

Seminário Parcial de Acompanhamento e Avaliação

Estrutura, Função e Modulação de Canais Iônicos por Agentes Neuroquímicos

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal

Equipe e instituição:

Werner Treptow (PQ1) - Laboratório de Biologia Teórica e Computacional (**LBTC-UnB**)

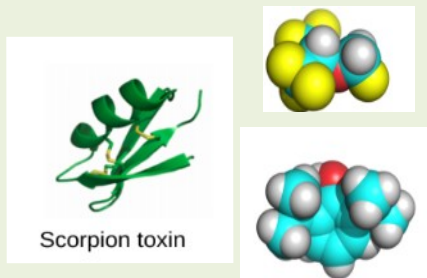
Elisabeth Schwartz (PQ2) - Grupo de Pesquisa em Peptídeos Neuroativos da Peçonha de Artrópodes (**GPPN-UnB**)

Ana Paula Araújo (PQ1) - Grupo de Biofísica Molecular (**GBM-IFSC-USP**)

Matheus Pedrosa (PQ1) - Laboratório de Biotecnologia e Tecnologia Farmacêutica (**LBTF-UFRN**)

Breve contextualização do projeto e relevância do tema

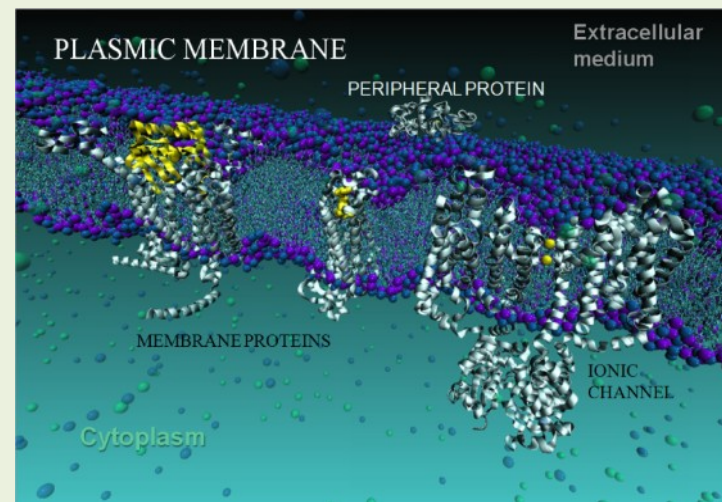
Moduladores



Hipótese
Modulação Alostérica de
Canais Iônicos e
Receptores Neurais

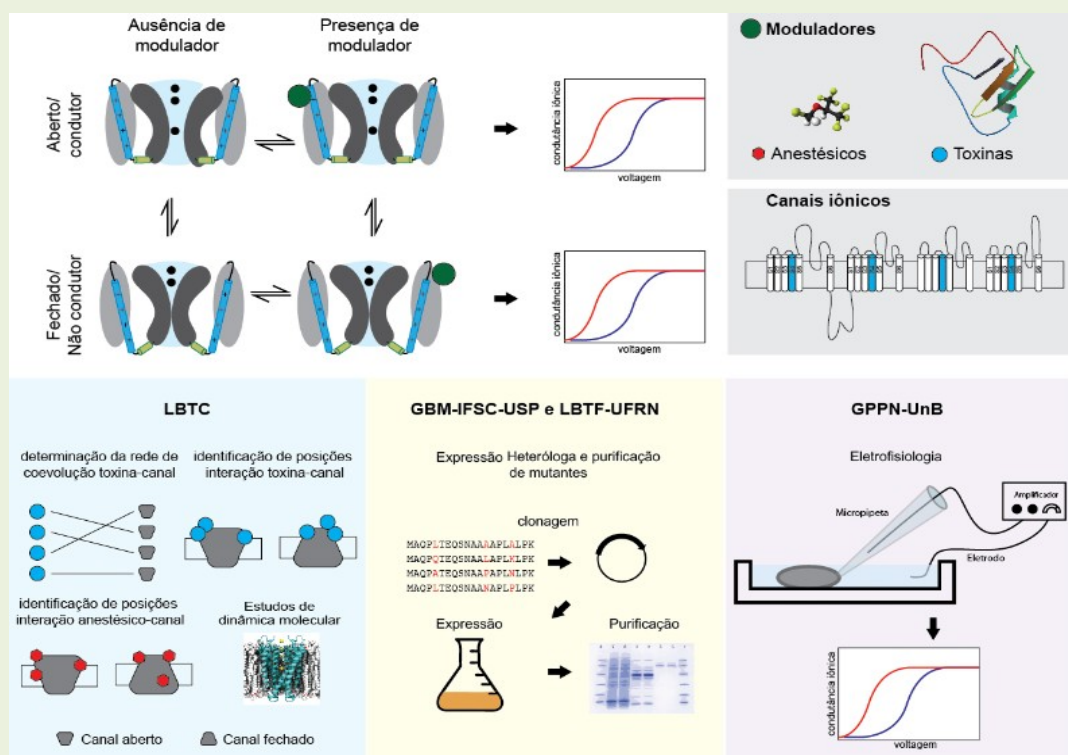


Efeitos na
excitabilidade
elétrica do sistema
nervoso central e
periférico.



Objetivos propostos x realizados

- 1) Modelar o processo de coevolução molecular, afinidade e seletividade em neurotoxinas de escorpião e canais iônicos via novas abordagens de Teoria da Informação, modelagem estatística e validação experimental;
- 2) Identificar sítios de interação molecular entre canais iônicos e neuroquímicos em escala atômica e molecular por meio de ancoragem e simulações de dinâmica molecular;
- 3) Caracterizar a modulação alostérica de canais iônicos por agentes neuroquímicos via novas abordagens teóricas e validação experimental.



Materiais e Métodos

Apesar do desempenho satisfatório da equipe nas atividades do projeto, as etapas de expressão heteróloga de neurotoxinas e purificação não tem sido realizadas com êxito frustrando em parte as metas específicas do objetivo (1) relacionadas à obtenção de proteínas selvagens e mutantes para validação experimental dos modelos teóricos de interação toxina e canal. Diante desse resultado negativo, buscamos expandir a rede de colaborações do projeto, incluindo a participação dos neurocientistas colaboradores Fábio Caixeta (LN-UnB), Katarina Leão (IC-UFRN) e Carlos Pantoja (FAM-UNB) para a realização de novos experimentos que visam conectar os eventos microscópicos observados em escala atômica-molecular com alterações quantificáveis da excitabilidade elétrica em nível neuronal e cerebral.

- Uma nova série de experimentos sofisticados no campo da neurociência foi iniciada para se testar o acoplamento de anestésicos gerais e canais iônicos em células neuronais, utilizando-se de injeções virais *in vivo* e aquisição de dados eletrofisiológicos *ex vivo* → subtração de sinal eletrofisiológico de superexpressão do canal neuronal Kv1.2 na presença e ausência do modulador positivo sevoflurane e controle negativo propofol
- Experimentos de microscopia para resolução temporal e espacial de anestésicos gerais no sistema nervoso central de *Zebrafish* por marcação de cálcio;

Atividades planejadas x realizadas

	ATIVIDADE	Quadrimestre								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Construção da rede de interações toxina-canal	X	X	X						
	Identificação dos aminoácidos do sítio de interação toxina-canal			X	X					
	Dinâmica Molecular de canais iônicos e docking com anestésicos	X	X	X	X					
	Identificação de candidatos de sítios de ligação de anestésicos			X	X	X	X	X		
	Desenho experimental baseado em resultados teóricos	X	X	X	X	X	X	X		
Dificuldades Técnicas →	Clonagem, Expressão e Produção dos moduladores peptídicos dos canais iônicos		X	X	X	X	X			
	Purificação das proteínas da peçonha dos escorpiões	X	X	X	X	X	X			
	Caracterização eletrofisiológica		X	X	X	X	X	X		
Pandemia SARS-COVID →	Injeções virais <i>in vivo</i> e aquisição de dados eletrofisiológicos <i>ex vivo</i>						X	X	X	X
Pandemia SARS-COVID →	Resolução temporal e espacial de anestésicos gerais no sistema nervoso central de Zebrafish						X	X	X	X
	Redação de artigos científicos					X	X	X	X	X
	Relatório de atividades e apresentação de resultados para agência de fomento								X	X
Importação de Equipamento →	Prestação de contas								X	X

Recurso aprovado x gasto

	Recursos Liberados		Recursos Gastos	Saldo
Capital	150.000,00	150.000,00	10.688,00	289.312,00*
Custeio	225.000,00	225.000,00	129.085,35	320.914,60**
Bolsa	0,00	0,00	0,00	0,00
Saldo	375.000,00	375.000,00	139.773,35	610.226,65
Data da situação	05/07/17	28/02/2020	12/04/2021	12/04/2021

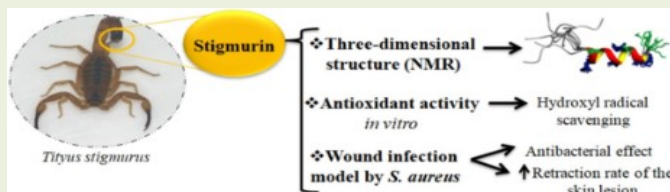
*Despesas de capital previstas com importação de *setup* de Eletrofisiologia já contratada R\$ 289.312,00;

**Despesas previstas com custeio de importação R\$ 75.000,00, com custeio de publicações em andamento R\$ 50.000,00, com custeio de materiais de consumo e insumos para pesquisa R\$ 200.000,00

Resultados parciais alcançados

Objetivo 1) → Por meio de resolução estrutural e ensaios eletrofisiológicos, os peptídeos TsAP-2, Stigmurina e análogos foram identificados com ação i) antiproliferativa em células cancerígenas, ii) antiparasitária sobre as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*; iii) bactericida; iv) antibiofilme, com maior capacidade em promover a inibição da formação do biofilme de *S. aureus*.

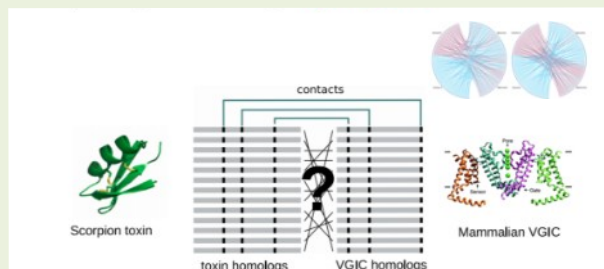
- Subtype Specificity of β -Toxin Tf1a from *Tityus fasciolatus* in Voltage Gated Sodium Channels, *Toxins* (2018);
- NMR three-dimensional structure of the cationic peptide Stigmurin from *Tityus stigmurus* scorpion venom: In vitro antioxidant and in vivo antibacterial and healing activity, *Peptides* (2021).



Objetivo 1) → Quantificação do conteúdo de informação evolutiva, coevolutiva e estocástica armazenada em amino ácidos envolvidos em interação molecular de proteínas e como tais conteúdos de informação podem ser utilizados para se prever interações a partir de alinhamentos múltiplos de sequências.

- Coevolutive, evolutive and stochastic information in protein-protein interactions, *Comp and Struct Biotech J* (2019);
- Trivial and nontrivial error sources account for misidentification of protein partners in mutual information approaches, *Sci Rep* (2021).

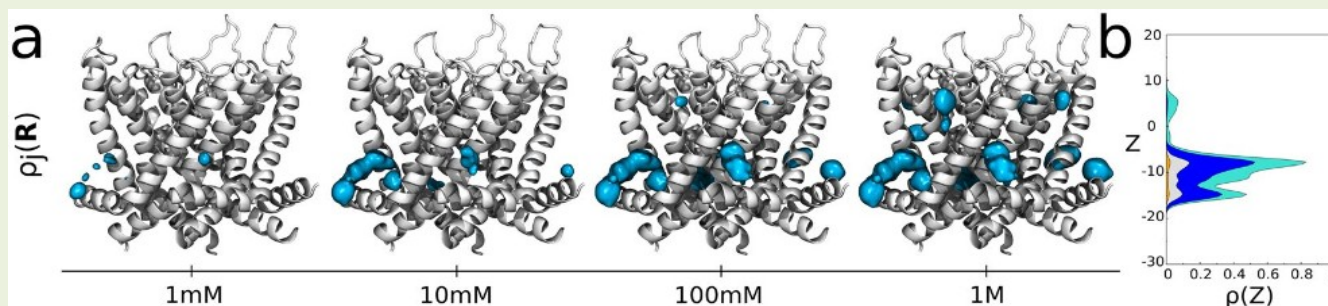
Os desenvolvimentos teóricos publicados nesses trabalhos permitiu o desenvolvimento de um programa computacional que será registrado junto à UnB. Esse programa computacional permitiu resolver modelos de interações entre neurotoxinas e canais iônicos. Com a reconstrução dessa rede de interações, foi possível determinar um conjunto de pares toxina-VSD que representa a melhor solução global para o sistema em termos de afinidade e seletividade. A validação experimental do modelo ainda não foi realizada em decorrência de dificuldades técnicas na expressão heteróloga de formas selvagens e mutantes das neurotoxinas.



Resultados parciais alcançados

Objetivos 2 e 3) → Anestésicos gerais são, em sua maioria, moléculas pequenas de baixa solubilidade, o que leva a ocupâncias múltiplas dos sítios e dificulta a estimativa das afinidades de ligação. Foi necessário, portanto, analisar os cálculos de afinidade por meio de uma formulação mecânica estatística do equilíbrio, levando em consideração a influência dos múltiplos sítios e efeitos de saturação. Nesse sentido, uma formulação teórica avançada foi feita pelo LBTC-UnB para a descrição do problema de ligação em termos de macroestados e projeções espaciais da densidade de probabilidades do ligante.

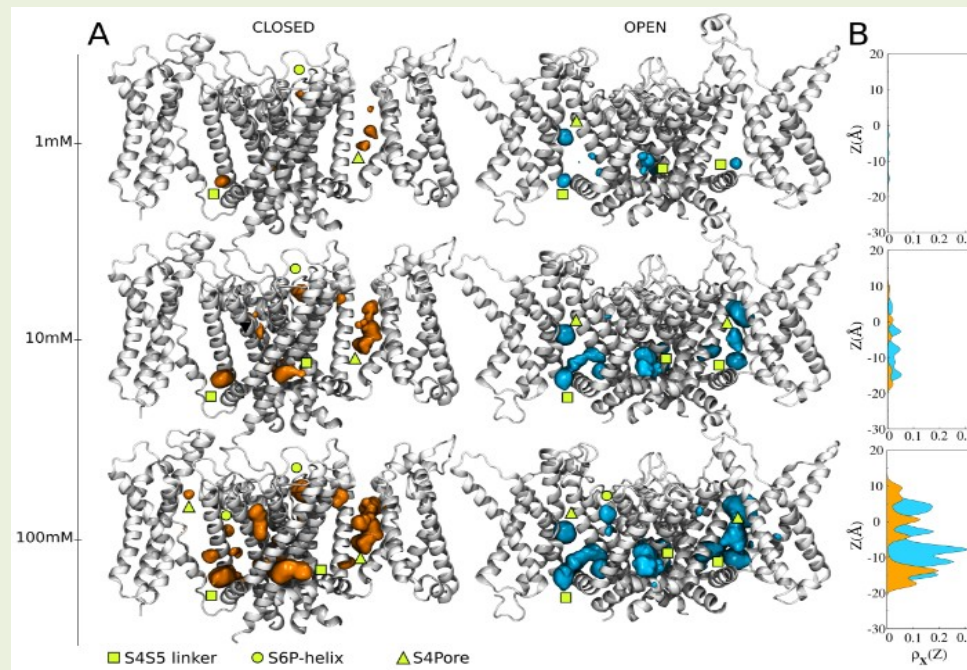
- [Concentration-Dependent Binding of Small Ligands to Multiple Saturable Sites in Membrane Proteins, *Sci Rep* \(2017\).](#)



Resultados parciais alcançados

Objetivos 2 e 3) → Esse resultado teórico nos permitiu estabelecer uma formulação microscópica que pode ser relacionada às medidas experimentais macroscópicas. Utilizando a estrutura atomística do canal de potássio Kv1.2 no estado aberto e fechado para ancoragem molecular do anestésico geral sevoflurano, resolvemos potenciais sítios de ligação no canal. Pela realização de cálculos de perturbação da energia livre (AFEP) estimamos a afinidade do sevoflurano pelos sítios e constatamos que o anestésico se liga nos dois estados conformacionais do canal com uma clara preferência de ligação ao estado aberto do canal explicando o efeito potenciador do sevoflurano.

- Binding of the general anesthetic sevoflurane to ion channels, *Plos Comp Biol* (2018).



Resultados parciais alcançados

Objetivos 2 e 3) → Em continuidade aos desenvolvimentos teóricos, Treptow e colaboradores finalizaram a preparação de um trabalho científico onde se propõe uma nova abordagem para a reconstrução da constante de equilíbrio fisiológica a partir de simulações de dinâmica molecular em altas concentrações. Esse trabalho intitulado *“Reconstruction of Dilute Binding Affinities of Small Ligands from High Concentration Molecular Simulations, PNAS submitted 2021”* permitirá de forma mais adequada e eficiente estender os nossos estudos para uma variedade maior de receptores neuronais e moléculas neuroquímicas. Nesse sentido, outro resultado importante além da proposta original se deu justamente na ampliação dos nossos estudos para se entender a ação molecular do importante sedativo hipnótico Tricloroetanol em canais iônicos, utilizando-se de simulações de Dinâmica Molecular e ensaios eletrofisiológicos. Para isso, um modelo atômico-molecular do Tricloroetanol foi desenvolvido para a realização de simulações de dinâmica molecular via metodologia QM/MM. Conjuntamente às simulações estruturais, estamos realizando em colaboração com a Prof. Elisabeth Schwartz ensaios eletrofisiológicos para a caracterização da ação da molécula contra canais neuronais variados.

- Kiametis *et al.*, Atomistic Model for Simulations of the Sedative Hypnotic Drug 2,2,2-Trichloroethanol, *ACS Omega* (2018).



Objetivos 2 e 3) → Ainda no sentido de estender nossas investigações a outros alvos moleculares relevantes, buscamos no decorrer do projeto entender em escala atômica e molecular o mecanismo de inibição da acetilcolinesterase pelo fármaco donepezil, principal droga utilizada para o tratamento de Alzheimer.

- Donepezil Inhibits Acetylcholinesterase via Multiple Binding Modes at Room Temperature, *J. Chem. Inf. Model.* (2020).

