPOS, M., BEAUGÉ, L., 1994, "Na⁽⁺⁾-ATPase activity of Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase. Reactivity of the E2 form during Na⁽⁺⁾-ATPase turnover", *J. Biol. Chem.*, v. 269, n. 27, pp. 18025-18036.
- CARVALHO, R. S., 2003, *Transições Espontâneas de Burstings Epileptiformes para Depressão Alastrante*. Dissertação de M. Sc., UFSJ, São João del-Rei, MG, Brasil".
- CHHATWAL, G. S., HESSLER, H. J., FHABFRMANN, E., 1983, "The action of palytoxin on erythrocytes and resealed ghosts. Formation of small nonselective pores linked with Na⁺,K⁺-ATPase", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 323, pp. 261-266.
- CORNELIUS, F., 1999, "Rate determination in phosphorylation of shark rectal Na,K-ATPase by ATP: temperature sensitivity and effects of ADP", *Biophys. J.*, v. 77, n. 2, pp. 934-942.
- FORBUSH III, B., 1987, "Rapid release of ⁴²K and ⁸⁶Rb from an occluded state of the Na,K-pump in the presence of ATP or ADP", *J. Biol. Chem.*, v. 262, n. 23, pp. 11104-11115.

- FENDLER, K., GRELL, E., BAMBERG, E., 1987, "Kinetics of pump currents generated by the Na⁺,K⁺-ATPase", *FEBS Lett.*, v. 224, n. 1, pp. 83-88.
- FRELIN, C., VAN RENTERGHEM, C., 1995, "Palytoxin. Recent electrophysiological and pharmacological evidence for several mechanisms of action", *Gen. Pharmacol.*, v. 26, n. 1, pp. 33-37.
- GARAY, R. P., GARRAHAN, P. J., 1973, "The interaction of sodium and potassium with the sodium pump in red cells", *J. Physiol.*, v. 231, n. 2, pp. 297-325.
- GLITISCH, H. G., 2001, "Electrophysiology of the Sodium-Potassium-ATPase in Cardiac Cells", *Physiol. Rev.*, v. 81, pp. 1791-1826.
- GRELL, E., LEWITZKI, E., UEMURA, D., 1988, "Interaction between palytoxin and purified Na, K-ATPase", *Prog. Clin. Biol. Res.*, v. 268B, pp. 293-400.
- HANSEN, P. S., BUHAGIAR, K. A., KONG, B. Y., *et al.*, 2002, "Dependence of Na⁺-K⁺ pump current-voltage relationship on intracellular Na⁺, K⁺, and Cs⁺ in rabbit cardiac myocytes", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v. 283, n. 5, pp. C1511-C1521.
- HABERMANN, E., 1989, "Palytoxin acts through Na⁺, K⁺-ATPase", *Toxicon*, v. 27, n. 11, pp. 1171-1187.
- HARMEL, N., APELL, H.J., 2006, "Palytoxin-induced effects on partial reactions of the Na,K-ATPase". *J. Gen. Physiol.* v.128, pp. 103-108
- HEYSE, S., WUDDER, I., APELL, H. J., *et al.*, 1994, "Partial reactions of the Na,K-ATPase: determination of rate constants", *J. Gen. Physiol.*, v. 104, n. 2, pp. 197-240.
- HILGEMANN, D. W., 2003, "From a pump to a pore: how palytoxin opens the gates", *Toxicon*, v. 100, n. 2, pp. 386-388.
- HILLE, B., 1992, "Elementary Properties of Ions Solution". In: *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd ed., chapter 10, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- HIRSH, J. K., WU, C. H., 1997, "Palytoxin-induced single-channel currents from the sodium pump synthesized by in vitro expression", *Toxicon*, v. 35, n. 2, pp. 169-176.

- HOBBS, A. S., ALBERS, R. W., FROEHLICH, J. P., 1980, "Potassium induced changes in phosphorylation and dephosphorylation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase observed in the transient state", *J. Biol. Chem.*, v. 255, n. 8, pp. 3395-3402.
- HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F., 1952, "A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction in Nerve", *J. Physiology*, v. 117, pp. 500-544.
- HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D., 1955, "Active transport of cations in giant axons from sepia and loligo", *J. Physiol.*, v. 128, pp. 28-60.
- HOLMGREN, M., WAGG, J., BEZANILLA, F., *et al.*, 2000, "Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by Na⁺/K⁺-ATPase", *Nature*, v. 403, pp. 898-901.
- HORISBERGER, J. D., 2004, "Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump", *Physiology*, v. 19, pp. 377-387.
- ISHIDA, Y., TAKAGI, K., TAKAHASHI, M., *et al.*, 1983, "Palytoxin isolated from marine coelenterates. The inhibitory action on (Na,K)-ATPase", *J. Biol. Chem.*, v. 258, n. 13, pp. 7900-7902.
- ICHIDA, K., IKEDA, M., GOTO, K., *et al.*, 1999, "Characterization of a palytoxin-induced non-selective cation channel in mouse megakaryocytes", *Jpn. J. Pharmacol.*, v. 81, n. 2, pp. 200-208.
- KOCKSKAMPER, J., AHMMED, G. U., ZIMA, A. V., *et al.*, 2004, "Palytoxin disrupts cardiac excitation-contraction coupling through interactions with P-type ion pumps", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v. 287, n. 2, pp. C527-C538.
- LAU, C. O., TAN, C. H., KHOO, H. E., *et al.*, 1995, "Lophozymus pictor toxin: a fluorescent structural isomer of palytoxin", *Toxicon*, v. 33, n. 10, pp. 1373-1377.
- LAUGER, P., 1979, "A channel mechanism for electrogenic ion pumps", *Biochim. Biophys Acta*, v. 552, n. 1, pp. 143-161.
- MURAMATSU, I., NISHIN, M., KIGOSHI, S., *et al.*, 1988, "Single ionic channels induced by palytoxin in guinea-pig ventricular myocytes", *Br. J. Pharmacol.*, v. 93, n. 4, pp. 811-816.

- MATHIAS, R. T., COHEN, I. S., GAO, J., *et al.*, 2000, "Isoform-specific of the Na⁺-K⁺ pump in heart", *News Physiol. Sci.*, v. 15, pp. 176-180.
- NAKAO, M., GADSBY, D. C., 1989, "[Na] and [K] dependence of the Na/K pump current-voltage relationship in guinea pig ventricular myocytes", *J. Gen. Physiol.*, v. 94, n. 3, pp. 539-565.
- OGAWA, H., TOYOSHIMA, C., 2002, "Homology modeling of the cation binding sites of Na⁺K⁺-ATPase", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 99, n. 25, pp. 15977-15982.
- PATOCKAA, J., STREDAB, L., 2002, "Brief review of natural nonprotein neurotoxins", *Asa News Letter*, v. 16, n. 1, pp. 17-25.
- PELUFFO, R. D., ARQUELLO, J. M., BERLIN, J. R., 2000, "The role of Na,K-ATPase alpha subunit serine 775 and glutamate 779 in determining the extracellular K⁺ and membrane potential-dependent properties of the Na,K-pump", *J. Gen. Physiol.*, v. 116, n. 1, pp. 47-59.
- PIETRZYK, C., GECK, P., HEINZ, E., 1978, "Regulation of the electrogenic (Na⁺ + K⁺)-pump of Ehrlich cells by intracellular cation levels", *Biochim. Biophys. Acta*, v. 513, n. 1, pp. 89-98.
- PINTSCHOVIVUS, J. FENDLER, K., BAMBERG, E., 1965, "Charge translocation by the Na⁺/K⁺-ATPase investigated on solid supported membranes: cytoplasmic cation binding and release", *Biophys. J.*, v. 76, n. 2, pp. 827-836.
- POST, R. L., SEN, A. K., ROSENTHAL, A. S., 1965, "A phosphorylated intermediate in adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport across kidney membranes", *J. Biol. Chem.*, v. 240, pp. 1437-1445.
- POST, R. L., TODA, G., ROGERS, F. N., 1975, "Phosphorylation by inorganic phosphate of sodium plus potassium ion transport adenosine triphosphatase", *J. Biol. Chem.*, v. 250, n. 2, pp. 691-701.
- POST, R. L., HEGYVARY, C., KUME, S., 1972, "Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase", *J. Biol. Chem.*, v. 247, n. 20, pp. 6530-6540.
- RAKOWSKI, R. F., PAXSON, C. L., 1989, "Voltage dependence of Na/K pump current in *Xenopus* oocytes", *J. Membr. Biol.*, v. 106, n. 2, pp. 173-182.

- REDONDO, J., FIEDLER, B., SCHEINER-BOBIS, G., 1996, "Palytoxin-induced Na⁺ influx into yeast cells expressing the mammalian sodium pump is due to the formation of a channel within the enzyme", *Mol. Pharmacol.*, v. 49, n. 1, pp. 49-57.
- REYES, N., GADSBY, D.C., 2006, "Ion permeation through the Na⁺, K⁺-ATPase". *Nature* v. 443, pp. 470-474.
- RODRIGUES, A. M., Modelo eletroquímico para atividades epileptiformes sustentadas por modulações não-sinápticas., Dissertação de M. Sc., FIQUINE/UFSJ, São João del-Rei, Brasil, 2003
- ROSSI, R. C., NORBY, J. G., 1993, "Kinetics of K⁽⁺⁾-stimulated dephosphorylation and simultaneous K⁺ occlusion by Na,K-ATPase, studied with the K⁺ congener Tl⁺. The possibility of differences between the first turnover and steady state", *J. Biol. Chem.*, v. 268, n. 17, pp. 12579-12590.
- SCHEINER-BOBIS, G., 1998, "Ion-transporting ATPases as ion channels", *Naunyn-schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, v. 357, n. 5, pp. 477-482.
- SCHEINER-BOBIS, G., 2002, "The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport", *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, v. 269, n. 10, pp. 2424-2433.
- SCHEINER-BOBIS, G., MEYER, Z. U., HERINGDORF, D., CHRIST M., HABERMANN, E., 1994, "Palytoxin induces K⁺ efflux from yeast cells expressing the mammalian sodium pump", *Mol. Pharmacol.*, v. 45, n. 6, pp. 1132-1136.
- SCHEINER-BOBIS, G., FARLEY, R. A., 1994, "Subunit requirements for expression of functional sodium pumps in yeast cells", *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1193, n. 2, pp. 226-234.
- SCHEINER-BOBIS, G., SCHENEIDER, H., 1997, "Palytoxin-induced channel formation within the Na⁺/K⁺-ATPase does not require a catalytically active enzyme", *Eur. J. Biochem.*, v. 248, n. 3, pp. 717-723.
- SCHNEEBERGER, A., APELL, H. J., 2001, "Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: II. Competition of various cations", *J. Membr. Biol.*, v. 179, n. 3, pp. 263-273.

- SHULL, G. E., SCHWARTZ, A., LINGREL, J. B., 1985, "Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na⁺ + K⁺)ATPase deduced from a complementary DNA", *Nature*, v. 316, pp. 691-695.
- SKOU, J. C., 1957, "The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves", *Biochim. Biophys. Acta*, v. 23, pp. 349-401.
- SOKOLOV, V. S., APELL, H. J., CORRIE, J. E., *et al.*, 1998, "Fast transient currents in Na,K-ATPase induced by ATP concentration jumps from the P3-[1-(3',5'-dimethoxyphenyl)-2-phenyl-2-oxo]ethyl ester of ATP", *Biophys. J.*, v. 74, n. 5, pp. 2285-2298.
- TANG, Y., REED, P., WAGNER, T., *et al.*, 2006, "Comparing sensitivity analysis methods to advance lumped watershed model identification and evaluation", *J. Biol. Chem.*, v. 250, n. 8, pp. 3010-3018. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.*, 3: 3333–3395.
- TANIGUCHI, K., POST, R. L., 1975, "Synthesis of adenosine triphosphate and exchange between inorganic phosphate and adenosine triphosphate in sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase", *J. Biol. Chem.*, v. 250, n. 8, pp. 3010-3018.
- THOMAS, R. C., 1968, "Measurement of current produced by the sodium pump in a snail neuron", *J. Physiol.*, v. 195, n. 2, pp. 495-514.
- TOSTESON, M. T., HALPERIN, J. A., KISHI, Y., TOSTESON, D. C., 1991, "Palytoxin induces an increase in the cation conductance of red cells", *J. Gen. Physiol.*, v. 98, n. 5, pp. 969-985.
- TOSTESON, M. T., SCRIVEN, D. R., BHARADWAI, A. K., *et al.*, 1995, "Interaction of palytoxin with red cells: structure-function studies", *Toxicon*, v. 33, n. 6, pp. 799-807.
- TOSTESON, M. T., THOMAS, J., AMADOTTIR, J., *et al.*, 2003, "Effects of palytoxin on cation occlusion and phosphorylation of the (Na⁺,K⁺)-ATPase", *J. Membr. Biol.*, v. 192, n. 3, pp. 181-189.
- TOYOSHIMA, C., NOMURA, H., TSUDA, T., 2004, "Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues", *Nature*, v. 432, n. 7015, pp. 361-368.

- VALE, C., ALFONSO, A., VIEYTES, M. R., *et al.*, 2006, “Modulation of calcium entry and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by palytoxin”, *J. Neurosci. Res.*, v. 60, n. 2, pp 123-128.
- VALE-GONZALEZ, C., PAZOS, M.J., ALFONSO, A., VIEYTES, M.R. e BOTANA, L.M., 2007, “Study of the neuronal effects of ouabain and palytoxin and their binding to Na,K-ATPases using an optical biosensor”. *Toxicon*, v. 50, pp. 541-552
- VIVAS, P. G., Efeito da hipóxia e da palitoxina sobre a atividade epileptiforme não sináptica no hipocampo, Dissertação de M. Sc., FIQUINE/UFSJ, São João del-Rei, Brasil, 2005.
- XIONG, Z. Q., STRINGER, J. L., 2000, “Sodium Pump Activity, not Glial Spatial Buffering, clears Potassium after Epileptiform Activity Induced in The Dentate Gyrus”, *J. Neurophysiol.*, v. 83, pp. 1443-1451.
- WANG, X., HORISBERGER, J. D., 1997, “The Na,K-pump as a channel. A new approach to the study of the structure-function relationship of a P-type ATPase”, *Ann N Y Acad Sc*, v. 834, pp. 244-250.
- WARD, D. G., CARIERES, J. D., 1998, “Photoinactivation of fluorescein isothiocyanate-modified Na,K-ATPase by 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)8-azidoadenosine 5'-diphosphate. Abolition of E1 and E2 partial reactions by sequential block of high and low affinity nucleotide sites”, *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 23, pp. 14277-14284.