



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

ALESSA BEMBOM GARCIA

**Busca pelo alvo molecular do peptídeo Ap1a isolado da peçonha da
aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis***

Brasília
2018

ALESSA BEMBOM GARCIA

Busca pelo alvo molecular do peptídeo Ap1a isolado da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz.

Brasília
2018

Dedico este trabalho ao meus pais, meu porto seguro, a base de
tudo, amor incondicional.
Às minhas irmãs, pela parceria e apoio.
Ao Rodrigo, meu Tequinho, coisa linda da Alessa, por tudo que
representa para mim.
Aos amigos da UnB e de vida, por cada momento
compartilhado.
À Dra. Elisabeth, por acreditar em mim e ter proporcionado a
realização deste trabalho.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus pais, por tudo que eles fizeram por mim e por serem absolutamente tudo para mim. Minha mãe é símbolo de força, bondade, sabedoria, além de ter uma incrível habilidade com trabalhos manuais. Meu pai, símbolo de fé, perseverança, amor, além de ter sempre um sorriso gostoso no rosto, independente da situação. Só de pensar em vocês, eu já fico emocionada. Obrigada, obrigada, obrigada. Meu amor por vocês é infinito, portanto adimensional.

Agradeço às minhas irmãs, pela união. Agradeço à Gi, por sempre me ajudar com qualquer coisa tecnológica, pelas inúmeras fotos tiradas e por você nunca cumprir a famosa frase “não me pede mais nada que eu não vou fazer”. Agradeço também à Paola, pelas inúmeras conversas no whatsapp, por te me emprestado tantas roupas ao longo do tempo em que você morava com a gente e por me presentear com tecidos comprados em algumas das suas viagens.

Agradeço ao Rodrigo, por ser afeto, amparo, amor, carinho. Pelos inúmeros domingos de sol e piscina, pelas viagens, shows, cinemas, abraços compartilhados. Por sempre ouvir as minhas tristezas e alegrias, por acreditar em mim, me acalmar e deixar minha vida mais gostosa e mais doce.

Aos meus amigos do laboratório de eletrofisiologia: Daniel, Harry, Beatriz e Carol Orlandi. Em especial, agradeço ao Leandro e ao Diogo, pelos ensinamentos e parceria em dias de fazer *patch*. À Caroline Barbosa, minha “mãezinha” da ciência, por ter me ensinado tanto, inclusive a pipetar. Hehhe. Pela amizade sincera, pelas mensagens, por rir das minhas gáfiás “você pisa na aranha?”. Vibro com a sua felicidade e sei que você é sucesso onde quer que você vá. Agradeço também à Solange Rego, vulgo Solzinha, pelo apoio enorme que você me deu estes anos, pelas conversas que me ajudaram tanto a crescer, pelo carinho que você tem por mim e por ser tão gostoso nossos momentos juntas. Agradeço ao nosso químico, Adolfo, por sempre conferir meus cálculos e por perfumar qualquer ambiente em que ele esteja. Agradeço aos amigos do laboratório de farmacologia, pela alegria compartilhada e pelas várias conversas. Ao Gabriel, pelo companheirismo nos experimentos de cálcio, os quais não foram concluídos, não sendo, portanto, apresentados nesta dissertação.

Agradeço aos meus amigos de vida! Amigos de escola, de dança, de graduação e pós graduação...São tantos os nomes que eu gostaria de mencionar

aqui.... Barroso, Pituca, Thithu, Vitinho, Loiro e Gugalã eu amo vocês!! Biel, Lu, Dj Areia, Cla, Blue, Bruno, obrigada pelas noites regadas de muita dança! Obrigada amigos da UnB! Em especial, a Bianca, Ivy, Dalila e Juan, pelos trabalhos em grupo, amizade, almoços, saídas. Obrigada também por vocês terem contribuído, junto à minha família e à Camila Cardador, na minha decisão de me inscrever no mestrado. O mestrado foi um período de grande aprendizagem, desafios, de muito crescimento e amadurecimento, principalmente, no campo pessoal. De fato, não se faz nada sozinho e a minha experiência compartilhando conhecimento no grupo da eletro foi sensacional.

Agradeço também à minha orientadora, Elisabeth Schwartz, que apesar de ter sido citada depois, não se faz menos importante. Obrigada por permitir que eu fizesse parte do seu time, por confiar plenamente em mim e na minha capacidade, obrigada por cada conversa e por ter sido bem mais que uma orientadora acadêmica para mim.

Por fim agradeço ao Dr. Froylan Lagunas e seus alunos: Daniel Ballezca e Arturo Reyes, da Faculdade de Medicina da *Universidad Autónoma De México* (UNAM), pela colaboração e realização de ensaios eletrofisiológicos em canais de potássio dependentes de voltagem. À Dra. Carolina Barriga, por ter me acolhido em sua casa durante minha estada no México e por ter me apresentado tantas maravilhas do seu país. À Dra. Rita Restano-Cassulini, do Instituto de Biotecnologia da *Universidad Autónoma De México* (UNAM), por doar-nos células SH-SY5Y, possibilitando o início dos trabalhos com canais de cálcio dependentes de voltagem no nosso laboratório. Ao Dr. Jan Tytgat e sua equipe, por conduzir os experimentos em canais de sódio $BgNa_v1$ e $VdNa_v1$. Agradeço também à Universidade de Brasília, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e pelas agências de fomento por possibilitarem a execução deste projeto.

“A verdadeira ignorância não é a ausência de conhecimento,
mas sim o fato de recusar-se a adquiri-lo.”
Karl Popper

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é
perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que
estão certas.”
Carl Sagan

RESUMO

Aranhas possuem uma complexa variedade de componentes em sua peçonha. Dentre esses componentes, os peptídeos neurotóxicos destacam-se por sua capacidade de paralisar a presa por meio da interação com canais iônicos dependentes de voltagem e com receptores glutamatérgicos presentes no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP). Estudos prévios no laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília (UnB) verificaram que a peçonha da aranha caranguejeira *Acanthuscurria paulensis* apresenta cerca de 100 compostos, distribuídos entre intervalos de massa de 635-21.895 Da, sendo a fração com maior abundância, de massa monoisotópica $[M+H]^+ = 5457,79$ Da, denominada Ap1a. Foi evidenciando que o peptídeo Ap1a apresenta 48 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto. O objetivo do presente trabalho é descrever o(s) alvo(s) molecular(es) do peptídeo Ap1a, isolado da aranha *A. paulensis*, através de ensaios eletrofisiológicos em canais de Na^+ e K^+ , bem como analisar seu efeito em ensaios de ligação de $[3,4 \text{ } ^3\text{H}]\text{-L-Glutamato}$. Foram realizadas 48 cromatografias da peçonha bruta de *A. paulensis* para obtenção da fração de interesse, denominada Ap1a, a qual eluiu, aproximadamente, aos 41% de acetonitrila. Para purificação da fração de interesse realizou-se uma recromatografia com gradiente de acetonitrila otimizado. O peptídeo Ap1a, 1 μM , apresentou efeitos em todos os canais de sódio de mamíferos testados: hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, sendo que, ao se avaliar a ativação dos canais testados, o canal hNa_v 1.1 foi o que mais deslocou o potencial de ativação para voltagens mais hiperpolarizadas ($\Delta V_{1/2} = -6,58 \text{ mV} \pm 0,72$) quando em presença da Ap1a. Contudo, ao se analisar as alterações na amplitude da corrente iônica, o canal hNa_v 1.7 apresentou maior efeito ($32,43\% \pm 4,93$). O peptídeo Ap1a à 1 μM não apresentou efeito nos canais de sódio tanto de barata (*Blattella germanica*) quanto de ácaro (*Varroa destructor*). Além disso, nenhum bloqueio ou modulação nos canais potássio de inseto do tipo Shaker, Shab, Shal, Shaw e hK_v 10.1 foi evidenciado. Ensaios de ligação de $[3,4 \text{ } ^3\text{H}]\text{-L-Glutamato}$ foram realizados em triplicata na presença de concentrações crescentes do peptídeo Ap1a (0,01 a 1000 μM), todavia em nenhuma das concentrações utilizadas foi observado alguma diferença estatística significativa na ligação de $[3,4 \text{ } ^3\text{H}]\text{-L-glutamato}$. Com base nisso, o presente estudo contribuiu para a ampliação do conhecimento específico do peptídeo Ap1a, isolado da peçonha da *A. paulensis*, uma das inúmeras aranhas caranguejeiras endêmicas do

Brasil, através da realização de uma ampla investigação eletrofisiológica em diversos canais iônicos dependentes de voltagem, bem como em receptores ionotrópicos de glutamato.

Abstract

Spiders have venom composed by several compounds of different chemical classes, among them potentially neurotoxic peptides, which are essential in the prey paralysis process acting in voltage-dependent ion channels and in glutamatergic receptors present in the central nervous system (CNS) and peripheral nervous system (PNS). Previous studies in the *laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília* (UnB) found that the venom of the tarantula *Acanthuscurria paulensis* presents about 100 compounds, distributed between mass intervals of 635-21,895 Da, being the fraction with greater abundance, of monoisotopic mass $[M + H]^+ = 5457.79$ Da, designated Ap1a. It was also found that the Ap1a has 48 amino acid residues and three disulfide bonds. The aim of the present work is to describe the molecular target (s) of the Ap1a, isolated from the *A. paulensis* tarantula, through electrophysiological recordings on Na^+ and K^+ channels, as well as to analyze its effect in binding assays of $[3,4 \text{ } ^3H]$ -L-glutamate. Ap1a was purified through chromatography of the crude venom followed by rechromatography. Ap1a, 1 μ M, showed effects on all the mammalian sodium channels tested: hNav 1.1, hNav 1.3 and hNav 1.7, and, when evaluating the activation of the channels tested, hNav 1.1 was the one that displaced the most activation potential for more hyperpolarized voltages ($\Delta V_{1/2} = -6.58 \text{ mV} \pm 0.72$) when in the presence of Ap1a. However, when analyzing the changes in the amplitude of the ionic current, hNav 1.7 had a greater effect ($32.43\% \pm 4.93$). Ap1a, 1 μ M, also showed no effect on the sodium channels of both cockroach (*Blattella germanica*) and mite (*Varroa destructor*). In addition, no blockage or modulation in the Shaker, Shab, Shal and Shaw potassium channels was found. $[3,4H]$ -L-Glutamate binding assays were performed in triplicate in the presence of increasing concentrations of Ap1a (0.01 to 1000 μ M), however at any of these concentrations used was no significant statistical difference in binding of $[3,4H]$ -L-glutamate. Based on this, the present study contributed to increase the specific knowledge of Ap1a, isolated from *A. paulensis* venom, one of the numerous endemic tarantula in Brazil, through a broad electrophysiological investigation in several voltage dependent ion channels, as well as in ionotropic glutamate receptors.

Lista de Figuras

- Figura 1. Representação esquemática da subunidade α de um canal Na_v .** Os números em romano identificam os quatro domínios; os segmentos S4, denominados sensores de voltagens, estão representados em verde; os segmentos S5 e S6, formadores de poro, estão em amarelo; em roxo, está representada a alça de inativação do canal. Imagem: Alessa Bembom (adaptada de Yu & Catterall, 2003).24
- Figura 2. Representação esquemática da movimentação dos segmentos S4 dos quatro domínios.** Em vermelho, estão representados os quatro domínios; em rosa, os segmentos S4; em verde, a alça de inativação do canal. Quando todos os segmentos S4 se encontram no meio interno da membrana, o canal se encontra fechado. Quando os segmentos S4 de DI, DII e DIII se encontram no meio externo da membrana, o canal se encontra aberto. A movimentação do segmento S4 de DIV promove um estado momentâneo denominado segunda conformação do poro condutor (S2) e, logo em seguida, o canal encontra-se no estado inativado. Imagem: Alessa Bembom (adaptada de Goldschen-Ohm et al., 2013).24
- Figura 3. Representação esquemática dos possíveis locais de atuação de toxinas de aranhas em canal Na_v .** Em azul, está o sítio 1; em vermelho, o sítio 3; em rosa o sítio 4.26
- Figura 4. *Acanthoscurria paulensis* (Theraphosidae).** Foto: Gustavo Guimarães. .35
- Figura 5. Fluxograma resumido da metodologia deste trabalho.**.....39
- Figura 6. Protocolos de estímulo com pré-pulso de 0 mV (A) e sem pré-pulso (B) utilizados nos ensaios eletrofisiológicos de *Patch-Clamp* no modo *Whole Cell*.**42
- Figura 7. Protocolo de estímulo utilizados nos ensaios eletrofisiológicos de *Two-Microelectrode Voltage Clamp*.**44
- Figura 8. Protocolos de estímulo dos canais Shal, Shaw e Shab (A) e Shaker (B) utilizados nos ensaios eletrofisiológicos de *Patch-Clamp* no modo *Whole Cell*.**46
- Figura 9. Representação esquemática do gradiente descontínuo de sacarose (GDS) antes e após ultracentrifugação. Imagem A:** após a preparação do gradiente, o homogeneizado reconstituído em sacarose 0,32M é cuidadosamente

acrescentado na última camada, indicada pela seta azul. As fases do GDS somente são visíveis quando o tubo é mantido contra a luz, não sendo possível identifica-las nesta foto. **Imagem B:** após a ultracentrifugação, o homogeneizado separa-se em várias frações. A fração entre as camadas de 0,8 e 1,0M de sacarose é constituída de membranas de mielina. As fração entre as camadas 1,0 e 1,2M de sacarose apresenta a FMS, a qual é recolhida com o auxílio de uma pipeta *pasteur*. O sedimento formado no fundo do tubo corresponde as mitocôndrias.

Imagem C: representação esquemática das camadas do homogeneizado organizadas entre as diferentes concentrações de sacarose (0,8M; 1,0M e 1,2M). Imagem cedida por Andreia Biolchi Mayer.....49

Figura 10. Resumo das etapas realizadas durante o ensaio de ligação de [3,4 ³H]-L-glutamato. Imagem cedida por Andreia Biolchi Mayer.50

Figura 11. Cromatografia da peçonha bruta *A. paulensis* por RP-HPLC utilizando-se de 5 mg. O fracionamento foi realizado por meio de uma coluna semipreparativa C18 (phenomenex) com um gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha tracejada, com um fluxo de 1,5 ml/min e absorvância monitorada a 216 nm. Em destaque, a fração Ap1a.51

Figura 12. Purificação de peptídeo Ap1a. O fracionamento foi realizado por meio de uma coluna analítica C18 (phenomenex) com um gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha azul, com um fluxo de 1,0 ml/min e absorvância monitorada a 216 nm. Em destaque, a fração Ap1a.52

Figura 13. Avaliação do grau de pureza do peptídeo de Ap1a. Espectro de massa molecular do peptídeo Ap1a obtido por MALDI TOF/TOF Ultraflex III, observando-se a distribuição monoisotópica do íon com 3 prótons.52

Figura 14. Alinhamento por Clustal Omega da sequência primária do peptídeo Ap1a com outros de peptídeos das peçonhas de aranhas caranguejeiras. AA se refere ao número de resíduos de aminoácidos dos peptídeos; %Id, a porcentagem de identidade dos peptídeos em relação à toxina Ap1a. Espaços (-) foram introduzidos a fim de maximizar o alinhamento. (*) corresponde a resíduos idênticos na mesma coluna; (.), substituições semiconservativas.54

Figura 15. Curva I_{Na-V} x Traços dos registros eletrofisiológicos representando a alteração na amplitude da corrente iônica. Imagens A representam a média \pm erro padrão (n= 8) da relação corrente x voltagem obtida por meio do protocolo de estímulo com pré-pulso em hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, respectivamente.

Bolas pretas representam valores de corrente do controle, quadrados vermelhos representam valores de corrente da toxina Ap1a à 1 μ M. Imagens B representam a alteração da amplitude da corrente iônica obtida por estímulos com pré-pulso a 0 mV nos canais hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, respectivamente. Traços pretos representam a amplitude da corrente iônica do controle e traços vermelhos, a amplitude da corrente iônica da toxina Ap1a à 1 μ M.....56

Figura 16. Relação $\Delta V_{1/2}$ x Abertura do canal obtida por meio do protocolo de estímulo com pré-pulso das diferentes isoformas. Imagens A representam a média \pm erro padrão (n= 8) da relação condutância (pO) x voltagem obtida por meio do protocolo de estímulo com pré-pulso em hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, respectivamente. Bolas pretas representam valores de condutância do controle, quadrados vermelhos representam valores de condutância da toxina Ap1a à 1 μ M, linhas pretas representam a função de Boltzmann para os valores de condutância tanto do controle quanto da toxina. Imagens B representam a abertura do canal obtida por estímulos a -50mV (linha preta), -40mV (linha vermelha) e -30 mV (linha azul) em hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, respectivamente. Imagens à esquerda representam o controle e as imagens à direita representam a abertura do canal após injeção da toxina Ap1a à 1 μ M.....58

Figura 17. Relação Condutância x Voltagem durante a inativação lenta obtida por meio do protocolo de estímulo com pré-pulso nas diferentes isoformas. Imagens representam a média \pm erro padrão (n= 8) da relação condutância x voltagem obtida por meio do protocolo de estímulo com pré-pulso em hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, respectivamente. Bolas fechadas representam valores de condutância do controle, quadrados vermelhos representam valores de condutância da toxina Ap1a à 1 μ M, linhas pretas representam a função de Boltzmann para os valores de condutância tanto do controle quanto da toxina. .60

Figura 18. Traços eletrofisiológicos dos canais de sódio BgNa_v1 e VdNa_v1. Imagens representam os registros da corrente iônica obtida na voltagem de maior corrente (0 mV). Traços pretos representam o controle e traços vermelhos referem-se à toxina Ap1a na concentração de 1 μ M.....69

Figura 19. Traços eletrofisiológicos das diferentes isoformas de canais de potássio. Imagens representam os registros da corrente iônica obtida na voltagem de maior corrente (50 mV para todas as isoformas). Traços pretos

representam o controle e traços vermelhos referem-se à toxina Apl1a na concentração de 1µM.....	70
Figura 20. Representação dos efeitos das concentrações crescentes do peptídeo Apl1a (0,01-1000 µM, em log, na ligação de [3,4 ³H]-L-glutamato a seus receptores. O experimento foi feito em triplicata em dias independentes e o teste estatístico realizado foi regressão linear feita no <i>software</i> GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA).....	73
Figura 21. Potenciais sítios de ligação aos receptores do tipo NMDA. A fim de uma melhor compreensão da estrutura dos receptores do tipo NMDA, apenas o heterodímero NR1/NR2 foi apresentado, apesar de que tais receptores apresentam estrutura tetramérica. Setas brancas indicam os sítios de ligação dos agonistas e antagonistas competitivos, setas laranjas indicam os possíveis locais em que os moduladores alostéricos se ligam de forma não competitiva. Imagem adaptada de Paoletti & Neyton, 2007).....	75
Figura 22. Estrutura de agonistas competitivos dos receptores NMDA. Imagem adaptada de Osborne et al., 2000.	76
Figura 23. Estrutura de antagonistas competitivos dos receptores NMDA. Imagem adaptada de Osborne et al., 2000.	76

Lista de Tabelas

Tabela 1. Isoformas de canais de sódio de mamíferos dependentes de voltagem.

SNC - Sistema Nervoso Central; SNP - Sistema Nervoso Periférico; NSS - Neurônios do Sistema Sensorial; NAP - Neurônios Aferentes Primários; ✓ - Altamente sensível à TTX (bloqueio por baixas concentrações na ordem de nanomolar de TTX); ✗ - Resistente à TTX (bloqueio por altas concentrações na ordem de micromolar de TTX). Tabela adaptada de England & De Groot, 2009.25

Tabela 2. Isoformas de canais de cálcio de vertebrados dependentes de voltagem.

Tabela adaptada de Catterall et al., 2005; Gribkoff, 2006.29

Tabela 3. Isoformas de canais de potássio dependentes de voltagem. Tabela adaptada de Gutman et al., 2005.31

Tabela 4 (Continuação tabela 3). Isoformas de canais de potássio dependentes de voltagem. Tabela adaptada de Gutman et al., 2005.32

Tabela 5. Distribuição dos volumes dos tubos utilizados no ensaio de ligação de [3,4 ³H]-L-glutamato......50

Tabela 6 . Significância da amplitude da corrente iônica x Protocolo de estímulo.

A fim de avaliar se houve diferença significativa entre o protocolo de estímulo com pré-pulso (PP) e sem pré-pulso (SPP), realizou-se análises estatísticas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média ± erro padrão (n= 8). Inibição PP representa o valor de alteração da corrente iônica com pré-pulso e Inibição SPP representa o valor de alteração da corrente iônica sem pré-pulso..57

Tabela 7. Significância $\Delta V_{1/2}$ da ativação x Protocolo de estímulo. A fim de avaliar se houve diferença significativa entre o protocolo de estímulo com pré-pulso (PP) e sem pré-pulso (SPP), realizou-se análises estatísticas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média ± erro padrão (n= 8). AtiPP ($\Delta V_{1/2}$) representa o valor de $\Delta V_{1/2}$ da ativação com pré-pulso e AtiSPP ($\Delta V_{1/2}$) representa o valor de $\Delta V_{1/2}$ da ativação sem pré-pulso.59

Tabela 8. Significância $\Delta V_{1/2}$ da inativação lenta x Protocolo de estímulo. A fim de avaliar se houve diferença significativa entre o protocolo de estímulo com

pré-pulso (PP) e sem pré-pulso (SPP), realizou-se análises estatísticas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média ± erro padrão (n= 8). InatPP ($\Delta V_{1/2}$) representa o valor de $\Delta V_{1/2}$ da inativação lenta com pré-pulso e InatSPP ($\Delta V_{1/2}$) representa o valor de $\Delta V_{1/2}$ da inativação lenta sem pré-pulso.....61

Tabela 9. Parâmetros eletrofisiológicos da ativação nos canais de sódio de mamífero testados executando o protocolo experimental com pré-pulso.

Análises estatísticas foram feitas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média ± erro padrão (n= 8).81

Tabela 10. Parâmetros eletrofisiológicos da ativação nos canais de sódio de mamíferos testados executando o protocolo experimental sem pré-pulso.

Análises estatísticas foram feitas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média ± erro padrão (n= 8).81

Tabela 11. Parâmetros eletrofisiológicos da inativação nos canais de sódio de mamíferos testados executando o protocolo experimental com pré-pulso.

Análises estatísticas foram feitas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média ± erro padrão (n= 8).81

Tabela 12. Parâmetros eletrofisiológicos da inativação nos canais de sódio de mamíferos testados executando o protocolo experimental sem pré-pulso.

Análises estatísticas foram feitas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média ± erro padrão (n= 8).81

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABS	Absorbância
ACN	Acetonitrila
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CA_v	Canal de cálcio dependente de voltagem
CHO	Ovário de hamster chinês
DDH	<i>Disulfide-directed β-hairpin</i>
DRG	Gânglios da raiz dorsal
DUM	<i>Dorsal unpaired median</i>
G_{Na}	Condutância do íon sódio
HEK	Células embrionárias de rim humano
HVA	<i>High-voltage-activated</i> / canais Ca _v dependentes de forte despolarização
ICK	<i>Inhibitory Cystine Knot</i>
ICV	Via de administração intracerebroventricular
I_{NA}	Correntes produzidas pelo íon sódio
K_v	Canal de potássio dependente de voltagem
LVA	<i>Low-voltage-activated</i> / canais Ca _v dependentes de fraca despolarização
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> / dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz
MM	Massa molecular
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> / espectrometria de massas sequencial
M/Z	Relação massa/carga
NA_v	Canal de sódio dependente de voltagem
NMDA	N-metil-D-aspartato
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico

TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	<i>Time of light</i> / tempo de voo
TTX	Tetrodotoxina
VGSC	<i>Voltage gated sodium channel</i> / canal de sódio dependente de voltagem

Tabela de Aminoácidos

AMINOÁCIDO	SÍMBOLO	MASSA MONOISOTÓPICA
Grupos R alifáticos		
Glicina	G	57,021
Alanina	A	71,037
Prolina	P	97,052
Valina	V	99,068
Leucina	L	113,084
Isoleucina	I	113,084
Metionina	M	131,040
Grupos R aromáticos		
Fenilalanina	F	147,068
Tirosina	Y	163,063
Triptofano	W	186,079
Grupos R polares não carregados		
Serina	S	87,032
Treonina	T	101,047
Cisteína	C	103,009
Asparagina	N	114,042
Glutamina	Q	128,058
Grupos R carregados positivamente		
Lisina	K	128,094
Histidina	H	137,058
Arginina	R	156,101
Grupo R carregado negativamente		
Ácido aspártico	D	115,026
Ácido glutâmico	E	129,042

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Aranhas	19
1.2 Composição da Peçonha das Aranhas	20
1.3 Compostos Peptídicos	21
1.3.1 Canais de Sódio Dependentes de Voltagem (Na _v).....	22
1.3.2 Canais de Cálcio e Potássio Dependentes de Voltagem (Ca _v e K _v).....	28
1.3.3 Receptores de Glutamato	33
1.4 <i>Acanthoscurria paulensis</i> Mello-Leitão, 1923	34
1.4.1 Ap1a.....	35
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVO	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. METODOLOGIA	39
4.1 Extração e Quantificação da Peçonha	39
4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC) .39	
4.2.1 Fracionamento da Peçonha Bruta	39
4.2.2 Purificação do Peptídeo Ap1a.....	40
4.3 Espectrometria de Massa	40
4.4 Busca por Similaridade	40
4.5 Ensaios Eletrofisiológicos	41
4.5.1 Ensaios Eletrofisiológicos em Canais de Sódio Dependentes de Voltagem de Mamíferos	41
· Cultura de Células	41
· Experimentos em <i>Whole-cell Patch-Clamp</i>	41
· Protocolo Experimental.....	42
4.5.2 Ensaios Eletrofisiológicos em Canais de Sódio Dependentes de Voltagem de Insetos	43
· Expressão dos Canais de Sódio Dependentes de Voltagem em Oócitos de <i>Xenopus laevis</i>	43

· Experimentos em <i>Two-Microelectrode Voltage Clamp</i>	44
· Protocolo Experimental	44
4.5.3 Ensaios Eletrofisiológicos em Canais de Potássio Dependentes de Voltagem de Insetos	45
· Cultura de Células	45
· Experimentos em <i>Whole-cell Patch-Clamp</i>	45
· Protocolo Experimental	46
4.6 Ensaio de Ligação de [3,4-³H]-L-glutamato	47
4.6.1 Preparo das Membranas Sinápticas	47
4.6.2 Gradiente Descontínuo de Sacarose (GDS)	48
4.6.3 Ensaio de Ligação de [3,4- ³ H]-L-glutamato	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Ensaio Eletrofisiológico em Canais de Sódio Dependentes de Voltagem de Mamíferos	54
5.2 Ensaios Eletrofisiológicos em Canais Iônicos Dependentes de Voltagem de Insetos	69
5.3 Ensaio de Ligação de [3,4-³H]-L-glutamato	72
6. CONCLUSÃO	78
7. PERSPECTIVAS	80
8. ANEXOS	81
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aranhas

Aranhas, pertencentes à ordem Araneae (Arthropoda, Arachnida), são, com exceção dos insetos, os predadores terrestre mais abundantes, com fósseis que datam de 300 milhões de anos, desde o período Carbonífero (Rash & Hodgson, 2001).

Atualmente, estão descritas cerca de 47.027 espécies de aranhas, agregadas em 4.077 gêneros e 113 famílias (<http://www.wsc.nmbe.ch>). A ordem Araneae pode ser dividida em dois grandes grupos: Mesothelae e Opisthothelae. Enquanto os integrantes do grupo Mesothelae apresentam características plesiomórficas, tais como segmentação do opistossoma e a falta de glândulas de peçonha (Haupt, 2003), os Opisthothelae apresentam características apomórficas, como a falta de segmentação do abdômen, a fusão dos gânglios ventrais e a presença de glândulas de peçonha (Coddington, 2005). Os Opisthothelae são subdivididos em Mygalomorphae e Araneomorphae. O primeiro, compreende espécies de médio a grande porte, as quais, com exceção do gênero *Atrax*, não são consideradas perigosas. A maior parte desse grupo é representado pela família Theraphosidae, também conhecida por aranhas caranguejeiras (Corzo & Escoubas, 2003). Já o segundo, apresenta uma enorme variedade de características morfológicas e comportamentais, o que reflete na grande diversidade de espécies que compõem este grupo (Ayoub & Hayashi, 2009), dentre as quais destacam-se os gêneros *Latrodectus*, *Loxosceles* e *Phoneutria*, responsáveis pelos maiores casos de envenenamento no Brasil. Outra diferença é que mигalomorfas apresentam quelíceras que se movimentam paralelamente ao eixo do corpo das aranhas (quelíceras ortognatas), enquanto as araneomorfas apresentam quelíceras que se movimentam perpendicularmente ao eixo do corpo (quelíceras labidognatas) (Foelix, 2011).

Apesar de as aranhas caranguejeiras serem famosas por seu tamanho avantajado, pouco se conhece sobre elas. Das 47.027 espécies já descritas, apenas 963 são da família Theraphosidae (<http://www.wsc.nmbe.ch>). Sabe-se que aranhas caranguejeiras distribuem-se por todo o mundo, e que mesmo tendo uma tendência a se localizarem em áreas tropicais ou semitropicais, também podem ser encontradas em áreas secas ou úmidas, savanas, desertos, florestas. Esta imensa variedade de nichos ecológicos, associada à grande variedade de presas está diretamente

relacionada aos componentes na peçonha (Escoubas & Rash, 2004). Aranhas caranguejeiras são predadores que se alimentam tanto de invertebrados quanto de vertebrados. Essa habilidade de capturar grandes presas sem o auxílio de teias implica não só em força física, mas na rápida e eficiente atuação da peçonha no sistema nervoso central e periférico da presa. Além disso, a capacidade de aranhas caranguejeiras paralisarem grandes vertebrados faz com que a peçonha destas sejam de grande interesse por parte comunidade acadêmica para o estudo de receptores de vertebrados, assim como para o desenvolvimento de novas drogas e pesticidas (Escoubas & Rash, 2004).

1.2 Composição da Peçonha das Aranhas

Aranhas possuem uma extraordinária complexidade química em sua peçonha, apresentando desde sais inorgânicos, nucleotídeos, aminoácidos livres, acilpoliaminas, neurotransmissores, até peptídeos e proteínas com múltiplos domínios em sua composição (Jackson & Parks, 1989). Tamanha variedade depende não somente de fatores como sexo, nutrição, habitat natural, clima, mas também de espécie para espécie (Vassilevski et al., 2010).

A principal função da peçonha é de matar ou paralisar a presa, além proteger aranhas de possíveis ameaças (Vassilevski et al., 2010). Tal objetivo se dá, principalmente, por meio da atuação de inúmeras toxinas presentes na peçonha de aranhas no sistema nervoso central e/ou periférico. Sabe-se que acilpoliaminas e os peptídeos modificadores de canais iônicos ou formadores de poros representam cerca de dois terços do peso seco da peçonha de aranhas (Corzo et al., 2002) e que essa grande proporção de neurotoxinas tem estimulado o estudo da modulação da atividade neuronal em canais iônicos de sódio, potássio e cálcio voltagens-dependente, possibilitado uma melhor compreensão da estrutura, função e farmacologia de canais iônicos específicos, bem como o seu papel em canalopatias, como miotomias, epilepsia, arritmias, doenças neurodegenerativas incluindo Alzheimer e Parkinson's (Corzo & Escoubas, 2003; King, 2013).

Os componentes da peçonha de aranhas podem ser convencionalmente divididos em três grandes grupos de acordo com a sua massa molecular: compostos de baixa massa molecular (< 1 kDa) - acilpoliaminas -, compostos peptídicos (1-10 kDa)

- neurotoxinas com pontes dissulfeto e peptídeos citolíticos lineares - e compostos de alta massa molecular (> 10 kDa) - enzimas -(Vassilevski et al., 2010). Apenas os compostos peptídicos, objeto de estudo deste trabalho, serão abordados.

1.3 Compostos Peptídicos

Os compostos peptídicos compreendem os peptídeos citolíticos lineares e os peptídeos neuroativos. Sabe-se que os peptídeos neuroativos, alvo estudado no presente trabalho, são capazes de modular ou bloquear canais iônicos dependente de voltagem (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^-) presentes do sistema nervoso central e periférico (Estrada, Villegas, & Corzo, 2007) e que tal capacidade é responsável pela paralisação da presa (Swartz, 2007). Peptídeos neuroativos, em alguns casos, também podem atuar em receptores glutamatérgicos (Corzo & Escoubas, 2003).

O fato de peptídeos neuroativos da peçonha de aranha interagirem com diversos tipos de canais iônicos e receptores glutamatérgicos tanto de invertebrados quanto de vertebrados, torna-os promíscuos, apesar de esta interação possuir diferentes afinidades. Tal promiscuidade mostra-se bastante vantajosa em se tratando de estudos com mutações sítio dirigidas, as quais auxiliam na melhor compreensão de receptores e canais iônicos (Xiao et al., 2010).

Sabe-se que 90% das neurotoxinas presentes na peçonha de aranha são peptídeos globulares compactos os quais podem apresentar entre 1-7 pontes dissulfeto, sendo que 60% dessas neurotoxinas apresentam 3 pontes dissulfeto (Windley et al., 2012). Tais neurotoxinas podem apresentar pelo menos três motivos estruturais distintos.

O primeiro motivo, denominado *inhibitor cystine-knot* (ICK), é normalmente caracterizado por um β -*hairpin* estabilizado por um nó peculiar de cisteína, podendo haver uma terceira folha β não obrigatória, numa sequência consensual $\text{C}_1\text{X}_{2-7}\text{-C}_{\text{II}}\text{X}_{3-11}\text{-C}_{\text{III}}\text{X}_{0-7}\text{-C}_{\text{IV}}\text{X}_{1-17}\text{-C}_{\text{V}}\text{X}_{1-19}\text{-C}_{\text{VI}}$ e pareamento das pontes dissulfeto $\text{C}_1\text{-C}_{\text{IV}}$, $\text{C}_{\text{II}}\text{-C}_{\text{V}}$, $\text{C}_{\text{III}}\text{-C}_{\text{VI}}$, sendo C, as cisteínas, e X, os demais resíduos de aminoácidos. O nó de cisteína consiste em um anel formado pelas interações entre $\text{C}_1\text{-C}_{\text{IV}}$ e $\text{C}_{\text{II}}\text{-C}_{\text{V}}$ penetrado por uma terceira ponte dissulfeto ($\text{C}_{\text{III}}\text{-C}_{\text{VI}}$) (Norton & Pallaghy, 1998). Conformações do tipo α -hélices são raras. A maioria das toxinas peptídicas de aranhas segue a sequência consensual desse motivo, caracterizado por gerar arranjos estruturais super estáveis, tipicamente resistentes a proteases, níveis extremos de pH, solventes

orgânicos e altas temperaturas (Colgrave & Craik, 2004). A atividade biológica das toxinas ICK é diversa, podendo atuar em canais dependente de voltagem (sódio -Na_v-, cálcio -Ca_v- e potássio -K_v-), canais iônicos sensíveis à ácido (ASICs), canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP) e canais mecanossensíveis (MSC) (Windley et al., 2012).

O segundo motivo estrutural, denominado *disulfide - directed β-hairpin* (DDH), não possui a presença de um nó de cisteína e é caracterizado por um *β-hairpin* antiparalelo estabilizado por duas pontes dissulfeto obrigatórias e sequência consensual CX₄₋₁₉-CX₂(G ou P)X₂-C₄₋₁₉-C, sendo C, as cisteínas e X, os demais resíduos de aminoácidos (Wang et al., 2000). Acredita-se que o motivo ICK tenha evoluído a partir do motivo DDH, uma vez que a partir do motivo DDH é possível gerar um motivo ICK e pelo fato do motivo DDH ser encontrado em diversos organismos, como fungos, algas, plantas, com exceção de archaea e bactérias, sugerindo que tal motivo tenha se originado de um ancestral eucarioto antes à divergência de plantas, animais e fungos (Smith et al., 2011). Pouco se sabe sobre atividade biológica das toxinas DDH, visto que uma série de peptídeos que apresentam esse motivo, como U₁-HXTX-Hv1a (Wen et al., 2005), U₁-TRTX-Lp1a e Lp1b (Escoubas & Rash, 2004), não possuem seu alvo molecular elucidado.

Há, ainda, um terceiro tipo de motivo estrutural o qual as toxinas de aranhas podem apresentar denominado *Kunitz-type*. Tal motivo é caracterizado pela presença de uma ₃₁₀ hélice na porção N-terminal, α -hélice na porção C-terminal e folha β antiparalela tripla, com pareamento das pontes dissulfeto C_I-C_{VI}, C_{II}-C_{IV}, C_{III}-C_V. Peptídeos que compõem esse motivo, geralmente, atuam inibindo canais de potássio e serinoproteases (Windley et al., 2012). Esse motivo também está presente em toxinas de outros organismos além de aranhas, como escorpiões, caracóis, anêmonas do mar, cobras, vespas (Fry et al., 2009).

1.3.1 Canais de Sódio Dependentes de Voltagem (Na_v)

Canais de sódio dependentes de voltagem são fundamentais nos processos de iniciação e propagação de sinais elétricos em células neuronais excitáveis, músculos e tecidos cardíacos. São formados por uma subunidade α (260kDa) ligada a uma ou duas subunidades β auxiliares (33-36 kDa), que podem ou não serem iguais, por meio de pontes dissulfeto ou ligação não covalente (Brackenbury & Isom, 2011; Catterall,

2000). A subunidade α compreende quatro domínios compostos por seis segmentos transmembrânicos, denominados S1, S2, S3, S4, S5 e S6 (Guy & Seetharamulu, 1986) (Figura 1). O segmento S4 contém resíduos de cargas positivas (principalmente, arginina e lisina) seguidas de dois ou três resíduos hidrofóbicos em um padrão repetido 4-6 vezes, o que o torna sensível a alterações de voltagem, sendo, portanto, denominado sensor de voltagem (Catterall, 1986). O sensor de voltagem S4 de cada domínio é conectado com o poro do canal, formado pelos segmentos S5 e S6 dos quatro domínios, por meio alças intracelulares, as quais interligam S4 e S5. Uma vez despolarizado o canal, as cargas positivas presentes no segmento transmembrana S4 dos domínios I, II e III se movem para a superfície extracelular, gerando uma mudança conformacional no poro, a qual promove a abertura do canal. A movimentação tardia do segmento S4 do domínio IV, denominada segunda conformação do poro condutor, é responsável por, ao se movimentar em direção à superfície extracelular, movimentar os segmentos transmembrânicos do domínio IV, fazendo com que o canal seja inativado por meio da interação da alça intracelular que interliga o segmento S1 do domínio IV e S6 do domínio III com o poro (Figura 2). Após a repolarização da membrana, os quatro segmentos S4 retornam à sua posição de repouso, sendo possível uma nova despolarização (Albert et al., 1999; Cestèle et al., 2001; De Lera Ruiz & Kraus, 2015; Goldschen-Ohm et al., 2013).

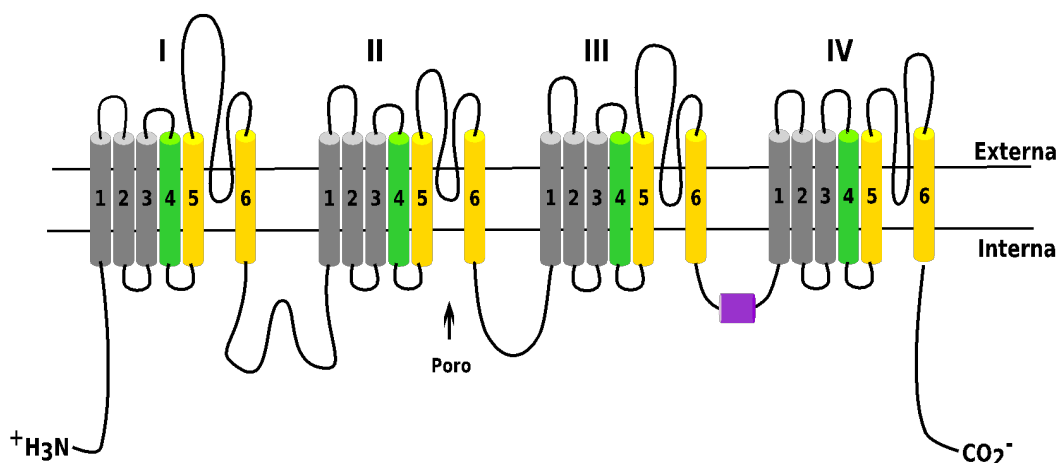


Figura 1. Representação esquemática da subunidade α de um canal Na_v . Os números em romano identificam os quatro domínios; os segmentos S4, denominados sensores de voltagens, estão representados em verde; os segmentos S5 e S6, formadores de poro, estão em amarelo; em roxo, está representada a alça de inativação do canal. Imagem: Alessa Bembom (adaptada de Yu & Catterall, 2003).

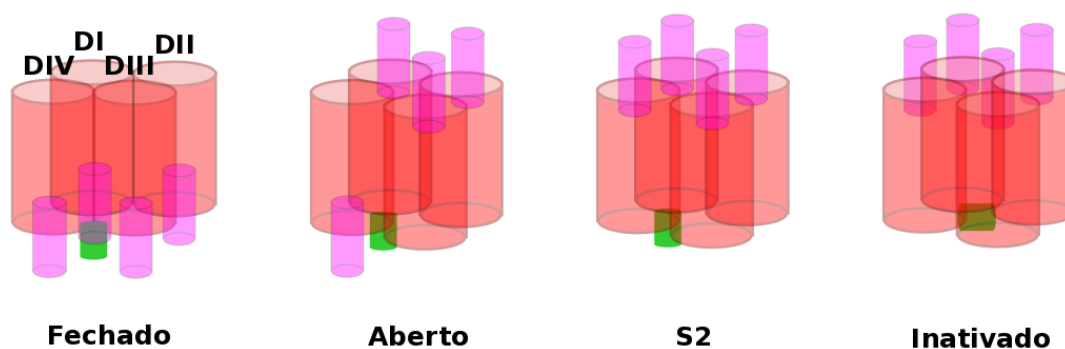


Figura 2. Representação esquemática da movimentação dos segmentos S4 dos quatro domínios. Em vermelho, estão representados os quatro domínios; em rosa, os segmentos S4; em verde, a alça de inativação do canal. Quando todos os segmentos S4 se encontram no meio interno da membrana, o canal se encontra fechado. Quando os segmentos S4 de DI, DII e DIII se encontram no meio externo da membrana, o canal se encontra aberto. A movimentação do segmento S4 de DIV promove um estado momentâneo denominado segunda conformação do poro condutor (S2) e, logo em seguida, o canal encontra-se no estado inativado. Imagem: Alessa Bembom (adaptada de Goldschen-Ohm et al., 2013).

Em mamíferos, existem nove isoformas de Na_v1 , as quais já foram caracterizadas e que são distribuídas pelo SNC, SNP, músculo esquelético e coração (Goldin, 2001) (Tabela 1). No início dos anos 2000, descobriu-se a existência da isoforma Na_v2 , entretanto pouco se sabe sobre sua função (Watanabe et al., 2000). Sabe-se que a diversidade estrutural, funcional e farmacológica dos canais de sódio em mamíferos é gerada pela expressão de múltiplos genes. Já em insetos, tal diversidade é gerada por inúmeros *splicing* alternativos e edição de RNA de um único gene (Song et al., 2004; Tan et al., 2002). Vale ressaltar também que 87-98% das sequências das várias isoformas de canais de sódio em inseto são altamente conservadas e que tais isoformas possuem entre 50-60% de identidade com os canais de sódio de mamíferos (King et al., 2008).

Tabela 1. Isoformas de canais de sódio de mamíferos dependentes de voltagem. SNC - Sistema Nervoso Central; SNP - Sistema Nervoso Periférico; NSS - Neurônios do Sistema Sensorial; NAP - Neurônios Aferentes Primários; ✓ - Altamente sensível à TTX (bloqueio por baixas concentrações na ordem de nanomolar de TTX); ✗ - Resistente à TTX (bloqueio por altas concentrações na ordem de micromolar de TTX). Tabela adaptada de England & De Groot, 2009.

Canal de sódio	Sensível à TTX	Tecido de maior expressão	Doenças relacionadas
$Na_v 1.1$	✓	SNC, SNP	Epilepsia
$Na_v 1.2$	✓	SNC, SNP	Epilepsia
$Na_v 1.3$	✓	SNC, SNP	Dor
$Na_v 1.4$	✓	Músculo esquelético	Miotonia, paralisia periódica
$Na_v 1.5$	✗	Coração	Síndrome de Brugada
$Na_v 1.6$	✓	SNC, SNP	Atrofia cerebelar
$Na_v 1.7$	✓	SNP (NSS e NAP)	Aumento e diminuição da sensibilidade da dor
$Na_v 1.8$	✗	SNP (NAP)	Dor neuropática
$Na_v 1.9$	✗	SNP (NAP)	Dor neuropática

Grande parte do que se sabe, atualmente, sobre a estrutura e função dos canais de sódio foi determinada por meio de estudos com uma variedade de toxinas advindas de plantas e animais. Tais sondas moleculares permitiram a detecção de pelo menos sete locais de ligação de neurotoxinas acopladas alostericamente, denominados sítios de ligação de neurotoxinas 1-7 (Catterall et al., 2007; Cestèle & Catterall, 2000; Nicholson, 2007).

devido à diferença de resíduos de aminoácidos presente nas alças extracelulares S3-S4 do domínio II observada nos diferentes subtipos de Na_v (De Lera Ruiz & Kraus, 2015).

Recentemente, um novo peptídeo altamente seletivo para Na_v 1.7 ($\text{IC}_{50} = 0,9\text{nM}$) foi estudado. Tal peptídeo, denominado μ -theraphotoxin-Pn3a (μ -TRTX-Pn3a), isolado da aranha caranguejeira *Pamphobeteus nigricolor*, possui 35 resíduos de aminoácidos e compõem o grupo de peptídeo de aranhas que possuem motivo ICK (*inhibitor cysteine knot*) (Deuis et al., 2017). Ensaio eletrofisiológicos determinaram que o peptídeo μ -TRTX-Pn3a possui $\text{IC}_{50} = 37\text{ nM}$, 124 nM , 210 nM , 144 nM , 800 nM , 129 nM , $0,9\text{ nM}$, 49888nM e 2427 nM para os subtipos hNa_v 1.1, hNa_v 1.2, hNa_v 1.3, hNa_v 1.4, hNa_v 1.5, hNa_v 1.6, hNa_v 1.7, hNa_v 1.8 e hNa_v 1.9, respectivamente. Além disso, ao se avaliar o $\Delta V_{1/2}$ de ativação de tais isoformas com o peptídeo Pn3a (100nM), verificou-se através de teste t pareado ($P < 0,05$ e $n = 4-10$ células) que somente o hNa_v 1.7 possuiu um efeito estatístico significativo ($\Delta V_{1/2} = +21,3\text{ mV}$), deslocando, assim, o potencial de ativação para potenciais mais positivos. Efeitos mínimos nos valores de $\Delta V_{1/2}$ de inativação rápida com o peptídeo Pn3a (100nM) foram observados para os subtipos hNa_v 1.1, hNa_v 1.2, hNa_v 1.3, hNa_v 1.4, hNa_v 1.7 e hNa_v 1.8. Estudos de mutações sítio dirigidas realizadas com quimeras dos canais hNa_v 1.7 / $\text{K}_v2.1$ evidenciaram que a toxina μ -TRTX-Pn3a interage tanto com a alça extracelular dos segmentos S3-S4 do domínio II quanto do domínio IV. Uma vez que os canais de sódio são bastante conservados em mamíferos, o peptídeo μ -TRTX-Pn3a também apresentou seletividade para os canais rNa_v 1.7 e mNa_v 1.7, com $\text{IC}_{50} = 1,5\text{ nM}$ e $4,4\text{ nM}$, respectivamente. Ensaio em canais de potássio, de cálcio e em receptores nicotínicos de acetilcolina também foram realizados, apresentando $\text{IC}_{50} > 300\text{ nM}$ para o canal $\text{rK}_v2.1$ e $\text{IC}_{50} > 10\text{ }\mu\text{M}$ para os canais hCa_v 1.2, hCa_v 2.2, $\alpha 7$ nAChR e $\alpha 3$ nAChR. O potencial terapêutico da inibição de Na_v 1.7 gerada por μ -TRTX-Pn3a também foi avaliado em modelos de dor em roedores. Verificou-se que tal peptídeo, quando administrado sozinho, não produz efeito em nenhum dos modelos testados, entretanto, ao ser coadministrado com opioides, tais como oxycodona ou buprenorfina, produz uma profunda analgesia (Deuis et al., 2017).

A família das Huwentoxinas (HWTXs), compostas por peptídeos isolados da peçonha da aranha *Haplopelma huwena*, também se mostra importante dentre as NaSpTxs. Estudos com a toxina HWTX-IV, um peptídeo de 35 resíduos de

aminoácidos, evidenciaram efeito antinociceptivo em modelo de inflamação e dor neuropática em ratos e camundongos. O peptídeo HWTX-IV apresentou maior atividade em hNa_v 1.7 (IC₅₀ = 22,7 ± 6,3 nM) quando comparada a atividade em rNa_v 1.2, rNa_v 1.3, rNa_v 1.4 e hNa_v 1.5 (Xiao et al, 2010; Xiao et al., 2008). Um outro exemplo da família das HWTXs é o peptídeo HWTX-II, um peptídeo com 37 resíduos de aminoácidos e 3 pontes dissulfeto, o qual possui atividade paralítica dose-dependente em baratas (EC₅₀ = 127 ± 54 µg/g) e de bloqueio da transmissão neuromuscular em preparação de nervo frênico extraído de diafragma de camundongos (Shu & Liang, 1999). Semelhantemente, à HWTX-II, o peptídeo Ap1a, alvo de estudo deste trabalho, também é tóxico para insetos (ED₅₀ = 13.01 ± 4.21 µg / g) e para camundongos (dose testada: 30 µg de Ap1a por animal, o equivalente a 1,67 µg /g)(Mourão et al., 2013).

1.3.2 Canais de Cálcio e Potássio Dependentes de Voltagem (Ca_v e K_v)

Assim como os canais de sódio dependente de voltagem, os canais de cálcio e potássio dependentes de voltagem exercem importante função no organismo. Canais de cálcio dependente de voltagem são transdutores de sinal indispensáveis para o processo de contração muscular, liberação de hormônio e neurotransmissores, atividade enzimática e expressão gênica (Catterall et al., 2007). Já os canais de potássio dependentes de voltagem estão envolvidos na excitabilidade e na transmissão sináptica, assim como na repolarização de cardiomiócitos (Sanguinetti et al., 1997). Ambos são compostos, basicamente, por uma subunidade α , formada por regiões transmembrânicas que atuam como sensores de voltagem e formadores de poro, ligada a subunidades auxiliares, tendo suas particularidades: canais de cálcio dependente de voltagem possuem subunidade α semelhante aos canais de sódio e apresentam vários tipos de subunidades auxiliares, tais como subunidades β , subunidades α_2 - δ e subunidades γ (Catterall, 2000); enquanto em canais de potássio dependente de voltagem os domínios presentes na subunidade α podem ou não serem homólogos (Wulff et al., 2009).

Em mamíferos, existem seis diferentes tipos de correntes associadas aos canais de Ca_v: do tipo L (Ca_v 1.1-1.4), do tipo P/Q (Ca_v 2.1), do tipo N (Ca_v 2.2), do tipo R (Ca_v 2.3) e do tipo T (Ca_v 3.1-3.3) (Tabela 2). Correntes do tipo L necessitam de uma

forte despolarização para ativação, são duradouras e são bloqueados por antagonistas orgânicos, como di-hidropiridinas, fenilalquilaminas e benzotiazepinas. Correntes do tipo P/Q, N e R também necessitam de uma forte despolarização, mas não são bloqueadas pelos mesmos compostos que bloqueiam as correntes do tipo L, são bloqueadas por toxinas peptídicas de caracóis e de aranhas. Correntes do tipo T são ativadas por uma fraca despolarização e são transientes. Além disso, são resistentes aos compostos e toxinas que bloqueiam os demais canais de cálcio (Catterall et al., 2005). Em *Drosophila*, os subtipos de canais de cálcio denominados Dmca1D, Dmca1A e Ca- α 1T correspondem aos canais Ca_v1, Ca_v2 e Ca_v3, respectivamente (King, 2007).

Tabela 2. Isoformas de canais de cálcio de vertebrados dependentes de voltagem. Tabela adaptada de Catterall et al., 2005; Gribkoff, 2006.

Canal	Tipo de Corrente	Distribuição	Doenças Relacionadas
Ca_v 1.1	L	Músculo esquelético; túbulos transversos	Desordens de movimento
Ca_v 1.2	L	Miócitos cardíacos; miócitos de músculo liso; células endócrinas; corpos celulares neuronais; dendritos proximais	Cardiovascular
Ca_v 1.3	L	Células endócrinas; corpos celulares neuronais e dendritos; miócitos cardíacos atriais e células marca-passo; células ciliadas da cóclea	Arritmia, disfunção auditiva
Ca_v 1.4	L	Bastonetes e células bipolares da retina; medula espinhal; glândula adrenal; mastócitos	Desordens oftalmológicas
Ca_v 2.1	P/Q	Terminais nervosos e dendritos; células neuroendócrinas	Ataxia e enxaqueca hemiplégica
Ca_v 2.2	N	Terminais nervosos e dendritos; células neuroendócrinas	Dor aguda e neuropática
Ca_v 2.3	R	Corpos celulares e dendritos	Desordens neurológicas (processamento da informação)
Ca_v 3.1	T	Corpos celulares neuronais e dendritos; miócitos musculares cardíacos e lisos	Epilepsia, fibrilação atrial
Ca_v 3.2	T	Corpos celulares neuronais e dendritos; miócitos musculares cardíacos e lisos	Hipertensão, dor, angina, epilepsia
Ca_v 3.3	T	Corpos celulares neuronais e dendritos	Epilepsia, desordens do sono

As ω -toxinas, uma família de toxinas de diferentes animais que atuam em canais de cálcio, se tornaram bastante importantes na identificação e no isolamento de

diversos subtipos de Ca_v (Vieira et al., 2005). A ω -agatoxina IVA, por exemplo, isolada da peçonha da aranha *Agelenopsis aperta*, foi fundamental na ampliação dos conhecimentos sobre os canais de cálcio do tipo P/Q. Tal toxina atua bloqueando seletivamente canais do tipo P e Q, com um K_d de aproximadamente 2nM e 90 nM, respectivamente (Mintz et al., 1992).

A família das Huwentoxinas (HWTXs), apesar de possuir alta similaridade entre suas toxinas, apresenta enorme diversidade de função. A toxina HWTX-XVI, também isolada da aranha *H. huwena*, que possui 39 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto, é capaz de inibir canais de cálcio do tipo N em neurônios DRG de ratos, com uma IC_{50} de aproximadamente 60 nM, sem afetar as correntes geradas por outras isoformas de canais de cálcio. Ao injetar o peptídeo HWTX-XVI em ratos, observa-se uma relevante resposta analgésica à dor induzida por formalina. Vale ressaltar que canais de cálcio tipo N estão intimamente relacionados à transdução da dor, evidenciando, assim, o potencial farmacêutico do peptídeo HWTX-XVI, que, por sua vez, não apresenta efeito em canais de sódio de neurônios DRG de ratos e nem em canais de potássio do tipo K_v 1.1, K_v 1.2, K_v 1.3, K_v 2.1, K_v 4.2 e K_v 4.3 expressos em oócitos de *Xenopus laevis* (Deng et al., 2014).

Vieira et al 2005 demonstraram que o peptídeo PnTx3-6, isolado da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, atua inibindo correntes de cálcio do tipo L, N, P/Q e R expressas em células HEK com IC_{50} de 122, 136, 263 e 607 nM, respectivamente. Apesar do sítio de ligação do peptídeo PnTx3-6 ainda ser desconhecido, acredita-se que esse atue como um bloqueador de poro, uma vez que ele não modula a cinética de ativação e inativação do canal.

Canais de K_v apresentam 12 famílias caracterizadas em mamíferos. Tamanha diversidade se deve, principalmente, pelo fato de canais de K_v formarem tanto homotetrâmeros quanto heterotetrâmeros. Além disso, canais de K_v podem se associar com diversas proteínas acessórias, sofrerem *splicing* alternativo e modificações pós transcricionais (Gutman et al., 2005). Em insetos (*Drosophila*), os canais de potássio denominados: Shaker, Shaw, Shal, Shab e EAG estão relacionados ao K_v1x , K_v2x , K_v3x , K_v4x , K_v10x de mamíferos, respectivamente (Windley et al., 2012; Yu et al., 2005) (Tabela 3).

Tabela 3. Isoformas de canais de potássio dependentes de voltagem. Tabela adaptada de Gutman et al., 2005.

Subtipos	Família
K_v1.1	Shaker
K_v1.2	Shaker
K_v1.3	Shaker
K_v1.4	Shaker
K_v1.5	Shaker
K_v1.6	Shaker
K_v1.7	Shaker
K_v1.8	Shaker
K_v2.1	Shab
K_v2.2	Shab
K_v3.1	Shaw
K_v3.2	Shaw
K_v3.3	Shaw
K_v3.4	Shaw
K_v4.1	Shal
K_v4.2	Shal
K_v4.3	Shal
K_v5.1	Modificador
K_v6.1	Modificadores
K_v6.2	Modificadores
K_v6.3	Modificadores
K_v6.4	Modificadores
K_v7.1	KVLQT/KQT2
K_v7.2	KVLQT/KQT2
K_v7.3	KVLQT/KQT2
K_v7.4	KVLQT/KQT2
K_v7.5	KVLQT/KQT2
K_v8.1	Modificadores
K_v8.2	Modificadores
K_v9.1	Modificadores
K_v9.2	Modificadores
K_v9.3	Modificadores
K_v10.1	eag1
K_v10.2	eag2

Tabela 4 (Continuação tabela 3). Isoformas de canais de potássio dependentes de voltagem.

Tabela adaptada de Gutman et al., 2005.

K_v11.1	erg1
K_v11.2	erg2
K_v11.3	erg3
K_v12.1	elk1, elk3
K_v12.2	elk2
K_v12.3	elk1

Diferentemente da maioria das toxinas advindas de serpentes, abelhas, escorpiões e anêmonas, as quais atuam, principalmente em K_v 1 e K_v 3, peptídeos de peçonha de aranhas têm como alvo principal K_v 2 e K_v 4 (Estrada et al., 2007).

A família das Heteropodatoxinas, isolada da peçonha da aranha *Heteropoda venatoria*, compreende três peptídeos estruturalmente similares que apresentam entre 29-32 resíduos de aminoácidos. Tais peptídeos, denominados HpTx₁, HpTx₂ e HpTx₃, prolongam o potencial de ação cardíaco e bloqueiam as correntes transientes (*transient outward K⁺*) de potássio em miócitos ventriculares de ratos. Além disso, as três toxinas são capazes de bloquear, de forma dependente de concentração, correntes de potássio do tipo K_v 4.2 expressas em *Xenopus laevis*, entretanto, quando testadas em correntes de potássio do tipo K_v 1.4 também expressas em *X. laevis*, sob uma concentração de 2 μM, nenhum efeito é observado. A toxina HpTx₃, por exemplo, inibe 84% da corrente de K_v 4.2 em concentração de 400nM, enquanto em concentrações de 200nM e 67 nM, há uma inibição de 72% e 58%, respectivamente. (Sanguinetti et al., 1997). Vale ressaltar que HpTx₃ apresenta 39-41% de identidade com a hanatoxina 2 (HaTx₂), um peptídeo da família das Hanatoxinas isolado da aranha *Grammostola spatulata*.

As Hanatoxinas compreendem dois peptídeos com 35 resíduos de aminoácido os quais divergem em apenas um resíduo na posição 13. Enquanto a HaTx₁ possui uma serina, a HaTx₂ apresenta uma alanina. Uma mistura de ambas isoformas (HaTx), a 200 nM, bloqueou 77% da corrente de potássio do tipo K_v 2.1 em oócitos de *X. laevis*. Quando testadas, sob concentração de 500 nM, em canais de insetos do tipo Shaker K⁺, Shaw e EAG e em canais do tipo K_v1.1, K_v1.6 e K_v3.1 de mamíferos, nenhum efeito é observado. Entretanto, em canais K_v4.2, HaTx, numa concentração de 500 nM, observa-se uma certa inibição (Swartz & Mackinnon, 1995). O sítio de

atuação das HaTx até hoje não foi elucidado, todavia ele é um dos mais estudados. Sabe-se que as HaTx modulam o canal Kv 2.1 em direção a uma maior despolarização, isto é, o canal Kv 2.1, quando em presença da HaTx, necessita de uma voltagem mais positiva para promover sua ativação (Swartz & Mackinnon, 1997). Sabe-se também que as HaTx interagem com fosfolipídios antes de interagir com o sensor de voltagem, no entanto o esclarecimento de como tal peptídeo, o qual é solúvel em água, atua no sensor de voltagem permanece pouco compreendido. Estudos baseados em mutações e de ligação à superfície, descobriram que a HaTx interage com resíduos de aminoácidos presentes na porção hidrofóbica do sensor de voltagem (Li-Smerin & Swartz, 2000; Swartz & Mackinnon, 1997a, 1997b; Swartz & Mackinnon, 1995). Com base nisso, Lou et al., 2017 apresentou uma série de observações biofísicas e bioquímicas sobre a perturbação de membranas lipossômicas induzidas por ligação à HaTx, a fim de proporcionar uma melhor compreensão estrutural de como essa toxina interage com fosfolipídeos e com os sensores de voltagem, tais como: o peptídeo HaTx liga-se diretamente às membranas lipídicas, sem que haja formação de poro; os resultados obtidos sugerem a participação de cadeias acil na ligação da HaTx à membrana e, provavelmente, como consequência disso, a HaTx consegue penetrar no núcleo de hidrocarbonetos da membrana, não se ligando apenas na interface da membrana do sensor de voltagem.

1.3.3 Receptores de Glutamato

O L-glutamato, considerado o principal neurotransmissor excitatório de mamíferos (Greenamyre & Porter, 1994), encontra-se armazenado em vesículas sinápticas, as quais dependem de cálcio para serem exocitadas e liberadas na fenda sináptica. Existem dois tipos de classificação para os receptores de glutamato: os ionotrópicos, relacionados a canais iônicos dependentes de ligantes, e metabotrópicos, relacionados a proteínas G e segundos mensageiros. Dentre os receptores ionotrópicos estão os denominados do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) e os não NMDA (AMPA – ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazoleproniônico – e o cainato) (Ozawa et al., 1998).

Receptores do tipo NMDA possuem uma cinética lenta, são dependentes de voltagem e necessitam da coparticipação da glicina com o glutamato para serem ativados, além de serem altamente permeáveis a íons cálcio. Já os do tipo não NMDA,

possuem uma cinética rápida e são pouco permeáveis a íons cálcio (Osborne et al., 2000; Rash & Hodgson, 2001).

Em insetos, o L-glutamato, além de ser importante no sistema nervoso central, é também o principal transmissor da junção neuromuscular, exercendo função tanto excitatória quanto inibitória (Osborne, 1996).

Pouco se sabe acerca de peptídeos isolados de aranhas os quais atuam em receptores de glutamato. Sabe-se que o peptídeo PnTx3-4, isolado da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, é capaz de diminuir a captação de glutamato em sinaptossomas de uma maneira tempo-dependente e que tal inibição afeta a liberação de cálcio, diminuindo-a (Reis et al., 1999). A fração PnTx 4, também obtida da aranha *P. nigriventer*, é capaz de inibir a captação de glutamato em sinaptossomas cerebrocorticais de ratos de maneira dose-dependente, apresentando uma IC_{50} de $2.35 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$. O peptídeo PnTx 4-7, o qual compõe a fração PnTx 4, apresenta a maior atividade inibitória, sendo responsável por $50.3 \pm 0,69 \%$ da inibição (Amaral et al., 1999).

1.4 *Acanthoscurria paulensis* Mello-Leitão, 1923

Acanthoscurria paulensis é uma migalomorfa da família Theraphosidae que apresenta cor acastanhada e que distribui-se por quase todo o Brasil central, sendo encontrada em Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Paraná e Rio Grande do Sul (Lucas et al., 2011). Com comportamento bastante agressivo e habitando, principalmente, cupinzeiros, a aranha *Acanthoscurria paulensis* (Figura 4) se alimenta da maioria das espécies inquilinas que ali também vivem, tendo preferência por Ortópteros (grilos, baratas do cerrado) e outras aranhas, podendo, inclusive ser observado o canibalismo (Lourenço, 1978).



Figura 4. *Acanthoscurria paulensis* (Theraphosidae). Foto: Gustavo Guimarães.

1.4.1 Ap1a

Estudos prévios com a Ap1a, realizados no laboratório de Toxinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade de Brasília, fizeram parte da dissertação de mestrado de Caroline Mourão (2012) e foram publicados em formato de artigo (Mourão et al., 2013). Entre os resultados, verificaram que a peçonha da aranha *Acanthoscurria paulensis* apresenta cerca de 100 compostos distribuídos entre intervalos de massa de 635-21.895 Da, sendo a fração com maior abundância, de massa monoisotópica $[M+H]^+ = 5457,79$ Da, denominada Ap1a (Mourão et al., 2013).

Foi evidenciando que o peptídeo Ap1a apresenta 48 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto. Sua atividade biológica foi avaliada em diferentes preparações: Atividade em lagartas *Spodoptera frugiperda*, Circuito da Fibra Gigante em *Drosophila melanogaster*, atividade eletrofisiológica em receptor de Acetilcolina tipo Nicotínico (nAChR) e em canais iônicos de sódio do tipo hNav 1.2, hNav 1.4, hNav 1.5 e hNav 1.6, além do ensaio de toxicidade em camundongos (Mourão et al., 2013).

O peptídeo Ap1a apresentou toxicidade tanto pra insetos quanto para mamíferos. Quando injetado em lagartas, induziu paralisia reversível de maneira dose-dependente e quando testado no Circuito da Fibra Gigante em *Drosophila melanogaster*, reduziu tanto a amplitude quanto a frequência das respostas às vias GF-TTM e GF-DLM em basicamente todas as doses testadas, sugerindo uma possível ação do peptídeo na junção neuromuscular, mediada por receptores glutamatérgicos.

A injeção intracerebroventricular (via icv) de 30 μg /camundongo gerou um aumento da micção, mioclonia, hipermotilidade com movimentos circulares e crises generalizadas denominadas “*status epilepticus*”, sendo que todos os animais morreram entre 25-35 minutos por parada respiratória devido às crises generalizadas. Semelhante efeito é observado quando injeta-se NMDA em camundongos via icv, sugerindo, novamente, uma possível ação do peptídeo Ap1a em receptores glutamatérgicos.

Por fim, o peptídeo Ap1a não apresentou atividade eletrofisiológica em receptor de Acetilcolina tipo Nicotínico (nAChR) e, quando testado em canais iônicos de sódio do tipo hNav 1.2, hNav 1.4, hNav 1.5 e hNav 1.6, apresentou um pequeno efeito, não sendo considerado significativo pela autora Caroline Mourão (Mourão et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Embora, atualmente, existam 47.027 espécies de aranhas descritas, pouco se sabe sobre suas peçonhas. Grande parte disso, se deve à dificuldade de se trabalhar com pequenas quantidades de material “nativo” e, também, pelo fato de apenas 4 gêneros de aranhas (*Atrax*, *Latrodectus*, *Loxosceles* e *Phoneutria*), dos 4.077 existentes, serem responsáveis por casos de envenenamento fatal em humanos.

Entretanto, com o advento da tecnologia que combina métodos genéticos (obtenção de cDNA a partir da glândula de peçonha) com proteômica (relacionadas a cromatografia de alta eficiência e espectrometria de massa), aliada ao grande potencial dos componentes da peçonha de aranha em atuarem em canais iônicos e receptores celulares, algumas vezes, de maneira seletiva fazem com que o interesse pelo o estudo da peçonha de aranhas aumente cada vez mais.

Sendo consideradas novas fontes de ferramentas para a pesquisa farmacológica e conduta terapêutica, o estudo da peçonha de aranhas auxilia tanto no desenvolvimento de um novo fármaco como na compreensão da estrutura, função e farmacologia de canais iônicos específicos, bem como seu papel nas canalopatias, tais como miotonias, epilepsias, enxaqueca, arritmias e distúrbios neurodegenerativos incluindo Alzheimer e doença de Parkinson.

Vale ressaltar que a afinidade de toxinas por seus alvos moleculares não está obrigatoriamente relacionada à periculosidade do animal, do qual foi extraída a toxina. Além disso, toxinas que bloqueiam ou modulam canais iônicos ou receptores celulares de maneira parcial podem ser fontes de sondas bioquímicas importantíssimas para o entendimento das inúmeras etapas dos processos moleculares e fisiológicos de vertebrados.

Com base nisso, o presente estudo contribui com a ampliação do conhecimento específico da peçonha de uma das inúmeras aranhas caranguejeiras endêmicas do Brasil, além de auxiliar na busca por novos fármacos e/ou no conhecimento de como tais peptídeos agem em canais iônicos.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo descrever o(s) alvo(s) molecular(es) do peptídeo Ap1a, isolado da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair e purificar o peptídeo Ap1a;
- Avaliar a ação do peptídeo Ap1a por meio de ensaios eletrofisiológicos em canais de Na⁺, K;
- Avaliar o efeito do peptídeo Ap1a em ensaios de ligação de [3,4 ³H]-L- glutamato.

4. METODOLOGIA

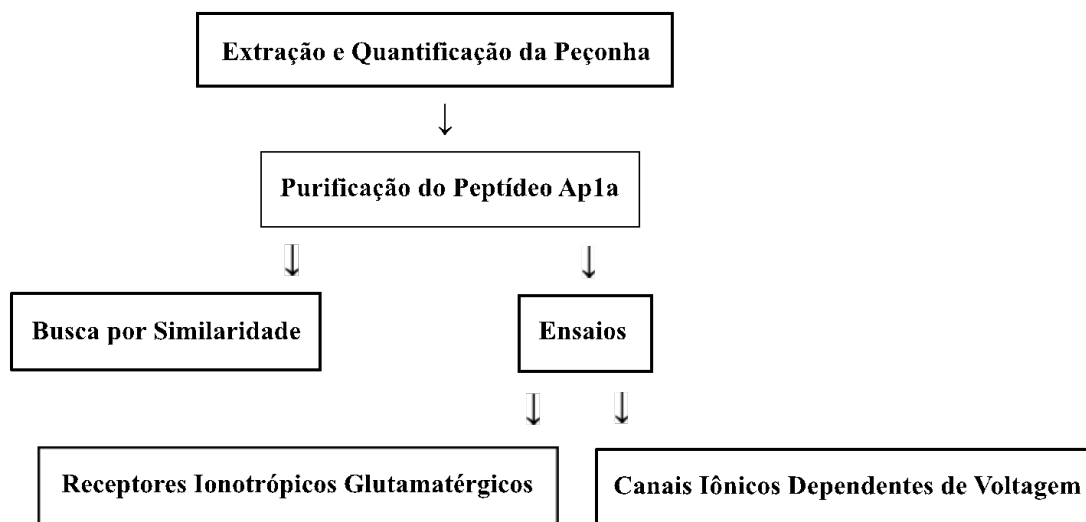


Figura 5. Fluxograma resumido da metodologia deste trabalho.

4.1 Extração e Quantificação da Peçonha

A peçonha de espécimes machos e fêmeas adultos da aranha *A. paulensis*, mantidos vivos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, foi obtida mensalmente por meio de estimulação elétrica da região basal das quelíceras, sendo coletada em tubos de polietileno tipo *ependorf* colocados diretamente sob as quelíceras. As amostras foram solubilizadas em água Milli-Q e centrifugadas para a remoção do sedimento. Posteriormente, foram secas a vácuo e armazenadas a -20°C . A quantificação da peçonha bruta foi feita por peso seco em uma balança analítica de alta precisão (cinco casas decimais).

4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC)

4.2.1 Fracionamento da Peçonha Bruta

Alíquotas de 5,0 mg de peçonha bruta liofilizada de *A. paulensis* foram ressuspendidas em uma solução de 0,12% de TFA/água (v/v) e centrifugadas por 10 minutos a $10000 \times g$. Foram submetidos 200 μL do sobrenadante a um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (RP-HPLC) Shimadzu Co.

(Kyoto, Japão) série LC10A, equipado com um arranjo de diodo SPD-M10A, em uma coluna semipreparativa Phenomenex C18. Para a eluição utilizou-se um gradiente binário de solução aquosa de TFA 0,12% (A) e de solução de acetonitrila de TFA 0,1% (B), com um fluxo de 1,5 mL/min e detecção a 216 e 280 nm de absorvância. O gradiente iniciou-se com 0% de B por 10 minutos; seguido de 0 a 60% de B em 60 minutos; 60 a 100% de B em 10 minutos; e 100% de B mantidos pelos 10 minutos finais, para então equilibrar a coluna novamente na solução A. As frações cromatográficas foram manualmente coletadas, secas a vácuo e armazenadas a -20°C.

4.2.2 Purificação do Peptídeo Ap1a

A fração de interesse obtida a partir do fracionamento da peçonha bruta foi recromatografada em sistema de RP-HPLC em uma coluna analítica C18 (Phenomenex, EUA) utilizando-se fluxo de 1,0 mL/min e absorvância monitorada a 216 e 280 nm. Para a eluição, foram utilizadas as mesmas soluções A e B, descritas anteriormente, sendo o gradiente de acetonitrila otimizado. As amostras foram manualmente coletadas, secas a vácuo e armazenadas a -20°C. O peptídeo puro foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare) a 280 nm, conforme instruções do fabricante.

4.3 Espectrometria de Massa

Para a avaliação do grau de pureza do peptídeo de interesse, utilizou-se espectrometria de massa em sistema MALDI TOF/TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha). O peptídeo foi solubilizado em água Milli-Q e dissolvido em uma matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (acetonitrila/água/TFA 3%; 5:4:1), sendo 3 μ L de matriz para 1 μ L de amostra, e amostras de aproximadamente 1 μ L foram aplicadas em triplicata em uma placa de aço inoxidável. As análises da massa molecular foram realizadas operando em modo positivo refletido e linear.

4.4 Busca por Similaridade

A sequência do peptídeo Ap1a maduro, previamente obtida por estudos do Laboratório de Toxinologia da UnB, foi submetida a buscas por similaridade por meio do servidor BLASTP, disponível online em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>. Para o alinhamento de sequências, comparação das substituições de aminoácidos e cálculo de porcentagem de identidade entre os pares de sequências, foi utilizado o *software* Clustal Omega, também disponível online: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

4.5 Ensaios Eletrofisiológicos

4.5.1 Ensaios Eletrofisiológicos em Canais de Sódio Dependentes de Voltagem de Mamíferos

- **Cultura de Células**

Células HEK (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) expressando canais humanos para sódio hNa_v1.1 e hNa_v1.3 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 4,5% de Glicose, 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de MEM (*Non Essential Aminoacids*) e antibiótico G418 (0,4mg/ml). Células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) expressando canais iônicos hNa_v1.7 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 4,5% de Glicose, 10% de Soro Fetal Bovino e antibiótico G418 (0,5 mg/ml). As células foram incubadas em um atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

- **Experimentos em *Whole-cell Patch-Clamp***

Registros eletrofisiológicos de fixação de voltagem (*voltage-clamp*) no modo *Whole-Cell* foram realizados a temperatura ambiente (22-25°C) em amplificador EPC-10 *patch-clamp* (HEKA Electronics, Rheinland-Pfalz, Germany). As micropipetas utilizadas possuíam resistência de 1,5-2,8 MΩ. As correntes de sódio foram registradas com filtro (5 kHz) e digitalizadas a 10 kHz. Para os experimentos, foram utilizadas as células HEK hNa_v1.1 e hNa_v1.3 e CHO hNa_v1.7 que apresentaram uma resistência em série (R_s) menor que 10 MΩ e uma compensação da R_s de, no mínimo, 50%. As micropipetas foram preenchidas com solução interna

contendo (mM): 105 CsF, 27 CsCl, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES (pH ajustado para 7,3 com CsOH). Enquanto no banho foi usada solução externa contendo (mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Glicose (pH ajustado para 7,4 com NaOH).

• Protocolo Experimental

Para análise do efeito de 1 μ M do peptídeo Ap1a sobre os canais hNa_v1.1, hNa_v1.3 e hNa_v1.7, as correntes de sódio (I_{Na}) foram medidas com pulsos de +5mV variando o potencial da membrana de -90 até 15 mV, sendo o potencial de repouso definido como -100 mV (Figura 6). Após a injeção da toxina, seu efeito foi avaliado no tempo de 10 minutos e, logo em seguida, foi feita a lavagem do peptídeo. Por meio desse protocolo, os valores da corrente por voltagem (I_{Na} -V) foram mensurados e convertidos em condutância (pO) através da equação:

$$\rho O = \frac{I_{Na}}{(V - V_{Na})}$$

onde V_{Na} corresponde ao potencial de reversão do íon Na⁺. A equação de condutância (pO), por sua vez, foi ajustada pela equação de Boltzmann:

$$\rho O = \frac{1}{1 + \exp\{V_S(V_{1/2} - V)\}}$$

onde $V_{1/2}$ é voltagem em que metade dos canais de sódio se encontram no estado aberto e o V_S corresponde à inclinação da fase ascendente a qual está relacionada à quantidade de cargas movidas no processo de abertura do canal.

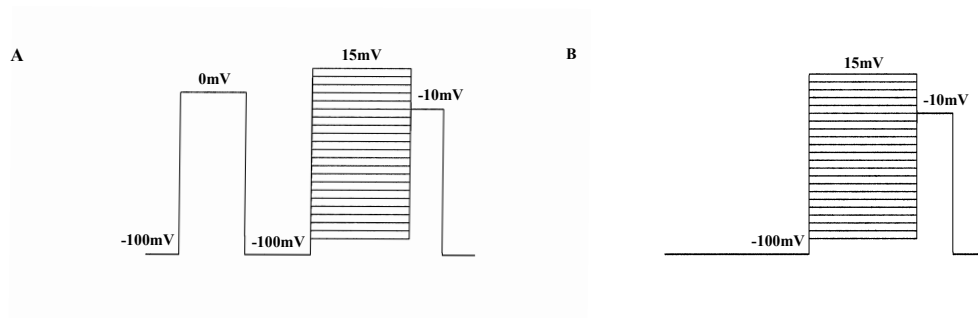


Figura 6. Protocolos de estímulo com pré-pulso de 0 mV (A) e sem pré-pulso (B) utilizados nos ensaios eletrofisiológicos de *Patch-Clamp* no modo *Whole Cell*.

As análises da inativação lenta (ρO_{-L}), a qual está relacionada à probabilidade de abertura do canal após uma pré-despolarização, foram medidas através de um único pulso de -10 mV. As correntes de sódio tardias (I_{Na-L}) geradas foram então ajustadas em uma única equação de Boltzmann:

$$\rho O_{-L} = \frac{1}{1 - e^{-(V_{S-L} - (V - V_{1/2-L}))}}$$

Todas as análises descritas acima foram feitas no *software* OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, USA). Já as análises estatísticas foram feitas no *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA) por meio do teste T pareado, sendo $P < 0,05$ indicativo de diferença significativa. Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão ($n = 8$).

4.5.2 Ensaios Eletrofisiológicos em Canais de Sódio Dependentes de Voltagem de Insetos

- **Expressão dos Canais de Sódio Dependentes de Voltagem em Oócitos de *Xenopus laevis***

Xenopus laevis foram anestesiados com tricáina 1g/L + gelo e os oócitos, isolados por meio da técnica de ovariectomia parcial, foram defoliculados por tratamento com solução de colagenase 2,5 mg/mL em solução ND-96 livre de cálcio, pH 7,5 por 1 hora e meia, a uma temperatura de 15-16°C. Após o período de tratamento, os oócitos dos estágios V e VI de maturação foram selecionados para posterior injeção do cRNA.

Para a expressão dos canais de sódio BgNav1, isolado da barata *Blattella germanica*, VdNav1, isolado do ácaro *Varroa destructor*, e da subunidade auxiliar TipE utilizou-se os transcritos de cRNA sintetizados a partir dos plasmídeos linearizados através de um kit de transcrição denominado T7 ou SP6 mMACHINE (Ambion®, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Oócitos foram injetados com 50 nL de cRNA a uma concentração de 1ng/nL por meio de um micro-injetor (Drummond Scientific®, Broomall, Pensilvânia, EUA). Em seguida, os oócitos foram incubados em solução contendo (mM): 96 NaCl;

2 KCl; 1,8 CaCl₂; 2 MgCl₂ e 5 HEPES (pH 7,4), suplementado com 50 mg / L de sulfato de gentamicina para a expressão dos canais de sódio.

- **Experimentos em *Two-Microelectrode Voltage Clamp***

Registros eletrofisiológicos de fixação de voltagem foram realizados através da técnica *Two-Microelectrode Voltage Clamp* a temperatura ambiente (18-22°C) em amplificador Geneclamp 500 (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA) controlados por um sistema de aquisição de dados pClamp (Axon Instruments, Union City, CA, USA). As micropipetas utilizadas possuíam resistência de 0,8-1,5 MΩ.

As correntes de sódio foram registradas de 1-4 dias após injeção do cRNA com filtro (1 kHz) e digitalizadas a 20 kHz. As micropipetas foram preenchidas com solução interna contendo 3M KCl. Enquanto no banho foi usada solução externa contendo (mM): 96 NaCl, 2 KCl, 2 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 5 HEPES, (pH ajustado para 7,4).

- **Protocolo Experimental**

Para análise do efeito de 1 μM do peptídeo Ap1a sobre os canais BgNav1 e VdNav1, as correntes de sódio (I_{NA}) foram medidas na voltagem de corrente máxima do controle ($V_{m\acute{a}x}$) por 100 ms, sendo o potencial de repouso definido como -90 mV (Figura 7).

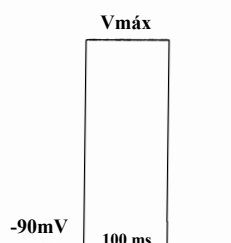


Figura 7. Protocolo de estímulo utilizados nos ensaios eletrofisiológicos de *Two-Microelectrode Voltage Clamp*.

Foram analisadas 3 oócitos de cada canal. Todos os dados foram analisados através dos *softwares* pClamp Clampfit 10.0 (Molecular Devices ®, Downingtown, Pennsylvania, USA) e Origin 7.5 (Originlab ®, Northampton, Massachusetts, USA).

Os ensaios eletrofisiológicos em oócitos de *X. laevis* utilizando a técnica *Two-Microelectrode Voltage Clamp* foram realizados no Laboratório de Toxinologia da Universidade Católica de Leuven, Bélgica, coordenado pelo professor Dr. Jan Tytgat.

4.5.3 Ensaios Eletrofisiológicos em Canais de Potássio Dependentes de Voltagem de Insetos

- **Cultura de Células**

Células HEK (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) foram transfectadas com um vetor contendo cDNA de canais de K⁺ de inseto do tipo Shal e Shaw. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e uma combinação de penicilina (50 unidades/mL), estreptomicina (50 µg/mL) e sulfato de gentamicina (50 µg/mL). As células foram incubadas em um atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

Células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) foram infectadas com o baculovírus recombinante *Autographa californica* contendo canais de K⁺ de inseto do tipo Shaker B (número de acesso Gen Bank: X07132) e dShab11 (número de acesso Gen Bank: M32659). As células foram cultivadas em meio Grace's suplementado com 10% de soro fetal bovino e uma combinação de penicilina (50 unidades/mL), estreptomicina (50 µg/mL) e sulfato de gentamicina (50 µg/mL). As células foram armazenadas a 27°C e os ensaios eletrofisiológicos foram executados 2 dias após infecção.

- **Experimentos em *Whole-cell Patch-Clamp***

Registros eletrofisiológicos de fixação de voltagem (*voltage-clamp*) no modo *Whole-Cell* foram realizados a temperatura ambiente (22-25°C) em amplificador EPC-10 *patch-clamp* (HEKA Electronics, Rheinland-Pfalz, Germany). As micropipetas utilizadas possuíam resistência de 0,9-1,4 MΩ. As correntes de potássio foram registradas com filtro (2,9 kHz). Para os experimentos, foram utilizadas as células que apresentaram uma resistência em série (Rs) menor que 6 MΩ e uma compensação da Rs de, no mínimo, 70%. As micropipetas para os canais Shaw e Shal foram preenchidas com solução interna contendo (mM): 90 KF, 30 KCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES (pH ajustado para 7,2 com TMA). Para a mensuração

das correntes de potássio do tipo Shaw e Shal foram usadas soluções externa contendo (mM): 157 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 10 HEPES (pH ajustado para 7,2 com NaOH). Já as micropipetas para os canais Shaker B e dShab11 foram preenchidas com solução interna contendo (mM): 90 KF, 30 KCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA-K, 10 HEPES (pH ajustado para 7,2 com KOH). Para a formação do selo, foi utilizada uma solução contendo (mM): 145 NaCl, 0,5 CaCl₂, 10 MgCl₂, 2 KCl, 10 HEPES (pH ajustado para 7,2 com NaOH). Para a mensuração das correntes de potássio Shaker B e dShab11 foi usada solução externa contendo (mM): 145 NaCl, 10 CaCl₂, 10 HEPES (pH ajustado para 7,2 com NaOH).

• Protocolo Experimental

Para análise do efeito de 1 μ M do peptídeo Ap1a sobre os canais Shal, Shaw e Shab, as correntes de potássio (I_K) foram medidas com pulsos de +10mV variando o potencial da membrana de -50 até 50 mV (intervalo de 3 segundos entre cada pulso), enquanto os canais do tipo Shaker foram medidas de -30 até 50 mV (intervalo de 15 segundos entre cada pulso de +10mV). O potencial de repouso de todas as linhagens foi definido como -80 mV (Figura 8).

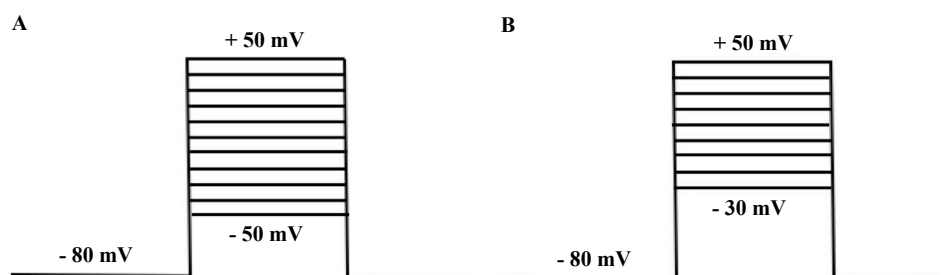


Figura 8. Protocolos de estímulo dos canais Shal, Shaw e Shab (A) e Shaker (B) utilizados nos ensaios eletrofisiológicos de *Patch-Clamp* no modo *Whole Cell*.

Após injeção da toxina, o efeito da Ap1a foi avaliado no tempo de 10 minutos e, logo em seguida, foi realizada a lavagem do peptídeo. Foram analisadas 3 células de cada subtipo de canal potássio.

Os ensaios eletrofisiológicos em canais de potássio foram realizados pelo Dr. Froylan Lagunas, com auxílio de seus alunos Carolina Barriga, Daniel Balleza e Arturo Reyes da Faculdade de Medicina da *Universidad Nacional Autónoma de*

México (UNAM), México-DF, durante minha missão científica como parte do projeto de colaboração bilateral estabelecido com o apoio do CNPq e do CONACyT.

4.6 Ensaio de Ligação de [3,4-³H]-L-glutamato

4.6.1 Preparo das Membranas Sinápticas

O preparo das membranas sinápticas (sinaptossomas) foi realizado utilizando córtex cerebral de ratos *Wistar* macho (200-250 g), conforme descrito por Bermejo et al., 2014. Após os animais serem sacrificados por meio de deslocamento cervical e decapitados, o crânio foi exposto e os cérebros foram imediatamente removidos. A região cortical de cada animal foi, então, separada em duas metades e armazenada em solução de sacarose 0,32M. A fim de manter a integridade do tecido, os córtex foram mantidos durante todo o procedimento em banho de gelo.

Em seguida, os córtex foram cinco vezes homogeneizados em um desruptor de células Ultra-Sônico (Unique DES5000) com 90 watts (RMS) de potência por 45 segundos cada. O homogeneizado obtido foi centrifugado em rotor SS-34 à 900 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado, mas desta vez a 20.442 xg por 20 minutos a 4°C. Antes que o sobrenadante fosse totalmente descartado, uma alíquota (A1) de 500 µL foi separada para posterior quantificação e o precipitado formado foi reconstituído e homogeneizado em um volume de 6 mL de sacarose 0,32M, sendo uma alíquota (A2) de 500 µL também separada.

Após a preparação do gradiente descontínuo de sacarose, descrito na seção 4.6.2, o homogeneizado foi, então, cuidadosamente adicionado à última camada do gradiente descontínuo de sacarose e ultracentrifugado a 21.500 xg por 3 horas a 4°C.

A fração de membranas sinaptossomal (FMS) foi visualizada no gradiente descontínuo de sacarose (GDS), sendo retirada do gradiente com o auxílio de uma pipeta sorológica. O volume de suspensão de sinaptossoma foi medido e, em seguida, foi adicionado 1,5 V de tampão Tris-HCl 5mM, pH7,4. O homogeneizado foi centrifugado a 27.216 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi completamente descartado e o precipitado foi reconstituído em um volume de 5 mL de tampão Tris-HCl 5mM, pH 7,4, sendo uma alíquota (A3) de 500 µL também separada.

Após a retirada da alíquota, o homogeneizado permaneceu por 30 minutos sobre agitação branda e em banho de gelo. O material foi, então, centrifugado quatro vezes a 30.966 xg por 5 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante de cada etapa descartado e o precipitado reconstituído em 5 mL de tampão Tris-HCl. Uma quinta centrifugação foi feita a 30.966 xg por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi novamente descartado e, desta vez, o precipitado foi reconstituído em 2 mL de tampão Tris-HCl, tendo seu conteúdo proteico determinado pelo método de Lowry et al., 1951, modificado por Hartree, 1972, utilizando albumina bovina como padrão.

As membranas sinápticas assim obtidas foram alíquotadas em *ependorfs*, centrifugadas a 16.000 rpm a 4°C por 5 minutos e estocadas a -20 °C, por no mínimo 18 horas e no máximo 30 dias para os testes.

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília com o número de processo 30/2017.

4.6.2 Gradiente Descontínuo de Sacarose (GDS)

O Gradiente Descontínuo de Sacarose foi feito em tubo especial para centrífuga refrigerada, sendo a primeira camada constituída por 3,5 mL de solução de sacarose a 1,2 M. A segunda camada, constituída de 3,0 mL de solução de sacarose a 1,0 M, e a terceira camada, constituída de 3,0 mL de solução de sacarose a 0,8 M, foram cuidadosamente adicionadas em ordem com o auxílio de uma pipeta (Figura 9).

Após a realização do GDS, o homogeneizado mencionado da seção 4.6.1 foi cuidadosamente acrescentado na última camada, ou seja, logo após a terceira camada de solução de sacarose e ultracentrifugado a 21.500 xg por 3 horas a 4°C. Em seguida, o tubo foi retirado cuidadosamente da ultracentrífuga para que não houvesse perturbação no gradiente formado (Figura 9). As duas primeiras camadas geradas, constituídas por mielina e solução de sacarose a 0,8 M, respectivamente, foram removidas e desprezadas. Por fim, a fração de membranas sinaptossomais (FMS), a qual se encontrava na interfase das camadas de sacarose a 1,0 M e 1,2M, foi retirada com auxílio de uma pipeta *pasteur* (Figura 9).

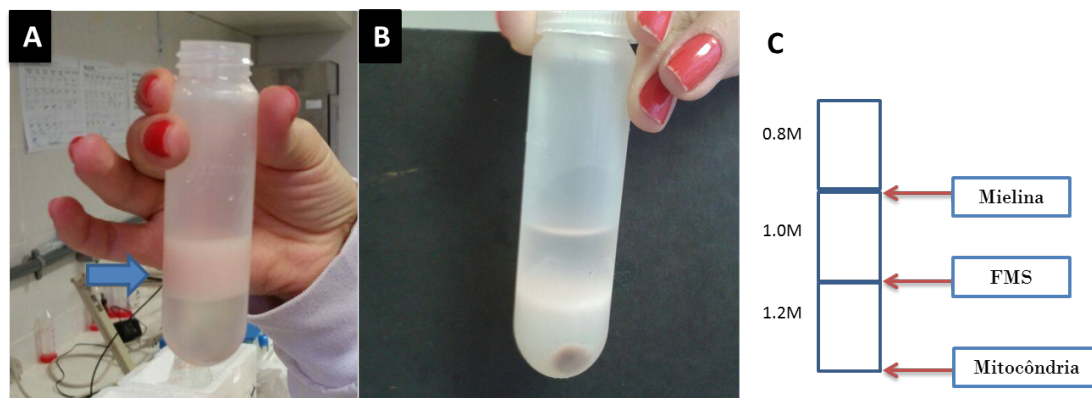


Figura 9. Representação esquemática do gradiente descontínuo de sacarose (GDS) antes e após ultracentrifugação. **Imagem A:** após a preparação do gradiente, o homogeneizado reconstituído em sacarose 0,32M é cuidadosamente acrescentado na última camada, indicada pela seta azul. As fases do GDS somente são visíveis quando o tubo é mantido contra a luz, não sendo possível identifica-las nesta foto. **Imagem B:** após a ultracentrifugação, o homogeneizado separa-se em várias frações. A fração entre as camadas de 0,8 e 1,0M de sacarose é constituída de membranas de mielina. As fração entre as camadas 1,0 e 1,2M de sacarose apresenta a FMS, a qual é recolhida com o auxílio de uma pipeta *pasteur*. O sedimento formado no fundo do tubo corresponde as mitocôndrias. **Imagem C:** representação esquemática das camadas do homogeneizado organizadas entre as diferentes concentrações de sacarose (0,8M; 1,0M e 1,2M). Imagem cedida por Andreia Biolchi Mayer.

4.6.3 Ensaio de Ligação de [3,4-³H]-L-glutamato

O ensaio iniciou-se com o descongelamento das membranas sinápticas, as quais foram cinco vezes lavadas com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) e centrifugadas a 20.500 xg por 5 minutos a 4 °C em cada lavagem. Após a última centrifugação, as membranas precipitadas foram ressuspensas em 2,8 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, a fim de que a concentração final da proteína ficasse com 1 mg/mL. A reação foi iniciada com a adição de 50nM de [3,4 ³H]- L-glutamato (PerkinElmer®) e tampão à suspensão de membranas na presença ou ausência de seis diferentes concentrações de peptídeo Ap1a, diluídas em série (1000 a 0,01 μM – concentração final) em um volume final de 152 μl por tubo. O controle positivo (frio) foi feito com o glutamato não marcado a uma concentração final de 1mM. Os tubos foram incubados a 37 °C sob agitação por 10 minutos. Para finalizar a reação de ligação, foi realizada uma centrifugação a 20.500 xg por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados, lavados com água destilada gelada e, em seguida, acrescidos de 125 μL de Tris-HCl 50mM, ressuspensos e, em seguida, acrescidos de 125 μL de líquido de cintilação biodegradável – *Packard*

Topcount NXT (PerkinElmer®). A radioatividade das amostras foi lida em cintilador líquido. A análise estatística dos resultados obtidos foi feita por meio de regressão não linear através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão (n= 3).

Tabela 5. Distribuição dos volumes dos tubos utilizados no ensaio de ligação de [3,4 3 H]-L-glutamato.

μ L/ tubo	Vazio (1-2)	Basal (3-4)	Quente (5-6)	Frio (7-8)	Peptídeo (9-14)
Glu frio	-	-	-	10 μ L	0
Glu [H^{3+}]	-	-	4 μ L	4 μ L	4 μ L
Membranas	-	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Tris	-	52 μ L	48 μ L	38 μ L	38 μ L
Peptídeo	-	-	-	-	10 μ L

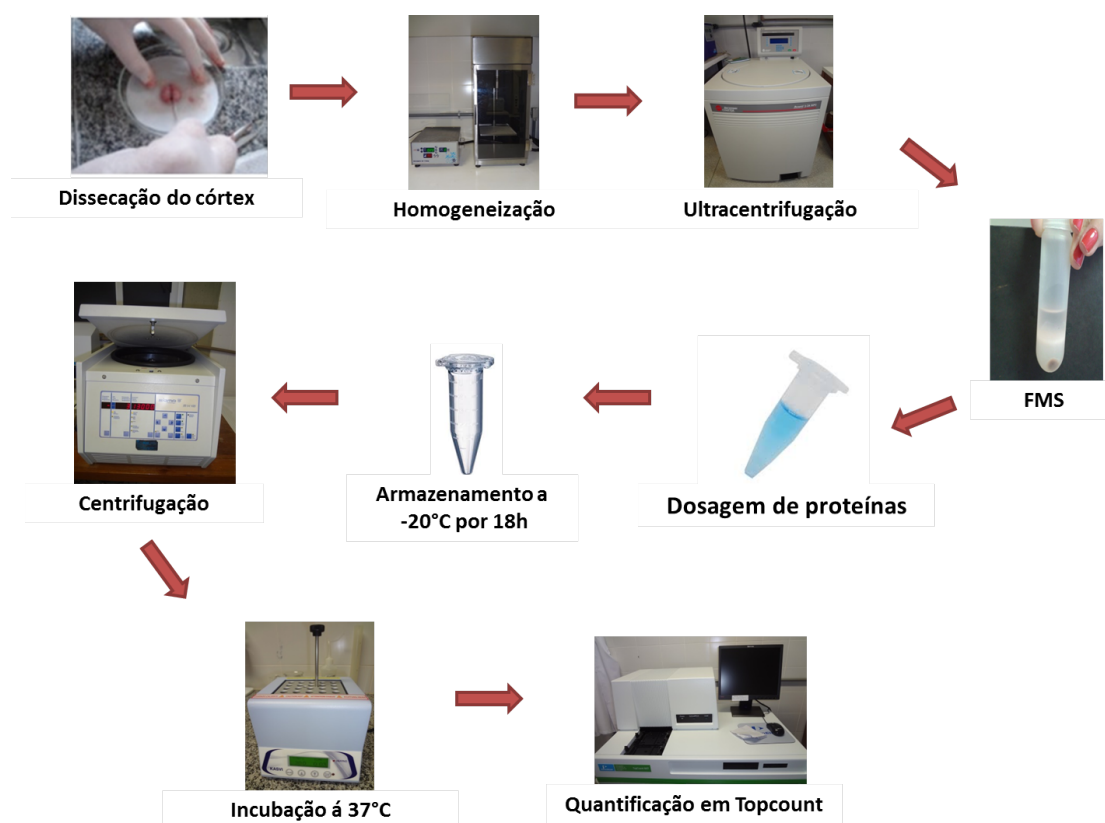


Figura 10. Resumo das etapas realizadas durante o ensaio de ligação de [3,4 3 H]-L-glutamato. Imagem cedida por Andreia Biolchi Mayer.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 48 cromatografias da peçonha bruta de *Acanthoscurria paulensis* para obtenção da fração de interesse, denominada Ap1a, a qual eluiu, aproximadamente, entre 48-51 minutos (38-41% de acetonitrila) (Figura 11). Para purificação da fração de interesse realizou-se uma recromatografia com gradiente de acetonitrila otimizado (Figura 12). A avaliação do grau de pureza do peptídeo de Ap1a foi feita por espectrometria de massa em sistema MALDI TOF/TOF Ultraflex III. A massa molecular obtida foi de $[M + 3H]^{3+} = 1.819,976$, o equivalente a $[M + H]^+ = 5.457,928$ (Figura 13).

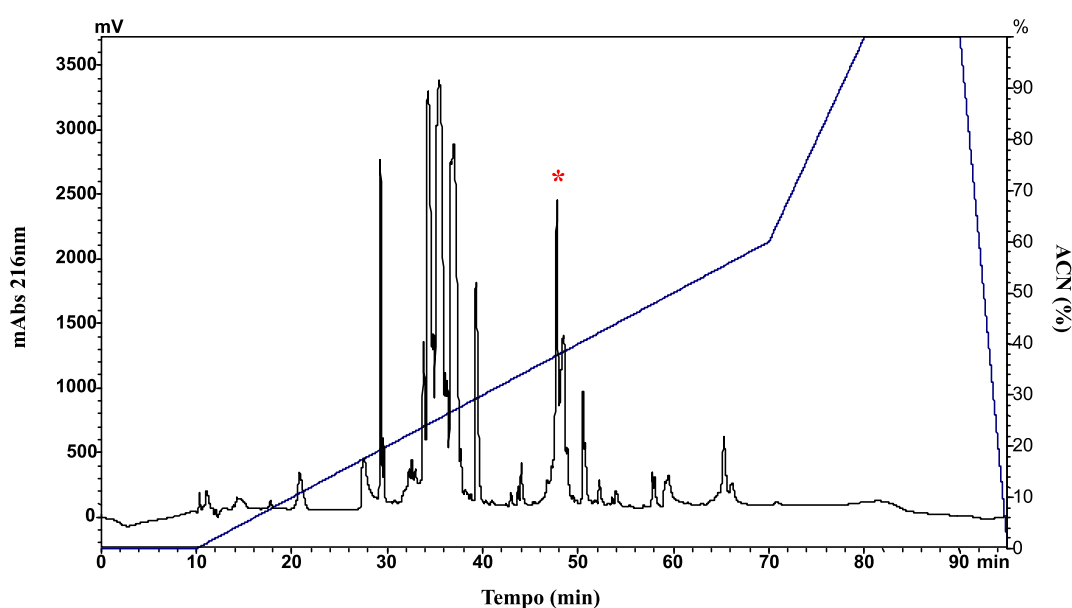


Figura 11. Cromatografia da peçonha bruta *A. paulensis* por RP-HPLC utilizando-se de 5 mg. O fracionamento foi realizado por meio de uma coluna semipreparativa C18 (phenomenex) com um gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha azul, com um fluxo de 1,5 ml/min e absorbância monitorada a 216 nm. Em destaque, a fração Ap1a.

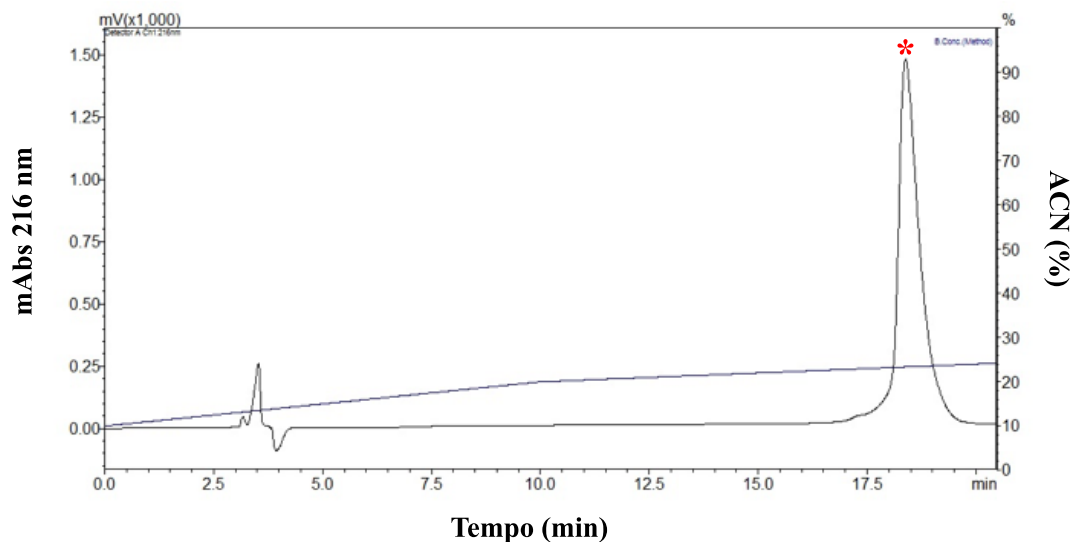


Figura 12. Purificação de peptídeo Ap1a. O fracionamento foi realizado por meio de uma coluna analítica C18 (phenomenex) com um gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha azul, com um fluxo de 1,0 ml/min e absorvância monitorada a 216 nm. Em destaque, a fração Ap1a.

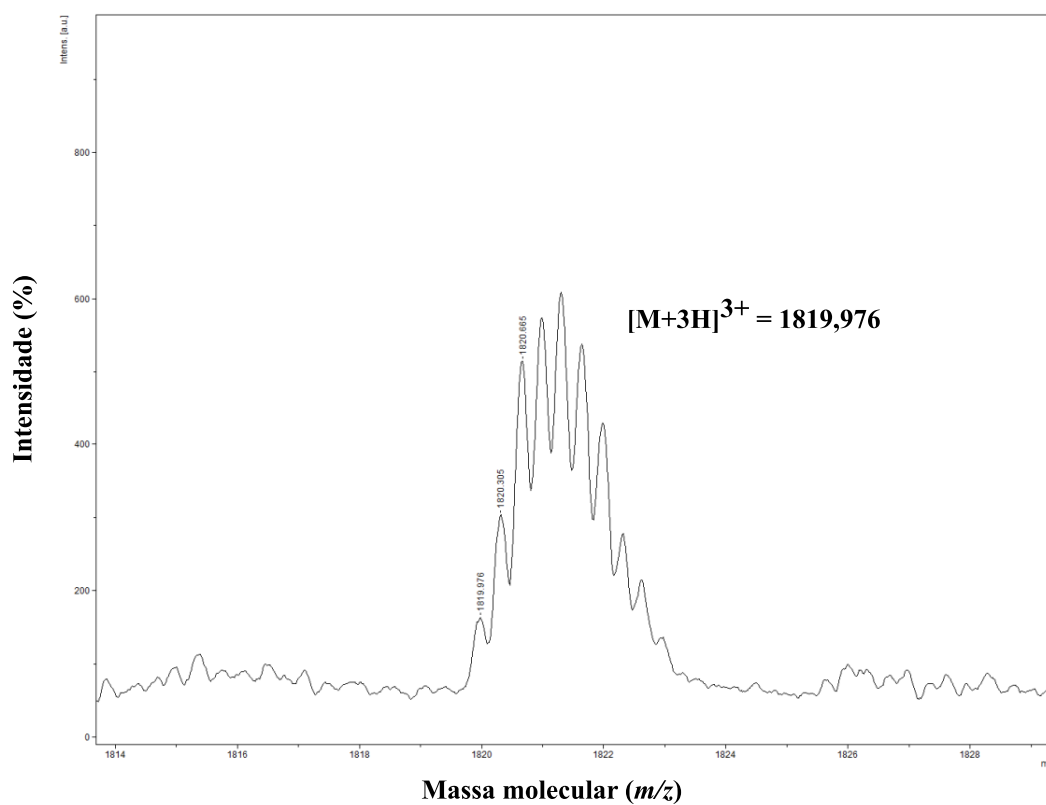


Figura 13. Avaliação do grau de pureza do peptídeo de Ap1a. Espectro de massa molecular do peptídeo Ap1a obtido por MALDI TOF/TOF Ultraflex III, observando-se a distribuição monoisotópica do íon com 3 prótons.

Comparando a sequência primária do peptídeo Apl1a com as de toxinas de aranhas caranguejeiras previamente descritas (Figura 14), observou-se que esse apresenta 95,74% de identidade com a toxina An1a, um peptídeo isolado da peçonha da aranha *Acanthoscurria natalensis*, o qual em ensaios eletrofisiológicos no modo *current-clamp* em nervo de barata *Periplaneta americana* (neurônios DUM-*dorsal unpaired median neurons*) induz a despolarização da membrana, aumenta a frequência de disparos espontâneos e reduz a amplitude do potencial de ação. Já no modo *voltage-clamp* em nervo de barata *P. americana*, o peptídeo An1a (100 nM) bloqueia parcialmente as amplitudes de corrente de sódio dependentes de voltagem sem apresentar efeito na sua dependência de voltagem (Rates et al., 2013). O peptídeo Apl1a também apresentou 82,05% de identidade com a toxina Omega-TRTX-Bs1a, caracterizada da peçonha de *Brachypelma smithi* (Kaiser et al., 1994), cuja atividade biológica não foi ainda elucidada. Além disso, há 79,49% de identidade com os peptídeos Omega-TRTX-Ba1a e Omega-TRTX-Ba1b, advindos da peçonha da aranha *Brachypelma ruhnai*, os quais não são tóxicos em camundongos quando injetados via intracranial ou intraperitoneal, sob as doses de 3 $\mu\text{g } 20 \text{ g}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g } 20 \text{ g}^{-1}$, respectivamente. Contudo, esses peptídeos apresentam toxicidade e letalidade em grilos *Acheta domestica*, com uma LD_{50} de $10,8 \pm 1,4 \mu\text{g g}^{-1}$ (Omega-TRTX-Ba1a) e $9,2 \pm 0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ (Omega-TRTX-Ba1b). Tanto Omega-TRTX-Ba1a quanto Omega-TRTX-Ba1b não atuam como antagonistas na condutância de sódio em insetos (Para/tipE) ou mamíferos ($\text{Na}_v 1.2$ e $\text{Na}_v 1.5$) (Corzo et al., 2009). Dentre os peptídeos Mu/Omega-TRTX-Hs1a, U1-TRTX-Hs1a, U2-TRTX-Hs1b, Mu-TRTX-Hs2a e Omega-TRTX-Hs2a, também conhecidos como HWTX-I, HWTX-II, HWTX-III, HWTX-IV e HWTX-V, respectivamente, o peptídeo Apl1a apresentou maior identidade (67,57%) por U1-TRTX-Hs1a (HWTX-II). Como mencionado anteriormente, o peptídeo HWTX-II, com 37 resíduos de aminoácidos e 3 pontes dissulfeto, possui atividade paralítica dose-dependente em baratas ($\text{EC}_{50} = 127 \pm 54 \mu\text{g/g}$) e bloqueia a transmissão neuromuscular em preparação de nervo frênico extraído de diafragma de camundongos (Shu & Liang, 1999).

sp	Accession	Protein	Sequence	Aa	% Id
sp	P82959	U1-theraphotoxin-Hsla	LFECFSFCEIEKGD---KPKK-----KPKKGGWK-CKFNMCVKV	37	67.57
sp	B3EWY4	U1-theraphotoxin-Apla	IIECFFSCEIEKDGKSKGKPKPKGDK-----NRDKKCSGGWR-CIKMKLKI	48	100.00
sp	B3AOP0	Mu-theraphotoxin-Anla	IIECFFSCEIEKDGKSKGKPKPKGDK-----DKDKKC-GGWR-CIKMKIKI	47	95.74
sp	P61506	U1-theraphotoxin-Lplb	FFECTLECDIKKE----GKPKPKGCKCNDKDNKDHKKCSGGWR-CIKLKLKLF	49	65.12
sp	Q5Q114	U1-theraphotoxin-Lsplb	LFECTFECDIKKE----GKPKPKGCKCDDKDNKDHKKCSGGWR-CIKLKLKLI	49	69.77
sp	P0CC18	U1-theraphotoxin-Lpla	FFECTFECDIKKE----GKPKPKGCKCDDKDNKDHKKCSGGWR-CIKLKLKLF	49	67.44
sp	P0CC19	U1-theraphotoxin-Lspla	FFECTFECDIKKE----GKPKPKGCKCDDKDNKDHKKCSGGWR-CIKLKLKLF	49	67.44
sp	Q5Q113	U1-theraphotoxin-Lspl	FFECTFECDIKKE----GKPKPKGCKCDDKDNKDHKKCSGGWR-CIKLKLKLF	49	67.44
sp	P85497	Omega-theraphotoxin-Bala	IIECFFSCEIEKDGKSKGKPKPKGDK-----EKKCTGGWR-CIKMKLKI	39	79.49
sp	P85504	Omega-theraphotoxin-Balb	IFECVFSCDIEKE----GKPKPKG-----EKKCTGGWR-CIKMKLKI	39	79.49
sp	P0DMD9	Omega-theraphotoxin-Balc	IIECFFSCEIEKDGKSKGKPKPKGDK-----EKKCTGGWR-CIKMKLKI	39	79.49
sp	P49265	Omega-theraphotoxin-Bsla	IFECVFSCDIEKE----GKPKPKG-----EKKCSGGWK-CIKMKLKI	39	82.05
sp	P61510	Omega-theraphotoxin-Asplg	IFECVFSCDIEKE----GKPKPKG-----EKKCSGGWK-CIKMKLKI	39	82.05
sp	P61509	Omega-theraphotoxin-Asplf	IFECVFSCDIEKE----GKPKPKG-----EKKCTGGWK-CIKMKLKI	39	79.49
sp	P61104	Omega-theraphotoxin-Hs2a	--ECRWY-----LGGCSQD-GDCK---H--LQCHSNYEWCVWDGTF--	35	16.13
sp	P61103	U2-theraphotoxin-Hslb	--DCAGY-----MRECKE--KLCCS---G--YVCSRWKWCVLPAP---	32	25.00
sp	P56676	Mu/omega-theraphotoxin-Hsla	--ACKGV-----FDACTPGKNECCP---N--RVCSDKHKWCKWKL----	33	31.03
sp	P83303	Mu-theraphotoxin-Hs2a	--ECLEI-----FKACNPSNDQCCK---SSKLVCSRKTRWCKYQI----	35	35.48

Figura 14. Alinhamento por Clustal Omega da sequência primária do peptídeo Apla com outros de peptídeos das peçonhas de aranhas caranguejeiras. AA se refere ao número de resíduos de aminoácidos dos peptídeos; %Id, a porcentagem de identidade dos peptídeos em relação à toxina Apla. Espaços (-) foram introduzidos a fim de maximizar o alinhamento. (*) corresponde a resíduos idênticos na mesma coluna; (.), substituições semiconservativas.

5.1 Ensaio Eletrofisiológico em Canais de Sódio Dependentes de Voltagem de Mamíferos

A fim de avaliar a atividade do peptídeo Apla, foram realizados ensaios em canais de sódio do tipo hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7 a uma concentração de 1 μ M. A atividade sobre os canais iônicos foi determinada pela alteração da amplitude da corrente iônica e pela variação do valor de $V_{1/2}$ ($\Delta V_{1/2}$) entre a condição controle e tratada com a Apla, tanto na ativação quanto na inativação lenta. Além disso, tal atividade também foi avaliada utilizando o protocolo experimental com pré-pulso (0 mV) e sem pré-pulso, com intuito de avaliar se o pré-pulso potencializaria a atividade da toxina.

As alterações na amplitude da corrente iônica decorrentes da injeção de 1 μ M de Apla foram realizadas por meio da análise da ativação na voltagem de maior corrente do controle, a qual variou entre -5 e 0 mV. Os valores da inibição da corrente iônica executando o protocolo experimental com pré-pulso foram de 23,70 % \pm 5,73, 17,26 % \pm 2,51 e 32,43 % \pm 4,93 para os canais hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, respectivamente (Figura 15). Ao se executar o protocolo experimental sem pré-pulso, os valores da inibição da corrente iônica resultantes foram de 23,80 % \pm 5,98, 12,31 % \pm 1,72, 27,40 % \pm 4,95 para os canais hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, respectivamente. As análises estatísticas de teste T pareado (n=8) determinaram que o

peptídeo Ap1a modula significativamente a inibição da corrente iônica dos canais de sódio hNa_v 1.1 e hNa_v 1.3 e que não há diferença significativa na inibição da corrente iônica desses canais entre os protocolos com pré-pulso e sem pré-pulso. Já as análises do canal hNa_v 1.7 determinaram que o peptídeo Ap1a modula significativamente a inibição da corrente iônica, mas que há diferença significativa entre inibição da corrente iônica entre protocolo com pré-pulso e sem pré-pulso (Tabela 6).

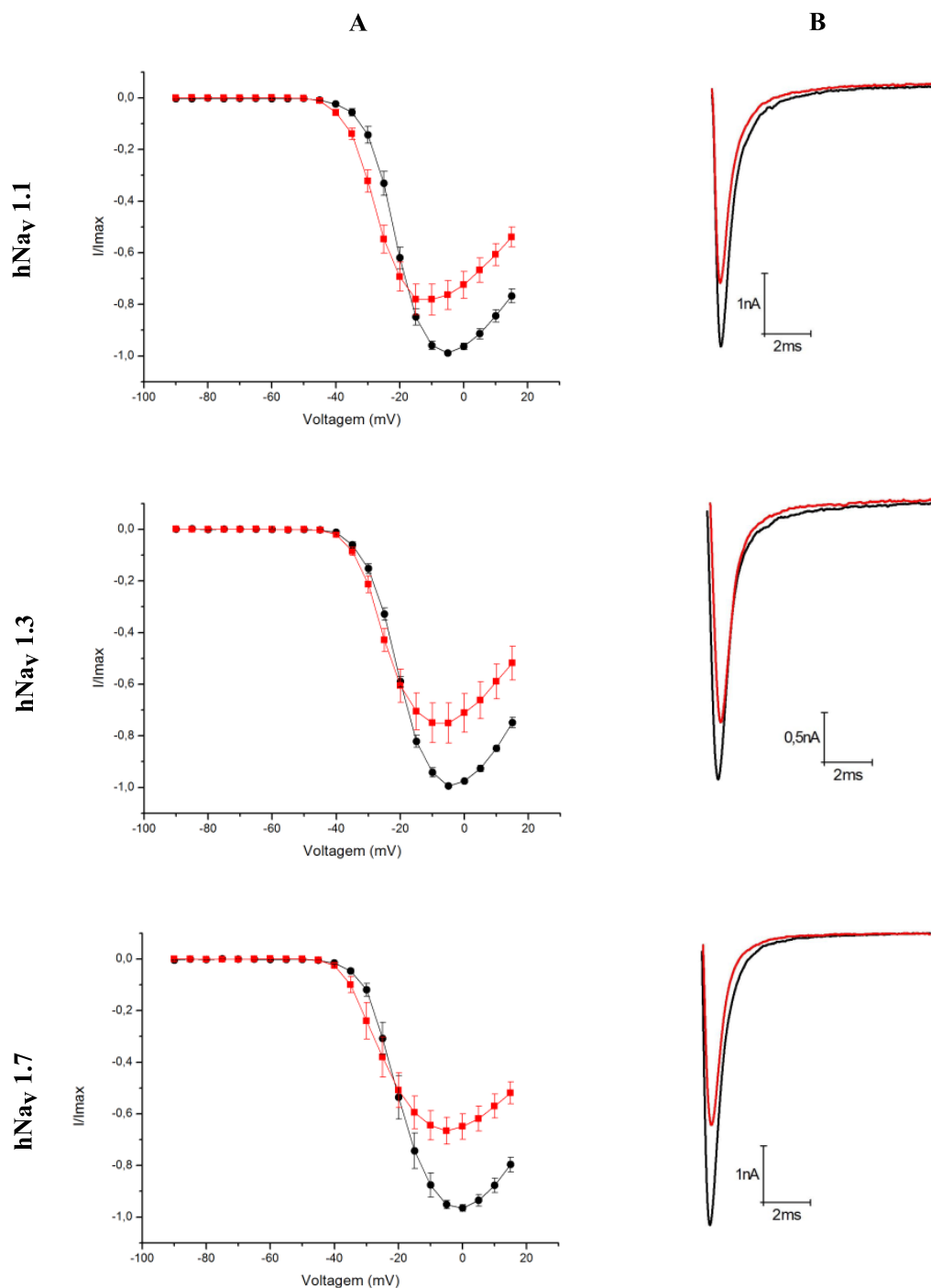


Figura 15. Curva $I_{Na}-V$ x Traços dos registros eletrofisiológicos representando a alteração na amplitude da corrente iônica. Imagens A representam a média \pm erro padrão ($n=8$) da relação corrente x voltagem obtida por meio do protocolo de estímulo com pré-pulso em hNav_v 1.1, hNav_v 1.3 e hNav_v 1.7, respectivamente. Bolas pretas representam valores de corrente do controle, quadrados vermelhos representam valores de corrente da toxina Ap1a à 1 μ M. Imagens B representam a alteração da amplitude da corrente iônica obtida por estímulos com pré-pulso a 0 mV nos canais hNav_v 1.1, hNav_v 1.3 e hNav_v 1.7, respectivamente. Traços pretos representam a amplitude da corrente iônica do controle e traços vermelhos, a amplitude da corrente iônica da toxina Ap1a à 1 μ M.

Tabela 6 . Significância da amplitude da corrente iônica x Protocolo de estímulo. A fim de avaliar se houve diferença significativa entre o protocolo de estímulo com pré-pulso (PP) e sem pré-pulso (SPP), realizou-se análises estatísticas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão (n= 8). Inibição PP representa o valor de alteração da corrente iônica com pré-pulso e Inibição SPP representa o valor de alteração da corrente iônica sem pré-pulso.

	Inibição PP (%)	Inibição SPP (%)	Diferença significativa entre PP e SPP	Diferença significativa entre controle e Ap1a
hNa_v 1.1	23,70 \pm 5,73	23,80 \pm 5,98	Não	Sim
hNa_v 1.3	17,26 \pm 2,51	12,31 \pm 1,72	Não	Sim
hNa_v 1.7	32,43 \pm 4,93	27,40 \pm 4,95	Sim	Sim

Em relação à ativação dos canais de sódio testados, os valores de $\Delta V_{1/2}$ resultantes da injeção de 1 μ M de Ap1a executando o protocolo experimental com pré-pulso foram de - 6,58 mV \pm 0,72; - 4,84 mV \pm 0,53 e - 4,70 mV \pm 0,87 para os canais hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, respectivamente (Figura 16). Ao se executar o protocolo experimental sem pré-pulso, os valores de $\Delta V_{1/2}$ resultantes foram de - 6,58 mV \pm 0,72; - 4,68 mV \pm 0,77 e - 5,07 mV \pm 1,15 para os canais hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, respectivamente. As análises estatísticas de teste T pareado (n=8) determinaram que o peptídeo Ap1a modula significativamente a ativação dos canais de sódio testados e que não há diferença significativa na ativação entre os protocolos com pré-pulso e sem pré-pulso (Tabela 7).

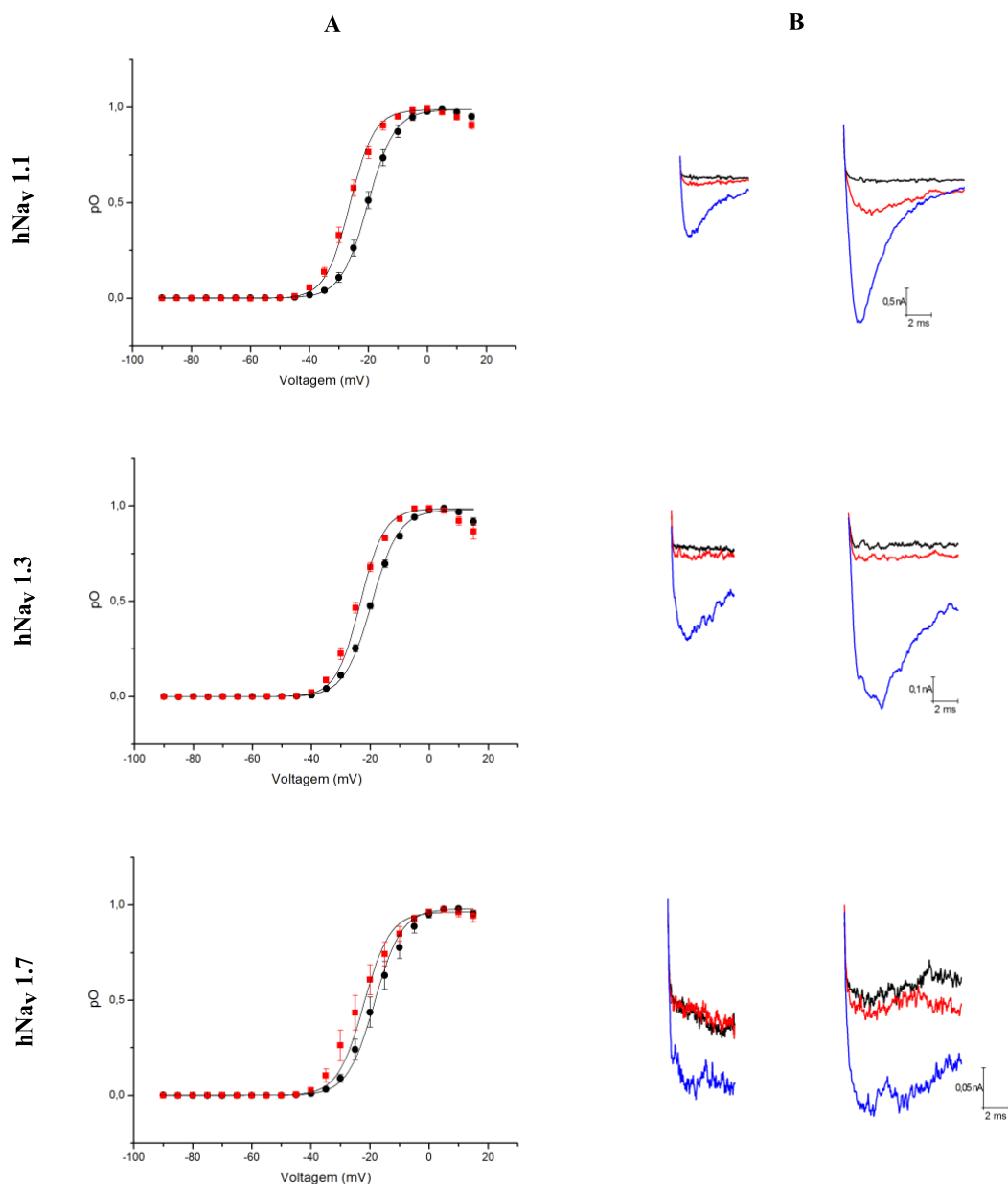


Figura 16. Relação $\Delta V_{1/2}$ x Abertura do canal obtida por meio do protocolo de estímulo com pré-pulso das diferentes isoformas. Imagens A representam a média \pm erro padrão ($n=8$) da relação condutância (pO) x voltagem obtida por meio do protocolo de estímulo com pré-pulso em hNav 1.1, hNav 1.3 e hNav 1.7, respectivamente. Bolas pretas representam valores de condutância do controle, quadrados vermelhos representam valores de condutância da toxina Ap1a à $1 \mu\text{M}$, linhas pretas representam a função de Boltzmann para os valores de condutância tanto do controle quanto da toxina. Imagens B representam a abertura do canal obtida por estímulos a -50mV (linha preta), -40mV (linha vermelha) e -30mV (linha azul) em hNav 1.1, hNav 1.3 e hNav 1.7, respectivamente. Imagens à esquerda representam o controle e as imagens à direita representam a abertura do canal após injeção da toxina Ap1a à $1 \mu\text{M}$.

Tabela 7. Significância $\Delta V_{1/2}$ da ativação x Protocolo de estímulo. A fim de avaliar se houve diferença significativa entre o protocolo de estímulo com pré-pulso (PP) e sem pré-pulso (SPP), realizou-se análises estatísticas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão (n= 8). AtiPP ($\Delta V_{1/2}$) representa o valor de $\Delta V_{1/2}$ da ativação com pré-pulso e AtiSPP ($\Delta V_{1/2}$) representa o valor de $\Delta V_{1/2}$ da ativação sem pré-pulso.

	AtiPP ($\Delta V_{1/2}$)	AtiSPP ($\Delta V_{1/2}$)	Diferença significativa entre PP e SPP	Diferença significativa entre controle e Ap1a
hNa_v 1.1	-6,58 \pm 0,72 mV	-6,58 \pm 0,72 mV	Não	Sim
hNa_v 1.3	-4,84 \pm 0,53 mV	-4,68 \pm 0,77 mV	Não	Sim
hNa_v 1.7	-4,70 \pm 0,87 mV	-5,07 \pm 1,15 mV	Não	Sim

Quanto à inativação lenta, os valores de $\Delta V_{1/2}$ resultantes da aplicação de 1 μ M de Ap1a executando o protocolo experimental com pré-pulso foram de - 2,33 mV \pm 0,72; - 4,11 mV \pm 1,22 e - 4,31 mV \pm 0,78 para os canais hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, respectivamente (Figura 17). Ao se executar o protocolo experimental sem pré-pulso, os valores de $\Delta V_{1/2}$ resultantes foram de - 2,08 mV \pm 0,63; - 2,63 mV \pm 1,23 e - 4,06 mV \pm 0,72 para os canais hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7, respectivamente. As análises estatísticas de teste T pareado (n=8) determinaram que o peptídeo Ap1a modula significativamente a inativação dos canais de sódio hNa_v 1.1 e hNa_v 1.7 e que não há diferença significativa na inativação lenta desses canais entre os protocolos com pré-pulso e sem pré-pulso. Já as análises do canal hNa_v 1.3 determinaram que o peptídeo Ap1a modula significativamente a inativação lenta apenas executando o protocolo com pré-pulso, isto é, não há diferença significativa entre o controle e a toxina durante a inativação lenta executando o protocolo sem pré-pulso (Tabela 8).

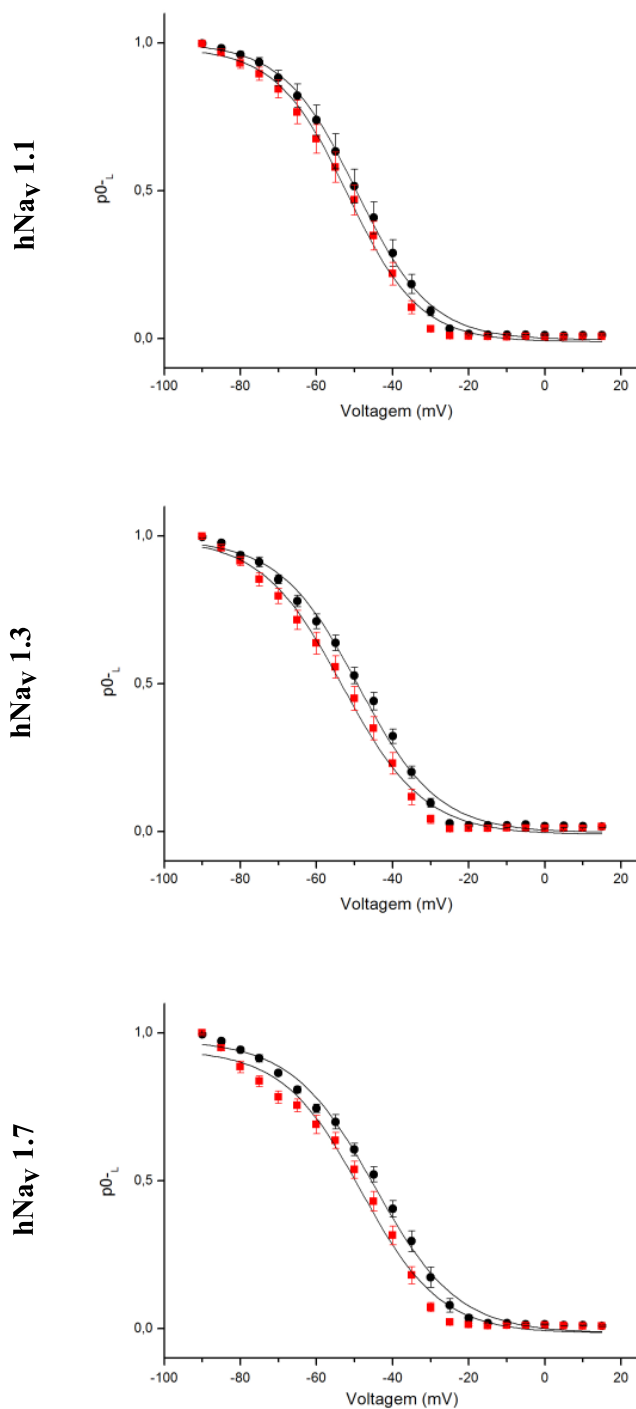


Figura 17. Relação Condutância x Voltagem durante a inativação lenta obtida por meio do protocolo de estímulo com pré-pulso nas diferentes isoformas. Imagens representam a média \pm erro padrão ($n=8$) da relação condutância x voltagem obtida por meio do protocolo de estímulo com pré-pulso em hNav 1.1, hNav 1.3 e hNav 1.7, respectivamente. Bolas fechadas representam valores de condutância do controle, quadrados vermelhos representam valores de condutância da toxina Apl a $1 \mu\text{M}$, linhas pretas representam a função de Boltzmann para os valores de condutância tanto do controle quanto da toxina.

Tabela 8. Significância $\Delta V_{1/2}$ da inativação lenta x Protocolo de estímulo. A fim de avaliar se houve diferença significativa entre o protocolo de estímulo com pré-pulso (PP) e sem pré-pulso (SPP), realizou-se análises estatísticas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão (n= 8). InatPP ($\Delta V_{1/2}$) representa o valor de $\Delta V_{1/2}$ da inativação lenta com pré-pulso e InatSPP ($\Delta V_{1/2}$) representa o valor de $\Delta V_{1/2}$ da inativação lenta sem pré-pulso.

	InatPP ($\Delta V_{1/2}$)	InatSPP ($\Delta V_{1/2}$)	Diferença significativa entre PP e SPP	Diferença significativa entre controle e Ap1a
hNa_v 1.1	-2,42 \pm 0,75 mV	-1,97 \pm 0,62 mV	Não	Sim
hNa_v 1.3	-4,05 \pm 1,16 mV	-2,02 \pm 1,23 mV	Sim	Sim/Não
hNa_v 1.7	-4,10 \pm 0,94 mV	-3,52 \pm 0,79 mV	Não	Sim

Sabe-se que canais Na_v 1.1 e Na_v 1.2 encontram-se, preferencialmente, em interneurônios GABAérgicos, os quais são responsáveis pela produção e liberação de GABA, principal neurotransmissor inibitório do SNC (Catterall, 2014). Perda de funções dos canais Na_v 1.1 e Na_v 1.2 decorrentes de mutações prejudicam a excitabilidade de neurônios GABAérgicos. Em consequência disso, cria-se um estado neuronal hiperexcitado, caracterizado como epilepsia. Mais de 20 mutações em canais Na_v 1.1 estão relacionadas ao distúrbio epiléptico autossômico dominante GEFS+, o qual provoca um quadro de epilepsia generalizada com fortes convulsões febris. Outras 600 mutações em canais Na_v 1.1 relacionam-se com a Síndrome de Dravet, uma grave epilepsia mioclônica acometida na infância. Quando comparado aos sintomas causados em canais Na_v 1.1, as mutações em canais Na_v 1.2 são menos severas. Mutações em canais Na_v 1.2 podem causar, por exemplo, convulsões neonatal-infantis benignas, uma síndrome de convulsão leve acometida em bebês de até um ano de idade e que, geralmente, responde favoravelmente ao tratamento com drogas antiepilépticas (Catterall, 2014).

O tratamento da epilepsia geralmente se dá por meio de drogas inibidoras não seletivas de canais de sódio, tais como: carbamazepina e valproato, as quais se ligam aos canais e os estabilizam em seu estado inativado, suprimindo, assim, certas crises epilépticas (Catterall, 2014). Uma vez que os canais Nav 1.1 são importantes para a iniciação do potencial de ação de interneurônios GABAérgicos, a ativação seletiva de

canais Nav 1.1 representam uma nova e potencial abordagem de tratamento da epilepsia (De Lera Ruiz & Kraus, 2015).

Canais Na_v 1.3, Na_v 1.7, Nav 1.8 e Na_v 1.9, por sua vez, estão relacionados com processos de nocicepção. Canais Na_v 1.7 encontram-se, preferencialmente, expressos em terminais periféricos de neurônios sensoriais, nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal (DRG) e nos terminais centrais de neurônios aferentes localizados nas lâminas superficiais da medula espinhal. Além disso, eles também são expressos em neurônios ganglionares trigeminais e simpáticos, em neurônios sensoriais viscerais e em neurônios sensoriais olfativos (De Lera Ruiz & Kraus, 2015). Estudos genéticos de pacientes com distúrbios de dor hereditária comprovaram que doenças como eritromelalgia (IEM) e transtorno de dor extrema paroxística (PEPD) estão associados a mutações no gene SCN9A, o gene o qual codifica canais Na_v 1.7. Quando tais mutações ocasionam ganho de função, as propriedades de ativação e inativação dos canais Na_v 1.7 são alteradas, gerando uma hipersensibilidade em neurônios DRG, que por sua vez, deixam as pessoas hipersensíveis à dor (Bennett & Woods, 2014; Dib-Hajj et al., 2012). Em contrapartida, quando tais mutações ocasionam perda de função, os canais Na_v 1.7 tornam-se não funcionais e as pessoas que as possuem são insensíveis à dor (Cox et al., 2006, 2010).

Mutações no gene SNC10A, o qual codifica canais Na_v 1.8, que são expressos em neurônios DRG e em neurônios ganglionares trigeminais e nodosos, também estão associados a processos de nocicepção. O ganho de função de canais Na_v 1.8 causa hipersensibilidade e disparo aberrante de neurônios DRG, sendo correlacionado a neuropatias dolorosas de pequenas fibras em seres humanos (Faber et al., 2012). Além disso, há estudos em roedores *knockout* que sugerem o envolvimento de canais Na_v 1.8 em dores inflamatórias e neuropáticas (Akopian et al., 1999; Dong et al., 2007).

Uma outra mutação relevante é a do gene SCN11A, o qual codifica canais Na_v 1.9, que são expressos em neurônios DRG e em neurônios ganglionares trigeminais. Recentemente, mutações no gene SNC11A foram associadas à inabilidade congênita de sentir dor em humanos. Ao contrário de indivíduos que possuem mutações no gene SCN9A, indivíduos com mutações no gene SNC11A possuem o olfato intacto. Todavia, indivíduos com mutações no gene SCN11A possuem fraqueza muscular leve (Leipold et al., 2013). Assim como nos canais Na_v 1.7 e Na_v 1.8, o ganho de função

de mutações em canais Na_v 1.9 também causa alterações nas propriedades do canal e acarreta em um aumento da excitabilidade de neurônios DRG (Zhang et al., 2013).

Quanto aos canais Na_v 1.3, pouco se sabe sobre o papel das mutações no gene *SCN3A*, o qual codifica tais canais, nos processos relacionados à dor. Entretanto, estudos com roedores evidenciaram um aumento nos níveis transcricionais de Na_v 1.3 em neurônios sensoriais pós axotomia e inflamação neuronal, sugerindo, assim, uma potencial contribuição de tais canais na hipersensibilidade e na dor neuronal (Hains et al., 2003).

Ao se avaliar o fenótipo clínico de quadros de insensibilidade à dor relacionada à Na_v 1.7, observa-se que tal insensibilidade é, geralmente, acompanhada de anosmia, um termo médico usado para a perda do sentido olfatório. Quando a insensibilidade à dor é relacionada à Na_v 1.9, observa-se distúrbios gastrointestinais e fraqueza muscular (Woods et al., 2014). Além disso, canais Na_v 1.8 e Na_v 1.9 estão presentes em células ganglionares da retina, em fotorreceptores, o que talvez inviabilizasse a criação de fármacos seletivos para esse canais, uma vez que tal criação poderia alterar o processamento visual na retina (O'Brien et al., 2008). Em resumo, canais Na_v 1.7 são um alvo irresistível para os pesquisadores que trabalham com dor.

A maioria dos bloqueadores de canais de sódio utilizados no tratamento da dor não são seletivos e são classificados como anestésicos locais, antiarrítmicos cardíacos de classe I (lidocaína, mexiletina), anticonvulsivantes (carbamazepina) e antidepressivos (amitriplina) (Nardi et al., 2012). Dentre esses, os antidepressivos e os anticonvulsivantes destacam-se pela capacidade de penetração no SNC, inibindo, assim, canais de sódio tanto na periferia, quanto no cérebro e na medula espinhal. Uma vez que esses fármacos bloqueiam de forma não seletiva, o potencial analgésico completo desses agentes se torna bastante limitado devido aos efeitos colaterais relacionados ao SNC e ao sistema cardiovascular, tais como tonturas, sedação, convulsões e cardiotoxicidade (De Lera Ruiz & Kraus, 2015).

Com base nisso, estudos com neurotoxinas advindas de aranhas, cobras, escorpiões, anêmonas do mar, entre outros tornam-se potenciais fontes de conhecimento tanto para a prospecção de novos fármacos quanto para o melhor entendimento à cerca da distribuição e da divergência dos canais iônicos, uma vez que as subunidades α de mamíferos compartilham mais de 75% de similaridade e que tais neurotoxinas por serem capazes de inibir ou modular seletivamente canais de

sódio, atuando em sítios menos conservados que as regiões formadoras de poro, são consideradas “peças” cruciais no processo de descoberta das funções fisiológicas dos canais de sódio dependente de voltagem (VGSCs) e na criação de fármacos mais específicos (Cai et al., 2015; Catterall, 2010).

Estudos eletrofisiológicos com o peptídeo Ap1a, 1 μ M, evidenciaram que este foi capaz de deslocar a ativação dos canais de sódio testados para voltagens mais hiperpolarizadas, além de ser capaz de inibir parcialmente a amplitude da corrente iônica, semelhantemente ao que ocorre com β toxinas escorpiônicas, as quais aumentam a ativação do canal por meio da ligação de neurotoxinas ao sítio 4, região formada pelas alças extracelulares que interligam os segmentos S3 e S4 do domínio II, e “aprisionam” o sensor de voltagem IIS4 na configuração ativada e na porção extracelular. As β toxinas escorpiônicas também reduzem a amplitude da corrente iônica (Cestèle et al., 1998), sugerindo assim, que o peptídeo Ap1a também possa atuar nesse mesmo sítio.

A toxina Magi 5, um peptídeo de 29 resíduos de aminoácidos encontrado tanto na peçonha da aranha *Macrothele gigas* (Japão) quanto na aranha *Macrothele raveni* (China), também atua como uma β toxina escorpiônica, sendo seletiva para mamíferos, capaz de se ligar ao sítio 4 dos canais rNav 1.2 e deslocar o estado de ativação para voltagens mais hiperpolarizadas. Além disso, assim como a Ap1a, a toxina Magi 5 também desloca o estado de inativação para voltagens mais hiperpolarizadas. Todavia, quando o $V_{1/2}$ da inativação da Magi 5 é comparado ao $V_{1/2}$ da ativação, um efeito menos pronunciado é observado (Corzo et al., 2003). Análises em NMR determinaram que uma parte da superfície do peptídeo Magi 5 é altamente carregada por cargas positivas, resultante da presença de 5 lisinas, apresentando apenas um resíduo Glu¹⁴, carregado negativamente. Já a outra parte da superfície é, em grande parte, não polar. Estudos com 23 análogos da toxina Magi 5, sugerem que Magi 5 faz extensos contatos com o canal de sódio tanto por meio de uma superfície polar ao redor da Lys¹⁰, Glu¹⁴ e Trp¹⁸ quanto por meio de uma superfície não polar, com os aminoácidos Phe⁶, Asn¹⁹, Ile²⁵, Met²⁷ e Pro²⁸ desempenhando um importante papel. O fato de a Magi 5 possuir uma superfície polar e outra não polar essenciais para a sua atividade torna-a passível de comparação com a β toxina escorpiônica Css IV, um peptídeo de 66 resíduos de aminoácido encontrada no escorpião mexicano *Centruroides suffusus suffusus*. O peptídeo CssIV apresenta duas regiões principais contendo glutamato, a Glu²⁸, considerada um *hot*

spot, e a Glu¹⁵, responsável por “aprisionar” o sensor de voltagem, enquanto o peptídeo Magi 5 possui apenas um único resíduo de aminoácido carregado negativamente, Glu¹⁴, além da região C terminal livre. Acredita-se que o Glu¹⁴ age de forma similar ao Glu¹⁵ da toxina Css IV, todavia não se sabe qual grupo da Magi 5 que mimetiza o Glu²⁸, uma vez que estudos tanto com o peptídeo Magi 5 nativo quanto com seu análogo com a região C terminal amidada apresentaram semelhante toxicidade, indicando que a região C terminal não é necessária para a atividade de Magi 5 em canais de sódio. Ao avaliar as distâncias dos resíduos Glu¹⁴ (Magi 5) e Glu¹⁵ (Css IV), definidos como pontos de referência, em relação às distâncias dos outros resíduos funcionais na superfície de ambas as toxinas, observou-se que tais distâncias são bastante similares. Assim que, apesar de Css IV e a Magi 5 apresentarem diferentes motivos estruturais: a Css IV apresenta motivo $\alpha\beta$ enquanto a Magi 5, assim como a Ap1a, apresenta motivo ICK, tais toxinas atuam no mesmo sítio nos canais de voltagem, possivelmente, por meio da ligação dos resíduos similares descritos acima (Corzo et al., 2007).

O peptídeo Magi 5, assim como a Ap1a, não inibe a corrente de forma tão eficaz: 5 μ M inibiu menos de 15 % da corrente iônica. Entretanto, isso não o torna um peptídeo desinteressante, visto que ele apresenta, pelo menos, duas características interessantes: a capacidade de modular a cinética do canal da mesma forma que as β toxinas escorpiônicas e a vantagem de possuir menos da metade da quantidade de aminoácidos que a β toxina escorpiônica Css IV apresenta, tornando-se uma ferramenta valiosa para estudos relacionados à estrutura-função e interações de toxinas com canais de sódio dependente de voltagem (Corzo et al., 2007).

Uma característica interessante sobre a toxina Css IV é que ela desloca a ativação de canais de sódio presentes em cérebro de rato para potenciais mais hiperpolarizados apenas após um protocolo de estímulo contendo pré-pulso, ou seja, o efeito de tal toxina é dependente de pré-pulso. Todavia, quando testada em canais de sódio cardíacos presentes em ratos (rNav 1.5), ocorre um deslocamento da ativação para potenciais mais despolarizados e tal efeito independe de um estímulo contendo pré-pulso. É certo que esse efeito causado por 1 μ M da toxina Css IV ($\Delta V_{1/2} = + 3-5$ mV) não é tão grande quando comparado ao deslocamento que essa mesma concentração provoca em canais de sódio presentes em cérebro de rato ($\Delta V_{1/2} = - 31,7 \pm 3$ mV), mas ele existe (Cestèle et al., 1998).

Assim como a toxina C_{ss} IV em canais cardíacos, as ceratotoxinas CcoTx1 e CcoTx2, isoladas da peçonha da aranha *Ceratogyrus cornuatus*, também são conhecidas por deslocarem a ativação dos VGSCs para potenciais mais positivos (Bosmans et al., 2006). Ambas possuem 33 resíduos de aminoácidos, três pontes dissulfeto e motivo estrutural ICK. CcoTx1 e CcoTx2 diferem em apenas um resíduo de aminoácido na posição 32, enquanto a primeira apresenta um aspartato, a segunda apresenta uma tirosina. Assim como a Ap1a, que possui um pI teórico de 9,28, as toxinas CcoTx1 e CcoTx2 também possuem características básicas, com pIs teóricos de 10,48 e 10,07; respectivamente. CcoTx1 e CcoTx2 diminuem as amplitudes das correntes iônicas de Na_v 1.1, Na_v 1.2, Na_v 1.4, Na_v 1.5 e Na_v 1.8 com potências variadas, além de promoverem deslocamento da ativação para potenciais mais positivos em todos os subtipos de canais de sódio testados, exceto em Na_v 1.8. Quando em presença de 2 μM, CcoTx1 não provoca inibição na corrente de Na_v 1.3, entretanto a toxina CcoTx2 inibe-a com uma IC₅₀ = 88 ± 25 nM, evidenciando o efeito discrepante que a mutação D32Y causa e o importante papel desse resíduo da porção C-terminal amidada para a afinidade pelo canal (Bosmans et al., 2006). Recentemente, descobriu-se que, em canais hNa_v 1.7, a toxina CCoTx1 se liga à alça extracelular entre S3-S4 do domínio II (sítio 4) (Shcherbatko et al., 2016).

Peptídeos de aranhas tais como HWTX-IV (huwentoxina-IV), da aranha caranguejeira *Ornithoctonus huwena*, e HNTX-IV (hainatoxina-IV), da aranha caranguejeira *Ornithoctonus hainana*, também interagem com sítio 4 dos VGSCs, entretanto tais neurotoxinas estão relacionadas apenas ao bloqueio de corrente, não sendo consideradas moduladoras da cinética dos canais (Cai et al., 2015; Xiao et al., 2008). Assim como a Ap1a, ambos os peptídeos mencionados possuem um maior efeito inibitório em canais hNa_v 1.7, sendo a ordem de seletividade tanto do peptídeo HWTX-IV quanto do peptídeo HNTX-IV de Na_v 1.7 > Na_v 1.2 > Na_v 1.3 >> Na_v 1.4 ≥ Na_v 1.5. O potencial modulatório da ativação e/ou da inativação dos peptídeos HWTX-IV e HNTX-IV foi considerado não significativo, contudo não foi apresentado nenhum teste estatístico que validasse tal afirmativa (Cai et al., 2015; Yucheng Xiao et al., 2008). Mutações sítio dirigidas evidenciaram que o peptídeo HWTX-IV interage com canais hNa_v 1.7 por meio da ligação ao sítio 4, “aprisionando” o sensor de voltagem IIS4 na configuração fechada e na porção intracelular, diferentemente do que ocorre com as β toxinas. Quatro resíduos de aminoácidos presentes na alça extracelular que liga S3-S4 do domínio II foram

identificadas como cruciais para a ligação da HWTX-IV ao hNa_v 1.7, E811, L814, D816 e E818, além de um outro resíduo de aminoácido presente na alça extracelular S1-S2 do domínio II, E753. (Xiao et al., 2011). Uma vez que mutações sítios dirigidas em canais hNa_v 1.7 evidenciaram que a toxina HNTX-IV também interage com o sítio 4 na alça DII S3-S4, acredita-se que tal peptídeo também aprisione o sensor de voltagem na configuração fechada. Dois resíduos de aminoácidos, D816 e E818, da alça DII S3-S4 e um resíduo, E753, da alça DII S1-S2 foram identificados como importantes para a ligação HNTX-IV-hNa_v 1.7, sendo o resíduo E818 considerado especialmente crucial. Estudos de modelagem em *docking* (*docking modeling*) determinaram que os resíduos K27 e H38 da HNTX-IV interagem com o aminoácido E818 do hNa_v 1.7, enquanto os aminoácidos D816 e E753 interagem com K32 e K7 da HNTX-IV, respectivamente (Cai et al., 2015).

Os sítios de ligação e pontos de ancoragem podem explicar porquê os diversos exemplos mencionados acima atuam no mesmo sítio no canal e apresentam efeitos tão diversificados: uns deslocando a ativação para potenciais mais hiperpolarizados, outros para potenciais mais despolarizados, outros não interferindo na cinética do canal e outros sendo dependente de pré-pulso enquanto outros não dependem.

Os sítios de ligação estão relacionados aos pontos de contato entre uma toxina e os VGSC, os quais são responsáveis pelo efeito principal da toxina. Já os pontos de ancoragem, são os outros pontos de contato aos quais a toxina se liga e que influenciam na potência do efeito da toxina, sendo, muitas vezes, responsáveis por conferir maior seletividade à toxina por um determinado subtipo de canal. Tal ligação pode ser feita em outras regiões da subunidade α , nas subunidades β ou até mesmo nas membranas lipídicas (Stevens et al., 2011).

A β toxina escorpiônica BmK IT2, por exemplo, que se liga ao sítio 4 de canais de sódios dependente de voltagem de insetos (DmNa_v), apresenta alguns pontos de ancoragem no domínio III, os quais conferem maior seletividade da toxina BmK IT2 por canais DmNa_v em relação aos canais rNa_v 1.2. Além disso, a alça extracelular que liga os segmentos S5 e S6 do domínio III, também influencia bastante a potência do efeito da toxina BmK IT2 nos canais DmNa_v (He et al., 2011). Assim como a BmK IT2, outras β toxinas escorpiônicas, como a Css IV, Tz1 e até mesmo a toxina de aranha HNTX-IV também possuem pontos de ancoragem no domínio III que determinam suas especificidades por diferentes subtipos de canais de sódio (Cai et al., 2015; Leipold et al., 2006). Diversas mutações no sensor de

voltagem do domínio III aumentaram a afinidade da ligação de β toxinas no DIIS4, sugerindo o envolvimento do sensor de voltagem DIII no mecanismo de ação das β NaScTxS (Song et al., 2011).

Estudos com a μ O-conotoxina MrVIB, uma toxina que assim como a HWTX-IV apenas reduz a amplitude do canal “aprisionando” o sensor de voltagem DIIS4 na posição intracelular, demonstraram que a expressão de Na_v 1.8 com diferentes subunidades β aumentaram significativamente a inibição da corrente iônica quando comparado ao efeito de tal toxina em canais Na_v 1.8 que apresentassem somente a subunidade α , evidenciando, assim, a influência que os pontos de ancoragem nas subunidades β dos VGSCs têm sobre o efeito da toxina (Wilson et al., 2011).

Um fato curioso sobre a ProTx-II é que em canais rNa_v 1.2 a toxina interage com os sensores de voltagem do domínio I, II e IV (Bosmans et al., 2009) e em canais hNa_v 1.7, a toxina interage somente com os sensores de voltagem do domínio II e IV (Xiao et al., 2010). Já quando avaliada em canais Na_v 1.5, as mutações realizadas nas diversas alças extracelulares do canal Na_v 1.5 não evidenciaram nenhuma ligação essencial para ação da toxina. Onze mutantes exibiram atividade similar à ProTx-II nativa e a maioria dos resíduos de aminoácido que diminuíram a afinidade pelo canal eram hidrofóbicos, demonstrando, assim, a importância de tais resíduos para a atividade do peptídeo ProTx-II. Estudos com a ProTx-II demonstraram que essa é capaz de se ligar a lipossomas, sugerindo que, parte da atividade da toxina ProTx-II seja gerada pela sua inserção na membrana lipídica (Smith et al., 2005; Smith et al., 2007).

Sendo assim, após os exemplos mencionados, está claro que o estudo toxina-função-canal é muito mais complexo do que parece. Toxinas que possuem o mesmo motivo, ICK, se ligam ao mesmo sítio no canal, possuem pontos de ancoragem diversos, os quais alteram a forma de como tais toxinas modulam o canal. Esses diferentes pontos de ancoragem, muito provavelmente, são capazes de explicar o porquê que o peptídeo Ap1a, objeto deste estudo, modula a ativação dos canais hNa_v 1.1, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.7 sem que haja diferença estatística significativa quando executado o protocolo experimental com e sem pré-pulso, mas apresenta algumas diferenças estatísticas na inativação lenta e a inibição da corrente iônica.

Em relação aos demais canais anteriormente testados: hNa_v 1.2, hNa_v 1.4, hNa_v 1.5 e hNa_v 1.6, uma possível explicação para justificar a ausência de efeito do peptídeo Ap1a, além dos prováveis diferentes pontos de ancoragem, é a diferença de

execução no protocolo experimental utilizado no *patch-clamp*. Os ensaios realizados no laboratório de eletrofisiologia na Universidade de Brasília (UnB) evidenciaram que a ação do peptídeo Ap1a não é imediata, semelhantemente, ao que ocorre nas toxinas HWTX-IV e HNTX-IV (Cai et al., 2015; Xiao et al., 2008). Sendo assim, as análises deste trabalho avaliaram o controle e a ação da toxina no tempo de 10 minutos após sua injeção, já os ensaios nos canais hNa_v1.2, hNa_v1.4, hNa_v1.5 e hNa_v1.6 avaliaram a ação da toxina logo após sua injeção (Mourão et al., 2013).

5.2 Ensaios Eletrofisiológicos em Canais Iônicos Dependentes de Voltagem de Insetos

O peptídeo Ap1a a 1 μ M não bloqueou ou modulou a cinética dos canais tanto de sódio BgNa_v1 e VdNa_v1 (Figura 18) quanto de potássio do tipo *Shaker*, *Shab*, *Shal* e *Shaw* (Figura 19).

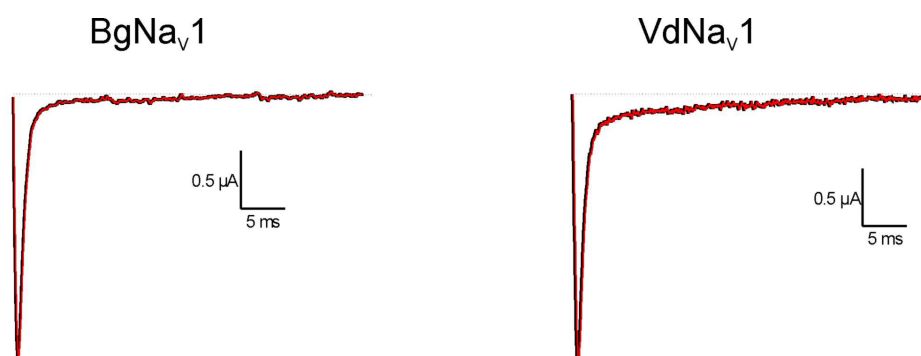


Figura 18. Traços eletrofisiológicos dos canais de sódio BgNa_v1 e VdNa_v1. Imagens representam os registros da corrente iônica obtida na voltagem de maior corrente (0 mV). Traços pretos representam o controle e traços vermelhos referem-se à toxina Ap1a na concentração de 1 μ M.

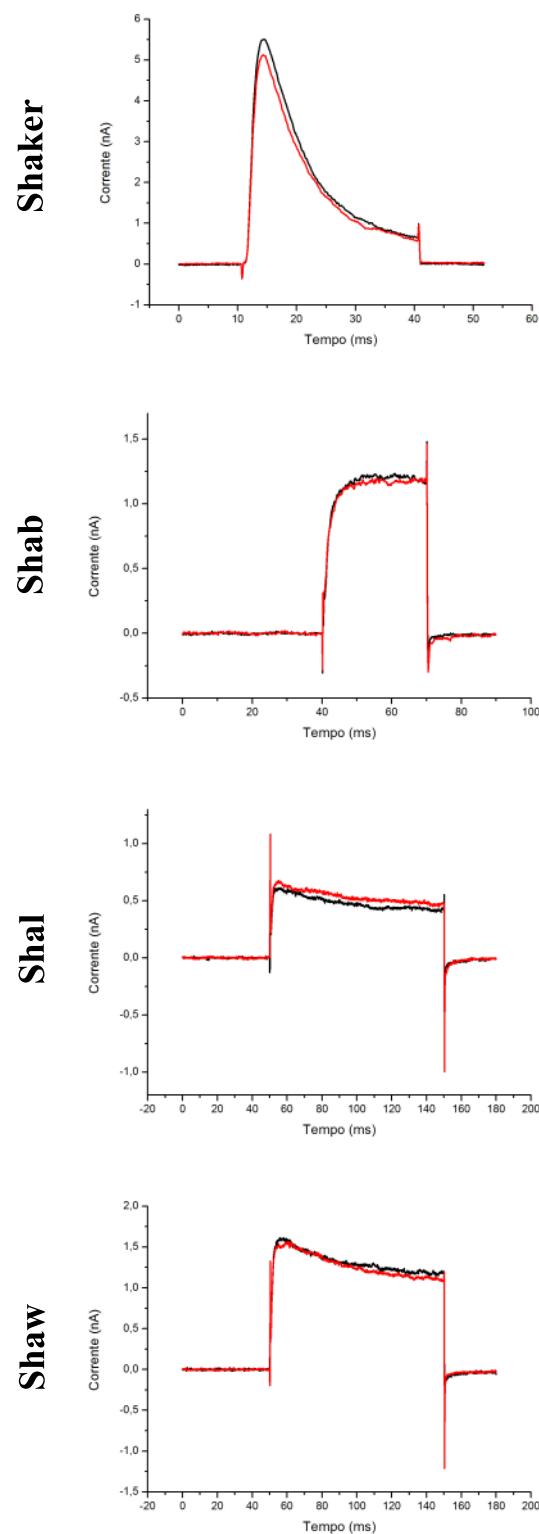


Figura 19. Traços eletrofisiológicos das diferentes isoformas de canais de potássio. Imagens representam os registros da corrente iônica obtida na voltagem de maior corrente (50 mV para todas as isoformas). Traços pretos representam o controle e traços vermelhos referem-se à toxina AplA na concentração de 1 μM.

Estudos prévios no Laboratório de Neurofarmacologia da UnB verificaram o efeito do peptídeo Ap1a quando testado em lagartas *S. frugiperda* (Mourão et al., 2013). Tal ensaio induziu um efeito dose-dependente paralítico nas lagartas, sendo o efeito máximo observado 8h após a injeção. A dose efetiva média (DE₅₀), avaliada no tempo de 8h, encontrada foi $13,01 \pm 4,21 \mu\text{g/g}$, o que equivale a $2,38 \pm 0,77 \text{ nmol/g}$ (Mourão et al., 2013).

O ensaio utilizou 4 doses de Ap1a (10, 15, 25 e 50 $\mu\text{g/g}$ de animal) e o efeito paralítico observado foi parcial nas duas doses menores, enquanto nas duas maiores doses, tal paralisia foi total. Na dose mais alta, a paralisia das lagartas começou a ser observada 15 minutos após a injeção do peptídeo. Após o tempo de efeito máximo do peptídeo ser alcançada (8h), na maioria das lagartas a paralisia foi revertida, contudo, em todas as doses testadas, em 20-30% das lagartas a paralisia não foi revertida, permanecendo nesse estado até o final do experimento (48h) (Mourão et al., 2013).

Apesar de o peptídeo Ap1a não ter apresentado atividade nos canais iônicos de insetos testados, o efeito inseticida dele existe, sugerindo assim, que o alvo molecular da Ap1a seja outro.

Os peptídeos Omega-TRTX-Ba1a e Omega-TRTX-Ba1b, mencionados anteriormente, possuem 79,49% de identidade com a Ap1a (Figura 10) e também apresentam efeito inseticida, sendo letais quando testados em grilos *A. domestica* (DL₅₀= $10,8 \pm 1,4 \mu\text{g/g}$ e $9,2 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$, respectivamente). Entretanto, assim como a Ap1a, não alteram as correntes de sódio de inseto *para/TipE* (Corzo et al., 2009), demonstrando que os canais de sódio, possivelmente, não são, também, o alvo molecular de ambos peptídeos.

É importante mencionar que canais *para* são canais de sódio isolados de *Drosophila melanogaster* os quais são gerados por um único gene, denominado *para* (Loughney et al., 1989). Uma vez que os canais de sódio estão envolvidos na resistência a inseticidas industriais, vários *para* ortólogos foram isolados de inúmeras pragas agrícolas com o intuito de serem melhor estudados (Soderlund & Knipple, 2003). Dentre esses *para* ortólogos dos quais foram obtidos os clones de cDNA completos estão os canais BgNa_v1 (Dong, 1997) e VdNa_v1 (Anderson & Trueman, 2000). A expressão de canais de sódio de inseto em oócitos *X. laevis* requer a coexpressão de uma subunidade auxiliar, *TipE* (Feng et al., 1995). Tal coexpressão *para + TipE* aumenta a amplitude das correntes de sódio, modifica a cinética da

inativação rápida (Warmke et al., 1997), além de aumentar a expressão de BgNa_v em oócitos (Tan et al., 2002).

Outro peptídeo que também atua em insetos é a HWTX-V, um peptídeo isolado da aranha *Haplopelma schmidtii* de 35 resíduos de aminoácidos, 3 pontes dissulfeto e motivo ICK (Liang, 2004). Tal toxina é capaz de paralisar de maneira tempo e dose-dependente tanto gafanhotos quanto baratas ($DE_{50} = 16 \pm 45 \mu\text{g/g}$) por várias horas, causando, inclusive, mortes nas concentrações mais altas (Zhang et al., 2003). Ao se avaliar a ação da HWTX-V em canais iônicos de neurônios DRG de rato e neurônios DUM (*dorsal unpaired median*) de baratas, observa-se que essa toxina não atua, sob uma concentração de 1 μM , em canais Na_v, K_v ou Ca_v do tipo LVA (dependentes de fraca despolarização para ativação) em ambas as preparações de vertebrado e invertebrado, contudo atua em canais de cálcio do tipo HVA (dependentes de forte despolarização para ativação), possuindo uma alta atividade em neurônios DUM ($IC_{50} = 209 \pm 4 \text{ nM}$), muito maior do que quando comparada ao efeito em neurônios DRG (Deng et al., 2008).

Assim como a HWTX-V, é possível que o alvo molecular do peptídeo Apl1a seja os canais de cálcio dependentes de voltagem e que, visto que estudos anteriores verificaram que a Apl1a apresentou toxicidade tanto para insetos quanto para mamíferos, esse alvo talvez seja o mesmo tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Há, ainda, a possibilidade da Apl1a atuar em receptores ionotrópicos glutamatérgico, devido ao seu modo de ação no circuito da fibra gigante de *D. melanogaster* e em camundongos quando injetada via icv, ou, em se tratando de insetos, é ainda plausível que a Apl1a atue em canais Ca_v pré-sinápticos da junção neuromuscular.

Com o intuito de tentar elucidar se o peptídeo Apl1a atua em receptores ionotrópicos glutamatérgicos procedeu-se o ensaio de ligação de [3,4 ³H]-L-glutamato.

5.3 Ensaio de Ligação de [3,4 ³H]-L-glutamato

Foram realizados ensaios em triplicata, em dias independentes, de ligação de [3,4 ³H]-L-glutamato na presença de concentrações crescentes do peptídeo Apl1a (0,01 a 1000 μM), entretanto em nenhuma das concentrações utilizadas foi observado

alguma diferença estatística significativa na ligação de [3,4 ³H]-L-glutamato (Figura 20). A média da porcentagem de inespecífico foi de 30%.

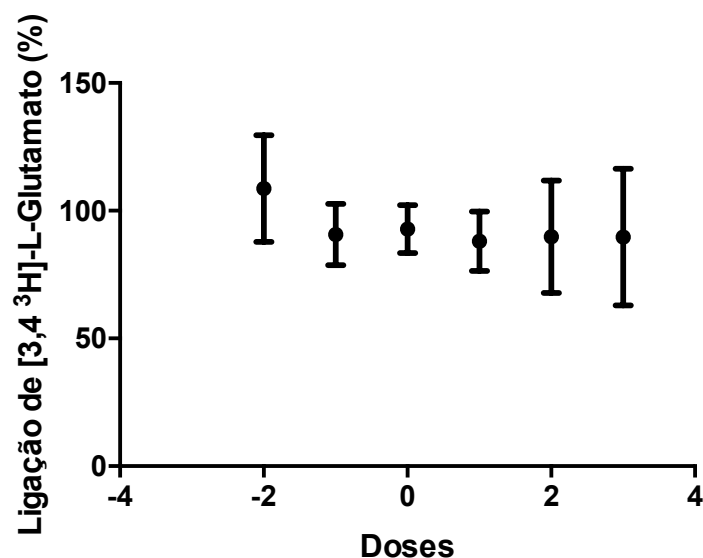


Figura 20. Representação dos efeitos das concentrações crescentes do peptídeo Ap1a (0,01-1000 μ M, em log, na ligação de [3,4 ³H]-L-glutamato a seus receptores. O experimento foi feito em triplicata em dias independentes e o teste estatístico realizado foi regressão linear feita no *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA).

O fato de [3,4 ³H]-L-glutamato não ter competido com o peptídeo Ap1a em todas as doses testadas não exclui a possibilidade da Ap1a interagir com receptores glutamatérgicos.

Estudos prévios verificaram que o peptídeo Ap1a teve efeito no circuito da fibra gigante de *Drosophila melanogaster* e apresentou toxicidade em camundongos, sugerindo, em ambos os experimentos, uma possível atividade em receptores ionotrópicos glutamatérgicos (Mourão et al., 2013), sendo, dessa forma, plausível que o peptídeo Ap1a interaja a outros sítios de ligação diferentes ao sítio que o [3,4 ³H]-L-glutamato se liga.

Sabe-se que o [3,4 ³H]-L-glutamato é um agonista de todos os receptores ionotrópicos glutamatérgicos e que, devido a isso, ele é o radioligante escolhido para ensaios em que se deseja avaliar de forma geral a interação de algo a tais receptores. Entretanto, existem diferentes classes de moduladores que atuam com maior afinidade/seletividade por um único tipo de receptor e que agem em outros sítios de ligação. A fim de um melhor esclarecimento sobre esse tema, os receptores do tipo NMDA serão tomados como exemplo, uma vez que suas participações nos processos de excitotoxicidade são mais bens estudados quando comparados aos demais

receptores ionotrópicos e pelo fato de eles estarem envolvidos em várias doenças neurológicas, tais como Parkinson, doença de Huntington, epilepsia e dor neuropática (Kemp & Mckernan, 2002).

Receptores do tipo NMDA são caracterizados por complexos heteroméricos, formados por diferentes subunidades presentes em três subtipos: NR1, NR2 e NR3. O subtipo NR1 apresenta 8 subunidades originadas de um único gene por meio de *splicing* alternativo. Já os subtipos NR2 e NR3 apresentam quatro e duas subunidades, respectivamente, geradas por 6 genes diferentes (Dingledine et al., 1999). Expressão de receptores NMDA funcionais em células mamárias requerem a co-expressão de pelo menos uma subunidade NR1 e outra NR2, entretanto receptores NMDA endógenos são tetraméricos, sendo, geralmente, formados por duas subunidades NR1 e duas NR2, iguais ou diferentes entre si. Células que expressam receptores com NR3 também co-expressam os subtipos NR1 e NR2, formando um tetrâmero com a tríade NR1/NR2/NR3 (Sasaki et al., 2002).

Independente da subunidade, a topologia da membrana de cada uma é semelhante. Todas são formadas por uma extensa porção N-terminal extracelular, uma região transmembrana composta por 3 segmentos transmembrânicos, denominados TM1, TM3, TM4, associados a um quarto segmento, TM2, e uma porção C-terminal intracelular que varia de tamanho de acordo com a subunidade (Figura 21) (Mayer, 2006; Yamakura & Shimoji, 1999).

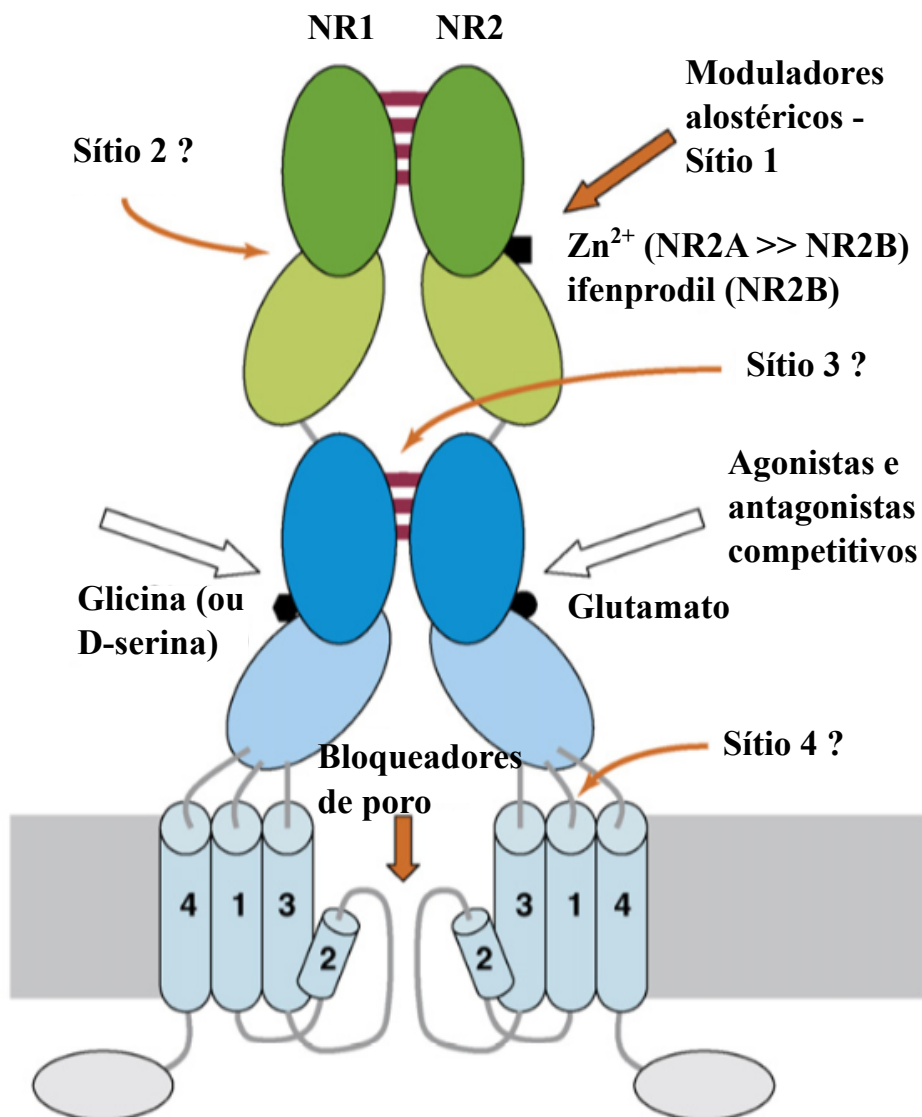


Figura 21. Potenciais sítios de ligação aos receptores do tipo NMDA. A fim de uma melhor compreensão da estrutura dos receptores do tipo NMDA, apenas o heterodímero NR1/NR2 foi apresentado, apesar de que tais receptores apresentam estrutura tetramérica. Setas brancas indicam os sítios de ligação dos agonistas e antagonistas competitivos, setas laranjas indicam os possíveis locais em que os moduladores alostéricos se ligam de forma não competitiva. Imagem adaptada de Paoletti & Neyton, 2007).

A porção pré-segmentos transmembrânicos é o local em que ocorre a ligação do glutamato, que se liga ao subtipo NR2, e do seu co-transmissor, glicina, que se liga aos subtipos NR1 e NR3. É nesse local que interagem também os agonistas e antagonistas competitivos dos receptores de NMDA (Furukawa et al., 2005; Yao & Mayer, 2006). Existem também os antagonistas não competitivos, os quais podem atuar no poro do canal, bloqueando-o, e que, em sua maioria, são ricos em cargas

positivas e agem de maneira dependente de voltagem (Kew & Kemp, 2005; Paoletti & Neyton, 2007).

A classe dos agonistas competitivos compreende o glutamato, o NMDA, além de vários outros compostos bastante potentes, como o (2S, 3R, 4S)-CCG e o (1R, 3R)-ACPD, desenhados a partir do glutamato (Figura 22) (Curry et al., 1988; Shinozaki et al., 1989). Um fato curioso sobre o agonista NMDA é que apesar de ele ser bastante potente, ele se liga com uma baixa afinidade aos receptores do tipo NMDA (Osborne et al., 2000).

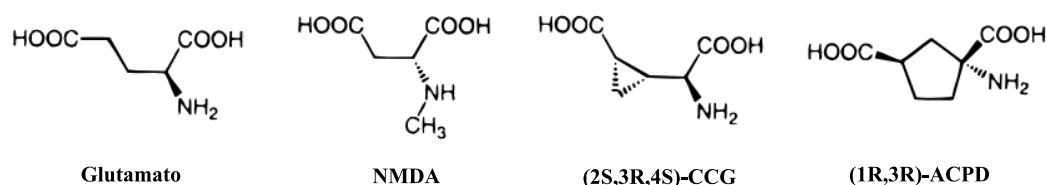


Figura 22. Estrutura de agonistas competitivos dos receptores NMDA. Imagem adaptada de Osborne et al., 2000.

Quanto à classe dos antagonistas competitivos dos receptores do tipo NMDA destacam-se os potentes (R)-CPP, (R)-CPPene e o LY235959, todos desenhados através do antagonista (R)-AP5 (Figura 23) (Hutchison et al., 1989; Lehmann et al., 1987).

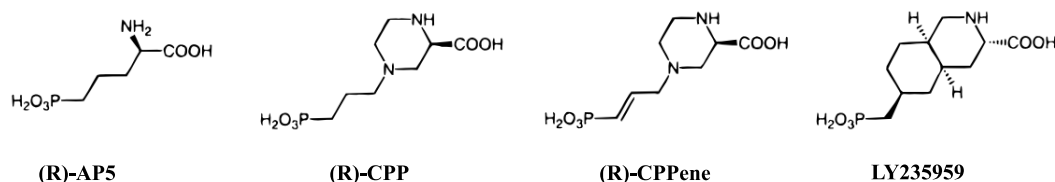


Figura 23. Estrutura de antagonistas competitivos dos receptores NMDA. Imagem adaptada de Osborne et al., 2000.

Dentre os principais antagonistas não competitivos está a dizocilpina, também conhecida como MK-801. Como mencionado anteriormente, tal composto é capaz de bloquear a abertura de canais iônicos dependentes de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, impedindo assim, a entrada de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ para dentro da célula (Wong et al., 1986). Um outro agonista não competitivo é o infeprodil, o qual possui maior seletividade para receptores NR1/NR2B (IC₅₀= 0,3μM) e é 150 vezes menos potente em receptores NR1/NR2C e NR1/NR2D (Williams, 1993). Em contrapartida,

o zinco possui uma seletividade na ordem de nanomolar para os receptores NR1/NR2A enquanto em receptores NR1/NR2B, tal seletividade é na ordem de micromolar (Chen et al., 1997; Williams, 1996).

Receptores do tipo AMPA e cainato, assim com o NMDA, também possuem agonistas e antagonistas específicos os quais se ligam a diferentes sítios de ligação. Como mencionado anteriormente, o peptídeo Ap1a pode atuar em algum dos receptores ionotrópicos, se ligando a um outro sítio de ligação que não o do glutamato. Além disso, é possível que o peptídeo Ap1a atue em sinergismo com as acilpoliaminas, compostos de baixa massa molecular também encontrados na peçonha de aranhas, as quais são famosas por bloquearem os receptores ionotrópicos glutamatérgicos.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou uma ampla caracterização eletrofisiológica do peptídeo Ap1a, isolado da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*, bem como avaliou sua competição com o sítio de ligação do glutamato por meio de ensaio de ligação de [3,4 ³H]-L-glutamato.

A avaliação do alinhamento da sequência primária do peptídeo Ap1a com outros peptídeos de aranha evidenciou que a Ap1a apresenta similaridade com a família das HWTX-II, uma família composta por peptídeos cuja ação biológica é ampla: uns são tóxicos somente para mamíferos ou somente para insetos e outros tóxicos para ambos. Dentre esses peptídeos, a toxina An1a é a única que apresenta algum tipo de ensaio eletrofisiológico. Para as demais toxinas similares estão disponíveis somente ensaios biológicos *in vivo*. Com base nisso, o peptídeo Ap1a é o primeiro peptídeo, dentre os que ele apresenta similaridade, a possuir uma extensa caracterização eletrofisiológica descrita.

Ensaio em canais de sódio dependentes de voltagem em mamíferos determinaram que a Ap1a, à 1 μ M, atua nesses canais modulando a sua cinética, promovendo sua ativação em potenciais mais hiperpolarizados e inibindo parcialmente a amplitude da corrente iônica. Semelhante efeito é observado nas β toxinas escorpiônicas, as quais atuam no sítio 4 do canal, sugerindo assim, que a Ap1a talvez atue nesse mesmo local.

Apesar de a Ap1a ter apresentado atividade em todas as isoformas de mamífero testadas, tal atividade foi relativamente pequena, o que, junto à sua não atividade em canais hNa_v 1.2, hNa_v 1.4, hNa_v 1.5 e hNa_v 1.6, nos faz pensar que seu principal alvo molecular seja outro.

Ensaio em canais de sódio e potássio dependentes de voltagem de insetos também foram conduzidos e demonstraram a não atividade da Ap1a, também a 1 μ M. Uma vez que estudos prévios determinaram a ação inseticida da Ap1a em lagartas *S. fugiperda* e no Circuito da Fibra Gigante de *D. melanogaster*, novamente a evidência de que Ap1a atua em outro alvo molecular foi observada.

Devido ao fato de a Ap1a agir no Circuito da Fibra Gigante de *D. melanogaster* e apresentar toxicidade em camundongos, semelhantemente ao que ocorre ao se injetar NMDA via intracerebroventricular, sua atividade foi avaliada em ensaio de ligação de [3,4 ³H]-L-glutamato. A não atividade da Ap1a nesse ensaio foi

observada, entretanto isso não exclui a possibilidade dela atuar em receptores ionotrópicos glutamatérgicos, visto que existem vários outros sítios de ligação, diferentes ao do glutamato, em que um agonista ou antagonista pode se ligar. Há, ainda, a possibilidade que a Apl1a atue em sinergismo com as acilpoliaminas ou em canais de cálcio dependentes de voltagem ou, até mesmo, em canais Ca_v pré-sinápticos da junção neuromuscular ou da transmissão sináptica.

Por fim, o presente estudo contribuiu para a ampliação do conhecimento acerca da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*, uma espécie endêmica do Brasil, pouco relatada na literatura. Além de servir como base para futuros estudos com peptídeo Apl1a relacionados à estrutura-função dos canais iônicos.

7. PESPECTIVAS

- Produzir o peptídeo Ap1a sinteticamente, além de oxidar suas pontes dissulfeto de forma correta;
- Avaliar a ação do peptídeo Ap1a por meio de ensaios eletrofisiológicos em canais Ca_v tanto de mamíferos quanto de insetos;
- Realizar mutações sítio dirigidas, baseadas em substituições por alanina (*alanine scanning*), no peptídeo Ap1a, a fim de estudar os resíduos de aminoácidos importante para a interação da Ap1a com o canal $hNa_v 1.7$;
- Definir a estrutura tridimensional for meio da técnica de cristalografia.

8. ANEXOS

8.1 Dados complementares do peptídeo Apl1a, 1 μM , nos ensaios eletrofisiológicos em canais de sódio de mamíferos.

Tabela 9. Parâmetros eletrofisiológicos da ativação nos canais de sódio de mamífero testados executando o protocolo experimental com pré-pulso. Análises estatísticas foram feitas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão (n= 8).

	$V_{1/2}$ controle (mV)	$V_{1/2}$ Apl1a 1 μM (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	ΔV_s
hNa_v 1.1	-20,13 \pm 0,001	-26,71 \pm 0,0008	-6,58 \pm 0,72	0,025
hNa_v 1.3	-19,8 \pm 0,0004	-24,65 \pm 0,0006	-4,84 \pm 0,53	0,417
hNa_v 1.7	-17,85 \pm 0,001	-22,25 \pm 0,002	-4,70 \pm 0,87	- 0,222

Tabela 10. Parâmetros eletrofisiológicos da ativação nos canais de sódio de mamíferos testados executando o protocolo experimental sem pré-pulso. Análises estatísticas foram feitas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão (n= 8).

	$V_{1/2}$ controle (mV)	$V_{1/2}$ Apl1a 1 μM (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	ΔV_s
hNa_v 1.1	-20,18 \pm 0,001	-26,77 \pm 0,0008	-6,58 \pm 0,72	-0,032
hNa_v 1.3	-20,46 \pm 0,0003	-25,14 \pm 0,0007	-4,68 \pm 0,77	0,450
hNa_v 1.7	-18,96 \pm 0,002	-24,04 \pm 0,002	-5,07 \pm 1,15	- 0,202

Tabela 11. Parâmetros eletrofisiológicos da inativação nos canais de sódio de mamíferos testados executando o protocolo experimental com pré-pulso. Análises estatísticas foram feitas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão (n= 8).

	$V_{1/2}$ controle (mV)	$V_{1/2}$ Apl1a 1 μM (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	ΔV_s
hNa_v 1.1	-49,72 \pm 0,002	-52,14 \pm 0,0004	-2,42 \pm 0,75	0,085
hNa_v 1.3	-49,90 \pm 0,001	-53,11 \pm 0,001	-4,05 \pm 1,16	- 0,255
hNa_v 1.7	-44,51 \pm 0,001	-48,6 \pm 0,001	-4,10 \pm 0,94	0,377

Tabela 12. Parâmetros eletrofisiológicos da inativação nos canais de sódio de mamíferos testados executando o protocolo experimental sem pré-pulso. Análises estatísticas foram feitas por meio do teste T pareado através do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão (n= 8).

	$V_{1/2}$ controle (mV)	$V_{1/2}$ Apl1a 1 μM (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	ΔV_s
hNa_v 1.1	-48,84 \pm 0,002	-50,81 \pm 0,002	-1,97 \pm 0,62	0,148
hNa_v 1.3	-48,08 \pm 0,001	-50,29 \pm 0,001	-2,02 \pm 1,23	0,280
hNa_v 1.7	-42,44 \pm 0,001	-45,96 \pm 0,001	-3,52 \pm 0,79	0,270

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Akopian, A. N., Souslova, V., England, S., Okuse, K., Ogata, N., Ure, J., ... Wood, J. N. (1999). The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nature Neuroscience*, 2(6), 541–8. <https://doi.org/10.1038/9195>
- Albert, C., Ruben, P. C., George, A. L., Fujimoto, E., & Bezanilla, F. (1999). Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na⁺ channel fast inactivation. *Neuron*, 22(1), 73–87. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80680-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80680-7)
- Amaral, R., Gomes, S., Ribeiro, C., Nascimento, M., Santos, D., & Lima, M. E. De. (1999). PhTx4 , a new class of toxins from Phoneutria nigriventer spider venom , inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes, 297–300.
- Anderson, D. L., & and Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsonii* is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 165–189.
- Ayoub, N. A., & Hayashi, C. Y. (2009). Spiders (Araneae). *A Timetree of Life*, 255–259.
- Bennett, D. L. H., & Woods, C. G. (2014). Painful and painless channelopathies. *The Lancet Neurology*, 13(6), 587–599. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70024-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70024-9)
- Bosmans, F., Rash, L., Zhu, S., Diochot, S., Lazdunski, M., Escoubas, P., & Tytgat, J. (2006). Four novel tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes. *Molecular Pharmacology*, 69(2), 419–429. <https://doi.org/10.1124/mol.105.015941>
- Brackenbury, W. J., & Isom, L. L. (2011). Na⁺ channel B subunits: Overachievers of the ion channel family. *Frontiers in Pharmacology*, SEP(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00053>
- Bräuner-Osborne, H., Egebjerg, J., Nielsen, E., Madsen, U., & Krosgaard-Larsen, P. (2000). Ligands for glutamate receptors: Design and therapeutic prospects. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(14), 2609–2645. <https://doi.org/10.1021/jm000007r>
- Cai, T., Luo, J., Meng, E., Ding, J., Liang, S., Wang, S., & Liu, Z. (2015). Mapping the interaction site for the tarantula toxin hainantoxin-IV (??-TRTX-Hn2a) in the

- voltage sensor module of domain II of voltage-gated sodium channels. *Peptides*, 68(September), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.005>
- Catterall, W. a. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26(1), 13–25. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81133-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81133-2)
- Catterall, W. A. (1986). Molecular Properties of Voltage-Sensitive Sodium Channels. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), 953–985. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.004513>
- Catterall, W. A. (2000). STRUCTURE AND REGULATION OF VOLTAGE - GATED Ca²⁺ CHANNELS.
- Catterall, W. A. (2010). Ion channel voltage sensors: Structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, 67(6), 915–928. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.021>
- Catterall, W. A. (2014). Sodium Channels, Inherited Epilepsy, and Antiepileptic Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54(1), 317–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140232>
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., & Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49(2), 124–141. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.022>
- Catterall, W. a, Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 411–425. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.5.units>
- Cestèle, S., & Catterall, W. A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, 82(9–10), 883–892. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01174-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01174-3)
- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., Catterall, W. A., ... Catterall, W. A. (1998). Voltage Sensor–Trapping: Enhanced Activation of Sodium Channels by α -Scorpion Toxin Bound to the S3–S4 Loop in Domain II. *Neuron*, 21(4), 919–931. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80606-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80606-6)
- Cestèle, S., Scheuer, T., Mantegazza, M., Rochat, H., & Catterall, W. A. (2001). Neutralization of gating charges in domain II of the sodium channel alpha subunit enhances voltage-sensor trapping by a beta-scorpion toxin. *The Journal of General Physiology*, 118(3), 291–302. <https://doi.org/10.1085/jgp.118.3.291>

- Chen, N., Moshaver, a, & Raymond, L. a. (1997). Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Molecular Pharmacology*, *51*, 1015–1023.
- Coddington, J. A. (2005). Phylogeny and classification of spiders. *Spiders of North America: An Identification Manual*, 18–24.
<https://doi.org/10.1006/bojl.2000.0418>
- Colgrave, M. L., & Craik, D. J. (2004). Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: The importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry*, *43*(20), 5965–5975. <https://doi.org/10.1021/bi049711q>
- Corzo, G., Bernard, C., Clement, H., Villegas, E., Bosmans, F., Tytgat, J., ... Alagón, A. (2009). Insecticidal peptides from the therapsid spider *Brachypelma albiceps*: An NMR-based model of Ba2. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1794*(8), 1190–1196.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.04.004>
- Corzo, G., & Escoubas, P. (2003). Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *60*(11), 2409–2426.
<https://doi.org/10.1007/s00018-003-3108-6>
- Corzo, G., Gilles, N., Satake, H., Villegas, E., Dai, L., Nakajima, T., & Haupt, J. (2003). Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. *FEBS Letters*, *547*(1–3), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00666-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00666-5)
- Corzo, G., Sabo, J. K., Bosmans, F., Billen, B., Villegas, E., Tytgat, J., & Norton, R. S. (2007). Solution structure and alanine scan of a spider toxin that affects the activation of mammalian voltage-gated sodium channels. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(7), 4643–4652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605403200>
- Corzo, G., Villegas, E., Gómez-Lagunas, F., Possani, L. D., Belokoneva, O. S., & Nakajima, T. (2002). Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(26), 23627–23637. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200511200>
- Cox, J. J., Reimann, F., Nicholas, A. K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., ... Woods, C. G. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*, *444*(7121), 894–898.
<https://doi.org/10.1038/nature05413>

- Cox, J. J., Sheynin, J., Shorer, Z., Reimann, F., Nicholas, A. K., Zubovic, L., ... Parvari, R. (2010). Congenital insensitivity to pain: Novel SCN9A missense and in-frame deletion mutations. *Human Mutation*, *31*(9), 1670–1686.
<https://doi.org/10.1002/humu.21325>
- Curry, K., Peet, M. J., Magnuson, D. S. K., & McLennan, H. (1988). Synthesis, Resolution, and Absolute Configuration of the Isomers of the Neuronal Excitant 1-Amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic Acid. *Journal of Medicinal Chemistry*, *31*(4), 864–867. <https://doi.org/10.1021/jm00399a030>
- De Lera Ruiz, M., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *Journal of Medicinal Chemistry*, *58*(18), 7093–7118. <https://doi.org/10.1021/jm501981g>
- Deng, M., Luo, X., Meng, E., Xiao, Y., & Liang, S. (2008). Inhibition of insect calcium channels by huwentoxin-V, a neurotoxin from Chinese tarantula *Ornithoctonus huwena* venom. *European Journal of Pharmacology*, *582*(1–3), 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.014>
- Deng, M., Luo, X., Xiao, Y., Sun, Z., Jiang, L., Liu, Z., ... Liang, S. (2014). Huwentoxin-XVI, an analgesic, highly reversible mammalian N-type calcium channel antagonist from Chinese tarantula *Ornithoctonus huwena*. *Neuropharmacology*, *79*, 657–667.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.01.017>
- Deuis, J. R., Dekan, Z., Wingerd, J. S., Smith, J. J., Munasinghe, N. R., Bholra, R. F., ... Vetter, I. (2017). Pharmacological characterisation of the highly Na⁺ V_{1.7} selective spider venom peptide Pn3a. *Nature Publishing Group*, (January), 1–18.
<https://doi.org/10.1038/srep40883>
- Dib-Hajj, S. D., Yang, Y., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2012). The NaV1.7 sodium channel: from molecule to man. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrn3404>
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, *51*(1), 7–61.
<https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Dong, K. (1997). A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol*, *27*(2), 93–100.
<https://doi.org/S0965174896000823> [pii]

- Dong, X. W., Goregoaker, S., Engler, H., Zhou, X., Mark, L., Crona, J., ... Priestley, T. (2007). Small interfering RNA-mediated selective knockdown of Nav1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channel reverses mechanical allodynia in neuropathic rats. *Neuroscience*, *146*(2), 812–821.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.054>
- England, S., & De Groot, M. J. (2009). Subtype-selective targeting of voltage-gated sodium channels. *British Journal of Pharmacology*, *158*(6), 1413–1425.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00437.x>
- Escoubas, P., & Rash, L. (2004). Tarantulas: Eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, *43*(5), 555–574.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.02.007>
- Estrada, G., Villegas, E., & Corzo, G. (2007). Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Natural Product Reports*, *24*(1), 145–161. <https://doi.org/10.1039/b603083c>
- Faber, C. G., Lauria, G., Merkies, I. S. J., Cheng, X., Han, C., Ahn, H.-S., ... Waxman, S. G. (2012). Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(47), 19444–19449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216080109>
- Feng, G., Deák, P., Chopra, M., & Hall, L. M. (1995). Cloning and functional analysis of TipE, a novel membrane protein that enhances *Drosophila para* sodium channel function. *Cell*, *82*(6), 1001–11. [https://doi.org/0092-8674\(95\)90279-1](https://doi.org/0092-8674(95)90279-1)
- Foelix, R. F. (2011). *Biology of spiders*. Oxford University Press.
- Frank Bosmans, Marie-France Martin-Eauclaire, K. J. S. (2009). Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels. *Nature*, *456*(7219), 202–208. <https://doi.org/10.1038/nature07473>. Deconstructing
- Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D. a, King, G. F., ... de la Vega, R. C. R. (2009). The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *10*, 483–511.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., & Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, *438*(7065), 185–192.
<https://doi.org/10.1038/nature04089>
- Geoffrey Woods, C., Osman Eltahir Babiker, M., Horrocks, I., Tolmie, J., & Kurth, I.

- (2014). The phenotype of congenital insensitivity to pain due to the NaV1.9 variant p.L811P. *European Journal of Human Genetics*, 23(23), 561–563. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.166>
- Goldin, A. L. (2001). RESURGENCE OF SODIUM CHANNEL RESEARCH.
- Goldschen-Ohm, M. P., Capes, D. L., Oelstrom, K. M., & Chanda, B. (2013). Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. *Nature Communications*, 4, 1350. <https://doi.org/10.1038/ncomms2356>
- Gribkoff, V. K. (2006). The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17(5), 555–564. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2006.09.002>
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., ... Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 473–508. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10.1>
- Guy, H. R., & Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(2), 508–512. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.2.508>
- Hains, B. C., Klein, J. P., Saab, C. Y., Craner, M. J., Black, J. a, & Waxman, S. G. (2003). Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(26), 8881–8892.
- Haupt, J. (2003). *The Mesothelae - a monograph of an exceptional group of spiders (Araneae: Mesothelae)*. Stuttgart, Germany: Schweizerbart Science Publishers. Retrieved from http://www.schweizerbart.de/publications/detail/isbn/9783510550418/Zoologica_Heft_154
- He, H., Liu, Z., Dong, B., Zhang, J., Shu, X., Zhou, J., & Ji, Y. (2011). Localization of receptor site on insect sodium channel for depressant β -toxin BmK IT2. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014510>
- Hutchison, A. J., Williams, M., Angst, C., de Jesus, R., Blanchard, L., Jackson, R. H., ... al., et. (1989). 4-(Phosphonoalkyl)- and 4-(phosphonoalkenyl)-2-piperidinecarboxylic acids: synthesis, activity at N-methyl-D-aspartic acid

- receptors, and anticonvulsant activity. *J Med Chem*, 32(9), 2171–2178. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2549246>
- J.N.C., K., & J.A., K. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*, 179(1), 4–29. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2200-z>
- Jackson, H., & Parks, T. N. (1989). Spider Toxins: Recent Applications in Neurobiology. *Annual Review of Neuroscience*, 12(1), 405–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.12.030189.002201>
- Kaiser, I. I., Griffin, P. R., Aird, S. D., Hudiburg, S., Shabanowitz, J., Francis, B., ... Odell, G. V. (1994). Primary structures of two proteins from the venom of the Mexican red knee tarantula (*Brachypelma smithii*). *Toxicon*, 32(9), 1083–1093. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90392-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90392-1)
- Kemp, J. A., & McKernan, R. M. (2002). NMDA receptor pathways as drug targets. *Nature Neuroscience*, 5(Supp), 1039–1042. <https://doi.org/10.1038/nn936>
- King, G. (2013). Venoms to Drugs: Translating Venom Peptides into Therapeutics. *Australian Biochemist*, 44(3), 13–16. Retrieved from http://www.asbmb.org.au/magazine/2013-December_Issue44-3/Technical%5CnFeature%5Cn3%5Cn-%5CnKing.pdf
- King, G. F. (2007). Modulation of insect Cav channels by peptidic spider toxins. *Toxicon*, 49(4), 513–530. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.012>
- King, G. F., Escoubas, P., & Nicholson, G. M. (2008). Peptide toxins that selectively target insect NaV and Ca V channels. *Channels*, 2(2), 100–116. <https://doi.org/10.4161/chan.2.2.6022>
- Lehmann, J., Schneider, J., McPherson, S., Murphy, D. E., Bernard, P., Tsai, C., ... Boehm, C. (1987). CPP, a selective N-methyl-D-aspartate (NMDA)-type receptor antagonist: characterization in vitro and in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 240, 737–746.
- Leipold, E., Hansel, A., Borges, A., & Heinemann, S. H. (2006). Subtype specificity of scorpion beta-toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain 3. *Molecular Pharmacology*, 70(1), 340–347. <https://doi.org/10.1124/mol.106.024034>.polypeptides
- Leipold, E., Liebmann, L., Korenke, G. C., Heinrich, T., Gießelmann, S., Baets, J., ... Kurth, I. (2013). A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. *Nature Genetics*, 45(11), 1399–1404.

<https://doi.org/10.1038/ng.2767>

Li-Smerin, Y., & Swartz, K. J. (2000). Localization and molecular determinants of the Hanatoxin receptors on the voltage-sensing domains of a K(+) channel. *The Journal of General Physiology*, *115*(6), 673–684.

<https://doi.org/10.1085/jgp.115.6.673>

Liang, S. (2004). An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [=Ornithoctonus huwena (Wang)]. *Toxicon*, *43*(5), 575–585. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.02.005>

Lou, K.-L., Hsieh, M.-H., Chen, W.-J., Cheng, Y.-C., Jian, J.-N., Lee, M.-T., ... Liou, H.-H. (2017). Hanatoxin inserts into phospholipid membranes without pore formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.032>

Loughney, K., Kreber, R., & Ganetzky, B. (1989). Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell*, *58*(6), 1143–1154.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90512-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90512-6)

Lucas, S. M., Gonzalez Filho, H. M. O., Paula, F. D. S., Gabriel, R., & Brescovit, A. D. (2011). Redescription and new distribution records of *Acanthoscurria natalensis* (Araneae: Mygalomorphae: Theraphosidae). *Zoologia (Curitiba, Impresso)*, *28*(4), 525–530. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702011000400015>

Mayer, M. L. (2006). Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature*, *440*(7083), 456–462. <https://doi.org/10.1038/nature04709>

Mourão, C. B. F., Heghinian, M. D., Barbosa, E. A., Mari, F., Bloch, C., Restano-Cassulini, R., ... Schwartz, E. F. (2013). Characterization of a novel peptide toxin from *acanthoscurria paulensis* spider venom: A distinct cysteine assignment to the HWTX-II family. *Biochemistry*, *52*(14), 2440–2452.

<https://doi.org/10.1021/bi4000035>

Nardi, A., Damann, N., Hertrampf, T., & Kless, A. (2012). Advances in Targeting Voltage-Gated Sodium Channels with Small Molecules. *ChemMedChem*, *7*(10), 1712–1740. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200298>

Nicholson, G. M. (2007). Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon*, *49*(4), 490–512.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.027>

Norton, R. S., & Pallaghy, P. K. (1998). The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon*, *36*(11), 1573–1583.

- [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00149-4)
- O'Brien, B. J., Caldwell, J. H., Ehring, G. R., Bumsted O'Brien, K. M., Luo, S., & Levinson, S. R. (2008). Tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 are expressed in the retina. *Journal of Comparative Neurology*, *508*(6), 940–951. <https://doi.org/10.1002/cne.21701>
- Osborne, R. H. (1996). Insect neurotransmission: Neurotransmitters and their receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, *69*(2), 117–142. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)02054-3](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)02054-3)
- Ozawa, S., Kamiya, H., & Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, *54*(5), 581–618. [https://doi.org/S0301-0082\(97\)00085-3](https://doi.org/S0301-0082(97)00085-3) [pii]
- Paoletti, P., & Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, *7*(1), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011>
- Rash, L. D., & Hodgson, W. C. (2001). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, *40*(3), 225–254. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00199-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00199-4)
- Rates, B., Prates, M. V., Verano-Braga, T., Da Rocha, Â. P., Roepstorff, P., Borges, C. L., ... De Lima, M. E. (2013). μ -Theraphotoxin-An1a: Primary structure determination and assessment of the pharmacological activity of a promiscuous anti-insect toxin from the venom of the tarantula *Acanthoscurria natalensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae). *Toxicon*, *70*, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.04.013>
- Reis, H. J., Prado, M. a, Kalapothakis, E., Cordeiro, M. N., Diniz, C. R., De Marco, L. a, ... Romano-Silva, M. a. (1999). Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider *Phoneutria nigriventer*. *The Biochemical Journal*, *343 Pt 2*, 413–8. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3430413>
- Sanguinetti, M. C., Johnson, J. H., Hammerland, L. G., Kelbaugh, P. R., Volkmann, R. a, Saccomano, N. a, & Mueller, a L. (1997). Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Molecular Pharmacology*, *51*(3), 491–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058605>
- Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Das, S., Cui, J., Talantova, M. V, ...

- Lipton, S. A. (2002). Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, *87*(4), 2052–63.
<https://doi.org/10.1152/jn.00531.2001>
- Schmalhofer, W. A., Calhoun, J., Burrows, R., Bailey, T., Kohler, M. G., Weinglass, A. B., ... Priest, B. T. (2008). ProTx-II, a Selective Inhibitor of Na^v1.7 Sodium Channels, Blocks Action Potential Propagation in Nociceptors. *Molecular Pharmacology*, *74*(5), 1476–1484.
<https://doi.org/10.1124/mol.108.047670>
- Shcherbatko, A., Rossi, A., Foletti, D., Zhu, G., Bogin, O., Casas, M. G., ... Strop, P. (2016). Engineering highly potent and selective microproteins against Nav1.7 sodium channel for treatment of pain. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(27), 13974–13986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725978>
- Shinozaki, H., Ishida, M., Shimamoto, K., & Ohfune, Y. (1989). A conformationally restricted analogue of l-glutamate, the (2S,3R,4S) isomer of l-a(carboxycyclopropyl)glycine, activates the NMDA-type receptor more markedly than NMDA in the isolated rat spinal cord. *Brain Research*, *480*(1–2), 355–359. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90207-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90207-2)
- Shu, Q., & Liang, S. P. (1999). Purification and characterization of huwentoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *The Journal of Peptide Research : Official Journal of the American Peptide Society*, *53*(5), 486–91. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.1999.00039.x>
- Smith, J. J., Alphy, S., Seibert, A. L., & Blumenthal, K. M. (2005). Differential phospholipid binding by site 3 and site 4 toxins: Implications for structural variability between voltage-sensitive sodium channel domains. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(12), 11127–11133.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M412552200>
- Smith, J. J., Cummins, T. R., Alphy, S., & Blumenthal, K. M. (2007). Molecular interactions of the gating modifier toxin ProTx-II with Na^v1.5: Implied existence of a novel toxin binding site coupled to activation. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(17), 12687–12697.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M610462200>
- Smith, J. J., Hill, J. M., Little, M. J., Nicholson, G. M., King, G. F., & Alewood, P. F.

- (2011). Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(26), 10478–10483.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1103501108>
- Soderlund, D. M., & Knipple, D. C. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *33*(6), 563–577. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00023-7)
- Song, W., Du, Y., Liu, Z., Luo, N., Turkov, M., Gordon, D., ... Dong, K. (2011). Substitutions in the domain III voltage-sensing module enhance the sensitivity of an insect sodium channel to a scorpion β -toxin. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(18), 15781–15788. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.217000>
- Song, W., Liu, Z., Tan, J., Nomura, Y., & Dong, K. (2004). RNA editing generates tissue-specific sodium channels with distinct gating properties. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(31), 32554–32561.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M402392200>
- Stevens, M., Peigneur, S., & Tytgat, J. (2011). Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Frontiers in Pharmacology*, *2* NOV(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00071>
- Swartz, K. J. (2007). Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon*, *49*(2), 213–230.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.024>
- Swartz, K. J., & MacKinnon, R. (1995). An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron*, *15*(4), 941–949.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90184-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90184-1)
- Swartz, K. J., & MacKinnon, R. (1997a). Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. *Neuron*, *18*(4), 665–673.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80306-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80306-2)
- Swartz, K. J., & MacKinnon, R. (1997b). Mapping the receptor site for hanatoxin, a gated modifier of voltage-dependent K⁺ channels. *J. Physiol. (London)*, *244*, 511–534.
- Tan, J., Liu, Z., Nomura, Y., Goldin, A. L., & Dong, K. (2002). Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(13), 5300–5309. <https://doi.org/20026551>

- Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A., & Grishin, E. V. (2010). Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry (Moscow)*, *74*(13), 1505–1534.
<https://doi.org/10.1134/s0006297909130069>
- Vieira, L. B., Kushmerick, C., Hildebrand, M. E., Garcia, E., Stea, A., Cordeiro, M. N., ... Snutch, T. P. (2005). Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *314*(3), 1370–7.
<https://doi.org/10.1124/jpet.105.087023>
- Wang, X., Connor, M., Smith, R., Maciejewski, M. W., Howden, M. E., Nicholson, G. M., ... King, G. F. (2000). Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. *Nat. Struct. Biol*, *7*(6), 505–513. <https://doi.org/10.1038/75921> [doi]
- Warmke, J. W., Reenan, R. A., Wang, P., Qian, S., Arena, J. P., Wang, J., ... Cohen, C. J. (1997). Functional expression of *Drosophila* para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. *The Journal of General Physiology*, *110*(2), 119–33. <https://doi.org/10.1085/jgp.110.2.119>
- Watanabe, E., Fujikawa, a, Matsunaga, H., Yasoshima, Y., Sako, N., Yamamoto, T., ... Noda, M. (2000). Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(20), 7743–7751. <https://doi.org/20/20/7743> [pii]
- Wen, S., Wilson, D. T. R., Kuruppu, S., Korsinczky, M. L. J., Hedrick, J., Pang, L., ... Nicholson, G. M. (2005). Discovery of an MIT-like atracotoxin family: Spider venom peptides that share sequence homology but not pharmacological properties with AVIT family proteins. *Peptides*, *26*(12), 2412–2426.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.05.012>
- Williams, K. (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology*, *44*(4), 851–859. <https://doi.org/7901753>
- Williams, K. (1996). Separating dual effects of zinc at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience Letters*, *215*(1), 9–12.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)12924-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)12924-4)
- Wilson, M. J., Zhang, M.-M., Azam, L., Olivera, B. M., Bulaj, G., & Yoshikami, D. (2011). NaV Subunits Modulate the Inhibition of NaV1.8 by the Analgesic Gating Modifier O-Conotoxin MrVIB. *Journal of Pharmacology and*

- Experimental Therapeutics*, 338(2), 687–693.
<https://doi.org/10.1124/jpet.110.178343>
- Windley, M. J., Herzig, V., Dziemborowicz, S. A., Hardy, M. C., King, G. F., & Nicholson, G. M. (2012). Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins*, 4(3), 191–227. <https://doi.org/10.3390/toxins4030191>
- Wong, E. H., Kemp, J. A., Priestley, T., Knight, A. R., Woodruff, G. N., & Iversen, L. L. (1986). The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(18), 7104–7108. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.18.7104>
- Wulff, H., Castle, N. A., & Pardo, L. A. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 8(12), 982–1001.
<https://doi.org/10.1038/nrd2983>
- Xiao, Y., Bingham, J. P., Zhu, W., Moczydlowski, E., Liang, S., & Cummins, T. R. (2008). Tarantula huwentoxin-IV inhibits neuronal sodium channels by binding to receptor site 4 and trapping the domain II voltage sensor in the closed configuration. *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 27300–27313.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M708447200>
- Xiao, Y., Blumenthal, K., Jackson, J. O., Liang, S., & Cummins, T. R. (2010). The Tarantula Toxins ProTx-II and Huwentoxin-IV Differentially Interact with Human Nav1.7 Voltage Sensors to Inhibit Channel Activation and Inactivation. *Molecular Pharmacology*, 78(6), 1124–1134.
<https://doi.org/10.1124/mol.110.066332>
- Xiao, Y., Blumenthal, K., Jackson, J. O., Liang, S., & Cummins, T. R. (2010). The tarantula toxins ProTx-II and huwentoxin-IV differentially interact with human Nav1.7 voltage sensors to inhibit channel activation and inactivation. *Molecular Pharmacology*, 78(6), 1124–1134. <https://doi.org/10.1124/mol.110.066332>
- Xiao, Y., Jackson, J. O., Liang, S., & Cummins, T. R. (2011). Common molecular determinants of tarantula huwentoxin-IV inhibition of Na⁺ channel voltage sensors in domains II and IV. *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), 27301–27310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.246876>
- Yamakura, T., & Shimoji, K. (1999). Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Progress in Neurobiology*, 59(3), 279–298.
[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00007-6)
- Yao, Y., & Mayer, M. L. (2006). Characterization of a Soluble Ligand Binding

- Domain of the NMDA Receptor Regulatory Subunit NR3A. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(17), 4559–4566. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0560-06.2006>
- Yu, F. H., & Catterall, W. a. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4(3), 207. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-207>
- Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. a, & Catterall, W. a. (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 387–395. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.13.1>
- Zhang, P. F., Chen, P., Hu, W. J., & Liang, S. P. (2003). Huwentoxin-V, a novel insecticidal peptide toxin from the spider *Selenocosmia huwena*, and a natural mutant of the toxin: Indicates the key amino acid residues related to the biological activity. *Toxicon*, 42(1), 15–20. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00095-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00095-3)
- Zhang, X. Y., Wen, J., Yang, W., Wang, C., Gao, L., Zheng, L. H., ... Liu, J. Y. (2013). Gain-of-Function mutations in SCN11A cause familial episodic pain. *American Journal of Human Genetics*, 93(5), 957–966. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.016>