



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Peptídeos isolados da peçonha da aranha caranguejeira
Acanthoscurria paulensis: caracterização da atividade eletrofisiológica em
canais iônicos dependentes de voltagem**

Autor: Diogo Vieira Tibery

Brasília - DF

Fevereiro, 2020

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer aos meus pais e minha família que me apoiaram todos os dias e me deram condições para me dedicar exclusivamente à pesquisa.

Agradecer à minha namorada que me deu todo o apoio nessa etapa crucial da minha vida e sempre me deu suporte nos momentos mais difíceis.

Agradecer à minha orientadora Elisabeth Schwartz por ter me dado oportunidade desde 2013, quando iniciei a pesquisa, oferecendo projetos de iniciação científica. Por toda a orientação necessária para a realização desse trabalho e suporte.

Agradecer à Dra. Caroline Barbosa Mourão por ter me aceitado como seu estagiário e compartilhado conhecimentos sobre a toxinologia.

Agradecer ao Dr. Leandro Ambrósio por ter me ensinado a técnica de *Patch Clamp*.

Aos meus colegas de pesquisa que me ajudaram diariamente durante esse projeto ou em algum momento dentro da pesquisa Daniel da Mata, Alessa Bembom, Isolda Monteiro, Mariza Mendanha, Gabriel Avohay, Luís Felipe Santos Menezes, Harry Morales, Beatriz Sarmiento, Adolfo Carlos Barros de Souza, Elias Sabiá e Danilo Gustavo.

Agradeço ao Professor Lourival Possani por me aceitar em seu laboratório no Instituto de Biotecnologia (IBT) da *Universidad Autónoma De México - Cuernavaca (UNAM)*. Ao Dr. Ernesto Ortiz e Dra. Rita Restano-Cassulini por terem me oferecido todo o suporte necessário para minha estadia no México.

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Biologia Molecular pela oportunidade.

Agradeço a CAPES, CNPq e FAPDF pelo apoio financeiro dado durante o período deste projeto.

Resumo

Aranhas são artrópodes da ordem Araneae que possuem em suas peçonhas uma grande diversidade de compostos, como sais, ácidos orgânicos, enzimas, proteínas e peptídeos. Dentre esses compostos os peptídeos possuem grande interesse farmacológico devido à atividade neurotóxica por meio da ação em canais iônicos dependentes de voltagem presentes no sistema nervoso central, sistema nervoso periférico, músculo cardíaco e músculo esquelético. Da peçonha da aranha caranguejeira encontrada no território brasileiro *Acanthoscurria paulensis*, foram descritos aproximadamente 100 componentes. Dentre esses componentes apenas uma toxina peptídica Ap1a foi purificada e caracterizada quanto à sua atividade biológica. Neste trabalho foram purificadas cinco novas toxinas peptídicas nomeadas como Ap2, Ap3, Ap4, Ap5 e Ap6 por RP-HPLC, sequenciadas por *In-souce Decay* e suas sequências completadas e confirmadas pela análise no transcrito da glândula de peçonha de *A. paulensis*. Os peptídeos Ap2, Ap3, Ap4, Ap5 e Ap6 possuem, respectivamente, com 42, 41, 35, 46 e 31 resíduos de aminoácidos, e, massas moleculares experimentais de 4886,3 Da, 4883,7 Da, 3870,76 Da, 5454,9 Da e 3717,9 Da, sendo que o peptídeo Ap2, apresenta a serina do C-terminal amidada. Buscas em bancos de dados públicos de sequências indicaram que peptídeos Ap2, Ap3, Ap4, Ap5 e Ap6 possuem similaridades com toxinas peptídicas que apresentam o motivo estrutural conhecido como ICK (*Inhibitory Cystine Knot*) sendo possíveis moduladoras de canais iônicos. Desta forma, as toxinas isoladas neste trabalho foram submetidas a ensaios eletrofisiológicos em canais de Na⁺ (Nav) e de Ca²⁺ (Cav) dependentes de voltagem. Dentre os canais Nav1.1, Nav1.5, Nav1.7, Cav1.2, Cav2.1 e Cav2.2 testados, as toxinas Ap2, Ap3, Ap5 e Ap6, apresentaram atividade, com inibição entre 10 e 30%, nos canais Cav2.1. Estas quatro toxinas são, portanto, caracterizadas como as primeiras ω-toxinas de aranhas caranguejeiras do gênero *Acanthoscurria* com atividade em canais de cálcio descritas. A toxina Ap3 inibiu em 6,6%, 4,2% e 12,05% os canais Nav1.1, Nav1.5 e Nav1.7 respectivamente. O presente trabalho contribui para a ampliação do conhecimento a respeito dos componentes da peçonha de aranhas no Brasil, assim como para a descrição de novos compostos bioativos que podem ser utilizados como ferramentas farmacológicas para compreensão do mecanismo de funcionamento de canais iônicos e da interação com toxinas peptídicas.

Resumo em Inglês – Abstract

Spiders are arthropods from the Aranae order that have in their venoms a great diversity of compounds, such as salts, organic acids, enzymes, proteins and peptides. Among these compounds, peptides are of pharmacological interest due to their neurotoxic activity, acting on voltage-dependent ion channels present in the central nervous system, peripheral nervous system, cardiac muscle and skeletal muscle. In the venom of the spider *Acanthoscurria paulensis* found in Brazilian territory, approximately 100 components were described, among these components only the peptide toxin Ap1a was purified and had experiments to characterize biological activity. In this present work, five new peptide toxins entitled as Ap2, Ap3, Ap4, Ap5 and Ap6 were purified by RP-HPLC, sequenced by In-souce Decay and their sequences completed and confirmed by analysis in the transcriptome of the venom gland. *A. paulensis*. The Ap2, Ap3, Ap4, Ap5 and Ap6 peptides have, respectively, 42, 41, 35, 46 and 31 amino acid residues, and experimental molecular masses of 4886.3, 4883.7, 3870.76, 5454.9 and 3717.9 Da, with the Ap2 peptide having the amidated C-terminal serine. Searching in sequence databases indicated that Ap2, Ap3, Ap4, Ap5 and Ap6 peptides have similarities with peptide toxins that present the structural motif known as ICK (Inhibitory Cystine Knot), which have the possibility of modulating ion channels. The toxins isolated in the present work were submitted to electrophysiological experiments in voltage-dependent Na⁺ (NaV) and Ca²⁺ (CaV) channels. Among the channels NaV1.1, NaV1.5, NaV1.7, CaV1.2, CaV2.1 and CaV2.2 tested, the toxins Ap2, Ap3, Ap5 and Ap6, showed inhibition activity between 10 and 30%, in CaV2.1 channel. These four toxins are, therefore, characterized as the first ω -toxins of spiders of the genus *Acanthoscurria* that have activity in calcium channels described. The Ap3 toxin inhibited the channels NaV1.1, NaV1.5 and NaV1.7 by 6.6%, 4.2% and 12.05% respectively. With these results, the present work contributes to the expansion of knowledge about the components of the venom of spiders in Brazil, as well as to the description of new bioactive compounds that can be used as pharmacological tools to understand the mechanism of functioning of ion channels and interaction with peptide toxins.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Espécime fêmea de <i>Acanthoscurria paulensis</i>	11
Figura 2 - Representação esquemática do Canal de Sódio Dependente de Voltagem..	17
Figura 3 - Ilustração Canal de Cálcio Dependente de Voltagem.	22
Figura 4 - Protocolos de estímulo utilizado para o <i>Patch Clamp</i>	33
Figura 5 - Cromatograma de 5 mg peçonha bruta <i>A. paulensis</i> por RP-HPLC..	36
Figura 6 – Cromatograma purificação do peptídeo Ap2..	37
Figura 7 - Espectro de Massas do peptídeo Ap2.....	37
Figura 8 – Cromatograma Purificação do peptídeo Ap3.....	38
Figura 9 - Espectro de Massas do peptídeo Ap3.....	39
Figura 10 – Cromatograma Sub-fracionamento da fração os peptídeos Ap4 e Ap5....	40
Figura 11 – Cromatograma Purificação do peptídeo Ap4.	41
Figura 12 - Espectro de Massas do peptídeo Ap4.....	41
Figura 13 – Cromatograma Purificação do peptídeo Ap5.	42
Figura 14 - Espectro de massas do peptídeo Ap5	43
Figura 15 – Cromatograma Purificação do peptídeo Ap6.	44
Figura 16 - Espectro de massas do peptídeo Ap6.	44
Figura 17 - Sequência parcial do peptídeo Ap2 obtida por meio da técnica de espectrometria de massas (MS) pelo método de <i>In-Source Decay</i> (ISD).....	45
Figura 18 - Sequência parcial do peptídeo Ap3 obtida por meio da técnica de espectrometria de massas (MS) pelo método de <i>In-Source Decay</i> (ISD).....	46
Figura 19 - Sequência parcial do peptídeo Ap4 obtida por meio da técnica de espectrometria de massas (MS) pelo método de <i>In-Source Decay</i> (ISD).....	47
Figura 20 - Sequência parcial do peptídeo Ap5 obtida por meio da técnica de espectrometria de massas (MS) pelo método de <i>In-Source Decay</i> (ISD).....	48
Figura 21 - Sequência parcial do peptídeo Ap6 obtida por meio da técnica de espectrometria de massas (MS) pelo método de <i>In-Source Decay</i> (ISD).....	49
Figura 22 - Alinhamento múltiplo das sequências completas obtidas dos peptídeos purificados.....	49
Figura 23 - Espectro de massas da fração contendo Ap4 e Ap4b.....	50
Figura 24 - Alinhamento dos peptídeos Ap4 e Ap4b.....	50
Figura 25 - Probabilidade de abertura em canais Nav na presença da Ap2 (1µM).....	51

Figura 26 - Traços Brutos obtidos nos Canais Nav na presença do peptídeo Ap2 1µM.	51
Figura 27 - Probabilidade de abertura em canais Nav na presença da Ap3 1µM.	52
Figura 28 - Traços Brutos obtidos nos Canais Nav na presença da Ap3 1µM.	52
Figura 29 - Probabilidade de abertura em canais Nav na presença da Ap4 1µM.	53
Figura 30 - Traços Brutos obtidos em Canais Nav na presença da Ap4 1µM.	53
Figura 31 - Probabilidade de abertura em canais Nav na presença de Ap5 1µM.	54
Figura 32 - Traços Brutos obtidos em Canais Nav na presença de Ap5 1µM.	54
Figura 33 - Probabilidade de abertura em canais Nav na presença de Ap6 1µM.	55
Figura 34 - Traços Brutos obtidos em Canais Nav na presença de Ap6.	55
Figura 35 – Caracterização eletrofisiológica obtida em canais Cav na presença do Peptídeo Ap2.	58
Figura 36 – Caracterização eletrofisiológica obtida em canais Cav na presença do Peptídeo Ap3.	59
Figura 37 – Caracterização eletrofisiológica obtida em canais Cav na presença do Peptídeo Ap4.	60
Figura 38 – Caracterização eletrofisiológica obtida em canais Cav na presença do Peptídeo Ap5.	61
Figura 39 – Caracterização eletrofisiológica obtida em canais Cav na presença do Peptídeo Ap6.	62
Figura 40 - Alinhamento Ap2, Ap3 e Ap5	65
Figura 41 – Alinhamento múltiplo com peptídeos que apresentaram similaridade com os Peptídeos Ap2, Ap3 e Ap5.	68
Figura 42 - Alinhamento Múltiplo com os peptídeos que apresentaram similaridade com o peptídeo Ap4.	70
Figura 43 - Alinhamento Múltiplo com os peptídeos que apresentaram similaridade com o peptídeo Ap6.	72

Lista de tabelas

Tabela 1 - Isoformas do Canais Nav humanos. SNC - Sistema Nervoso Central; SNP – Sistema Nervoso Periférico.....	18
Tabela 2 - Isoformas das subunidades $\alpha 1$ dos canais Cav	21
Tabela 3 – Nomenclatura de toxinas baseadas na função farmacológica. Adaptado de King et al., 2008.....	23
Tabela 4 Valores das médias de $\Delta V_{1/2}$ e Fu obtidos para os canais de sódio na presença dos peptídeos de aranha. Dados obtidos pelo ajuste na equação de Boltzmann ($\Delta V_{1/2}$), cálculo da fração de fração não inibida (Fu) e número de observações (n). Valores de média e erro padrão. Valores com (*) são estatisticamente significantes.	56
Tabela 5 – Valores das médias da porcentagem de inibição (%) em canais cálcio. Valores com * são estatisticamente significantes.	63

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABS: Absorbância

ACN: Acetonitrila

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

Cav: Canal de cálcio dependente de voltagem

CHO: Células de Ovário de hamster chinês

Da: Daltons

DDH: *Disulfide-directed β -hairpin*

DRG: Gânglios da raiz dorsal

DUM: *Dorsal unpaired median*

gNa: Condutância ao íon sódio

HEK: Células embrionárias de rim humano

HVA: *High-voltage-activated*

ICK: *Inhibitory Cystine Knot*

TFA: Ácido trifluoroacético

ACN: Acetonitrila

HCCA: *α -Cyano-4-hydroxynamic acid*

DAN: 1,5 Diaminonaftaleno

ISD: *In-source Decay*

Nav: Canal de sódio dependente de voltagem

Kv: Canal de potássio dependente de voltagem

V_{Max}: Voltagem que estimula a corrente de maior amplitude

HnTx: Hainantoxina

HwTx: Huwentoxina

PSM: Motivo estrutural principal ICK

ESM: Motivo estrutural extra ICK

Sumário

Agradecimentos.....	2
Resumo	3
Lista de Ilustrações	5
1 – Introdução.....	11
Aranhas caranguejeiras – Generalidades	11
<i>Acanthoscurria paulensis</i>	11
Composição bioquímica da peçonha de aranhas	12
Acilpoliaminas.....	12
Peptídeos Lineares	12
Motivos estruturais de toxinas peptídicas de aranhas	13
Eletrofisiologia – História	14
Canais iônicos e o Potencial de Ação	15
Canais de Sódio (Nav)	16
Sítios de Ligação nos Nav e as Toxinas ICK	18
Canais de Cálcio (Cav).....	20
Nomenclatura para toxinas.....	23
Peçonha de aranha e seus potenciais farmacológicos	24
Estudos da caracterização da peçonha de <i>Acanthoscurria paulensis</i>	25
2 – Justificativa.....	26
3 – Objetivos	27
3.1 – Objetivo Geral.....	27
3.2 – Objetivos Específicos	27
4 - Metodologia	28
4.1 Extração da Peçonha por eletroestimulação	28
4.2 Cromatografia Líquida de Alta eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC).....	28
4.3 Espectrometria de massa (MALDI TOF/TOF)	30

4.4	Quantificação dos peptídeos (Colorimetria BCA-Cobre)	30
4.5	Sequenciamento (<i>In-source Decay</i> – MALDI TOF-TOF).....	30
4.6	Busca por similaridade.....	30
4.7:	Cultura de células	31
4.8	Plasmídeos – Canais de cálcio dependentes de voltagem	31
4.9	Transfecção Transiente canais de Calcio dependentes de voltagem	32
4.10	Eletrofisiologia – <i>Setup</i> experimental para <i>Patch Clamp</i>	32
4.11	Eletrofisiologia – Análise de dados.....	33
5	– Resultados	36
5.1	Fracionamento de peçonha Bruta e Purificação dos peptídeos	36
5.2	Sequenciamentos.....	45
5.3	Eletrofisiologia em canais de sódio dependentes de voltagem.....	51
5.4	Eletrofisiologia em canais de cálcio dependentes de voltagem.....	57
6	– Discussão.....	64
5	– Conclusão	75
6	– Perspectivas	76
	Referências Bibliográficas	77

1 – Introdução

Aranhas caranguejeiras – Generalidades

As aranhas são artrópodes, filo que constitui aproximadamente 75-85% das espécies conhecidas. Pertencem à ordem Araneae e habitam o ambiente terrestre há mais de 300 milhões de anos, pela datação de fósseis. Existindo atualmente catalogadas 48.424 espécies em 120 famílias e 4154 gêneros (Natural History Museum Bern, 2020). A família das aranhas Theraphosidae popularmente conhecidas como tarântulas ou caranguejeiras, possuem atualmente 147 gêneros descritos (Escoubas and Rash, 2004; Natural History Museum Bern, 2020; Rash and Hodgson, 2002). As aranhas possuem glândulas produtoras de peçonha localizadas abaixo do segmento queliceral e quelíceras capazes de injetar a peçonha, sendo a peçonha utilizada tanto para predação de invertebrados e pequenos vertebrados, como proteção contra vertebrados maiores (Escoubas and Rash, 2004).

Acanthoscurria paulensis

Dez espécies do gênero *Acanthoscurria* foram descritas no Brasil por Mello-Leitão em 1923 (Mello-Leitão, 1923). Dentre essas espécies foi catalogada a *Acanthoscurria paulensis* a partir de um macho encontrado em Pirassununga no Estado de São Paulo. Vellard, em 1924, descreveu a espécie *Acanthoscurria atrox* que posteriormente foi identificada como a mesma espécie que *A. paulensis* por Lucas e colaboradores 2010 e foi mantido o nome dado por Mello-Leitão (Lucas et al., 2010).



Figura 1 - Espécime fêmea de *Acanthoscurria paulensis*. Fotos: Diogo Tibery. Esquerda: Vista Dorsal de exemplar de *Acanthoscurria paulensis* fêmea. Direita: Vista ventral de exemplar de *Acanthoscurria paulensis* fêmea

Composição bioquímica da peçonha de aranhas

Os componentes da peçonha de aranha são produzidos pelas glândulas secretoras, sendo revestidas por uma camada de músculo que controla a liberação de peçonha e innervada por pequenos axônios, sugerindo um controle nervoso sobre as células secretoras (Malli et al., 2000). São descritos componentes de baixa massa molecular, peptídeos, proteínas e enzimas (Langenegger et al., 2019). Os componentes de baixa massa molecular caracterizados são aminoácidos livres, íons, acilpoliaminas, ácidos orgânicos, nucleotídeos e nucleosídeos (Kuhn-Nentwig et al., 2011).

Acilpoliaminas

As acilpoliaminas são um grupo de compostos estruturados a partir de um grupo aromático acil e um esqueleto de poliaminas, podendo estar presente alguns aminoácidos em seu esqueleto, com massas moleculares de 350 a 1000 Da (Kuhn-Nentwig et al., 2011; Manzoli-Palma et al., 2006). As acilpoliaminas possuem como um dos alvos moleculares os canais ionotrópicos, atuando, por exemplo, em receptores de glutamato (GluR) de insetos e de mamíferos, despertando interesse como inseticidas, ou como fármacos (Mellor and Usherwood, 2004). A acilpoliamina AG489 da aranha *Agelenopsis aperta* apresentou atividade inibitória no receptor de capsaicina TRPV1, um canal catiônico não seletivo, mostrando o grande potencial farmacológico desses compostos (Manzoli-Palma et al., 2006).

Peptídeos Lineares

Os peptídeos lineares da peçonha de aranha não apresentam cisteínas em suas sequências primárias, podendo apresentar a formação de α -hélices, e são classificados como possíveis peptídeos citolíticos ou antimicrobianos (AMPs), apresentando características catiônicas (Kuhn-Nentwig, 2003; Langenegger et al., 2019). Tais toxinas possuem alta densidade de aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente, como Arginina e Lisina (Corzo and Escoubas, 2003), que apresentam atração pelos grupos com carga negativa presentes nos fosfolípidios de membranas celulares e promovem desestabilização com formação de poros (Langenegger et al., 2019).

Motivos estruturais de toxinas peptídicas de aranhas

Toxinas peptídicas ricas em cisteínas encontradas em peçonhas de aranhas caranguejeiras formam ligações dissulfeto entre si, permitindo a formação de estruturas compactadas. Três motivos estruturais compreendem tais toxinas peptídicas, o motivo ICK (*inhibitor cystine-knot*), o motivo DDH (*disulfide direct β -hairpin*) e o motivo Kunitz-like (Vassilevski et al., 2009).

O motivo de ICK é caracterizado por uma folha beta de 3 fitas antiparalelas que são estabilizados por 3 ligações dissulfeto (King et al., 2002). O motivo estrutural segue o consenso da disposição dos resíduos de cisteínas $C^1X_{3-7}C^2X_{3-6}C^3X_{0-5}C^4X_{1-4}C^5X_{4-13}C^6$, onde C^n é o número da cisteína na estrutura primária e X_n é número de resíduos de aminoácidos entre as cisteínas; ocorre um anel de cistina nas ligações C^1-C^4 e C^2-C^5 e que são transpassados por uma terceira cistina C^3-C^6 formando um nó entre as cistinas (Norton and Pallaghy, 1998; Pallaghy et al., 1994). O “submotivo” PSM (*Principal structural Motif*) dentro do motivo ICK, restringe as quatro primeiras cisteínas $C^1X_{3-7}C^2X_{3-6}C^3X_{0-5}C^4X_1$ como a região responsável pela possível atividade neurotóxica. Outro “submotivo” foi descrito para toxinas com 7 ou 8 cisteínas que seguem o padrão ICK nas 6 primeiras cisteínas mas apresentam cisteínas extras, tal motivo foi escrito como ESM (*Extra structural motif*) e apresenta a adição de resíduos de aminoácidos após a C^6 com mais duas cisteínas intercaladas por apenas um resíduo de aminoácidos, seguindo o consenso $C^5X^{4-13}C^6X_nC^7X_1C^8$ (Kozlov et al., 2005)

No motivo DDH, não existe a formação do nó de cistinas e ocorre a formação de uma estrutura β -Hairpin estabilizada por duas ligações dissulfeto obrigatórias (C^1-C^4 e C^2-C^5), seguindo uma sequência consenso de $CX_{5-19}CX_2-[G \text{ ou } P]-X_2CX_{6-19}C$. Acredita-se que o motivo DDH seja a estrutura que deu origem, na evolução molecular, ao motivo ICK (Wang et al., 2000; Escoubas and Rash, 2004).

O motivo do tipo Kunitz apresenta a ligação das cisteínas no consenso $C1-C6, C2-C5, C3-C5$, permitindo a formação de uma folha- β antiparalela (Langenegger et al., 2019). Nas aranhas caranguejeiras *Ornithoctonus huwena* e *O. hainana* foi descrita uma nova família de KTT (*Kunitz type toxins*) capaz de inibir serinoproteases e que apresenta atividade fraca em canais de potássio $K_v1.1$ (Yuan et al., 2008).

Eletrofisiologia – História

O início da eletrofisiologia se dá pelos estudos de Luige Galvani ,em 1771, ao supor uma energia elétrica vital em formato de fluido, responsável pela condução nervosa e a contração muscular ao observar a contração muscular nas pernas de sapo após contato de um equipamento eletricamente carregado (Piccolino, 1998). Allessandro Volta, em 1800, produziu a primeira bateria eletroquímica baseada em placas de zinco e cobre, sendo um passo essencial para os futuros experimentos de Giovanni Aldini que utilizou a energia proveniente das baterias para demonstrar a “reanimação” do corpo de um assassino recém executado. Carlo Matteuci, em 1840, após a criação do galvanômetro em 1820 por Hans Oersted, utilizou o galvanômetro para detecção de um fluxo de corrente elétrica em músculos intactos e, ao colocar pernas de rã em série, a corrente detectada apresentava-se maior com a adição de mais pernas em série, mostrando a origem de natureza biológica da corrente elétrica detectada (Piccolino and Wade, 2012).

A eletrofisiologia “moderna” se inicia em 1939 por Alan Hodgkin e Andrew Huxley pelo primeiro registro de um potencial de ação da fibra de um axônio gigante de lula (Hodgkin and Huxley, 1939). Entre 1947 e 1949, surgiu a ideia de controle da voltagem (*Voltagem Clamp*) das membranas com o uso de dois eletrodos, sendo um para o controle da voltagem e outro para o registro da variação de corrente. Dessa forma, permitiu o registro de correntes iônicas diretamente, sem a presença dos problemas causados pelos outros métodos de registro, sendo tal advento do trabalho de K. S. Cole, G. Marmont, A. Hodgkin e A. Huxley (Hille, 2001).

A. Hodgkin e A. Huxley , em 1952, após diversos estudos com variações de condições das soluções de registro descobriram que as correntes iônicas tinham como principais componentes os íons Na^+ e K^+ , sendo esses dois componentes separados e descritos como correntes de sódio e correntes de potássio. Ao analisar as cinéticas das correntes de sódio e potássio foi proposto o modelo “ m^3h, n^4 ,” em que se supôs que para um canal de potássio abrir por uma variação de voltagem necessitaria de partículas carregadas “ n ”, sendo que n^4 apresentaria a cinética ideal para o ajuste dentro dos dados experimentais, sendo a condutância do íon potássio $g_K = G_K n^4$ e, para as correntes de sódio, foi proposto a presença partículas m , sendo m^3 o ajuste ideal para a ativação do canal e h a partícula de inativação, sendo a condutância do sódio $g_{Na} = g_{Na} m^3 h$. Descrição de tal modelo na época impressiona, pois não havia conhecimento sobre os sensores de voltagem do canal de sódio, que foi apenas descrito

em 1980 por Beneski e Catterall, sendo o movimento de três sensores associados diretamente ao processo de ativação do canal e um sensor relacionado ao processo de inativação do canal (Hodgkin and Huxley, 1952; Schwiening, 2012; Beneski and Catterall, 1980; Catterall, 2017).

Canais iônicos e o Potencial de Ação

Os canais iônicos dependentes de voltagem são proteínas transmembrânicas que apresentam seletividade maior para um íon específico dos fluídos intracelulares ou extracelulares. A estrutura básica de um canal iônico dependente de voltagem consiste em quatro domínios transmembrânicos que se unem formando poro iônico seletivo e uma região ao redor do poro responsável por captar as variações de voltagem na membrana e produzir alterações conformacionais para a abertura do poro iônico. Tal estrutura básica é conservada com modificações específicas para cada um dos canais dependentes de voltagem existentes.

Os canais iônicos são responsáveis pela excitabilidade elétrica das células em organismos, sendo os elementos excitáveis básicos na membrana celular dos nervos, músculos e outros tecidos possibilitando a iniciação, propagação e transdução do sinal elétrico (Hille, 2001; Yu and Catterall, 2003; Yu, 2005). Os canais de sódio dependentes de voltagem são ativados com variação de milivolts na membrana que, ao atingir o limiar, permite o influxo substancial de íons Na^+ para o interior da célula e promove a despolarização da membrana. Ao despolarizar a membrana, canais de potássio são ativados e permitem o efluxo de íons K^+ para a repolarização da membrana em valores negativos. Entre o processo de despolarização total da membrana e a repolarização, ocorre a ativação dos canais de cálcio, que apresentam limiar de ativação entre os canais de sódio e potássio, gerando o influxo do íon Ca^{2+} que, além de transmitir cargas positivas para dentro da célula, funciona como segundo mensageiro em respostas celulares. Tal processo descrito é conhecido como potencial de ação (Catterall et al., 2017). O potencial de ação foi o mecanismo selecionado pela evolução para a rápida transmissão de informações em formato de sinal elétrico a partir do sistema nervoso para células, tecidos, músculos, com velocidade de transmissão e amplitudes constantes em condições fisiológicas ideais (Raghavan et al., 2019).

Canais de Sódio (Nav)

Os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) são proteínas transmembrânicas formadas por duas subunidades (α/β), a subunidade α formadora de poro possui aproximadamente 260 kDa e 2000 resíduos de aminoácidos organizados em quatro domínios homólogos (DI-DIV), sendo que cada um dos domínios é formado por seis segmentos transmembrânicos (S1-S6) (Figura 2). Os domínios são bem conservados entre si, apresentando a região conhecida como sensor de voltagem localizada entre os segmentos transmembrânicos S1-S4 e a região formadora de poro S5-S6.

Os segmentos transmembrânicos S4 possuem resíduos de Arg e Lys intercalados por outros aminoácidos, caracterizando uma região rica em resíduos com cargas positivas conhecidas como *Gating charges* (Ahern et al., 2016). A condutância ao sódio pelo canal se inicia pela despolarização da membrana que altera o campo elétrico em que as *Gating charges* dos resíduos Arg e Lys estão estabilizadas e promove assim o deslocamento dos segmentos transmembrânicos S4 para a porção extracelular e o movimento dos segmentos S4 entre segmentos hidrofóbicos em que estão alocados promove a movimentação entre as alças de ligação entre segmentos S4-S5 e afasta assim os segmentos S6, iniciando o influxo do íon Na^+ (Yan et al., 2017; Clairfeuille et al., 2019; Ahern et al., 2016).

Os sensores de voltagem dos domínios DI, DII e DIII se movimentam mais rápido que o sensor de voltagem do DIV e essa assincronia na movimentação é uma característica essencial no processo de ativação e inativação do canal, uma vez que a movimentação do sensor de voltagem do domínio 4 está associada ao deslocamento de uma alça intracelular entre o DIII e DIV que contém um motivo IFM (isoleucina, fenilalanina, metionina) que atua como uma comporta de inativação do canal, interrompendo rapidamente a condutância do Na^+ e caracterizando o processo de inativação rápida, única dos canais Nav (Lacroix et al., 2013; Goldschen-Ohm et al., 2013; Capes et al., 2013).

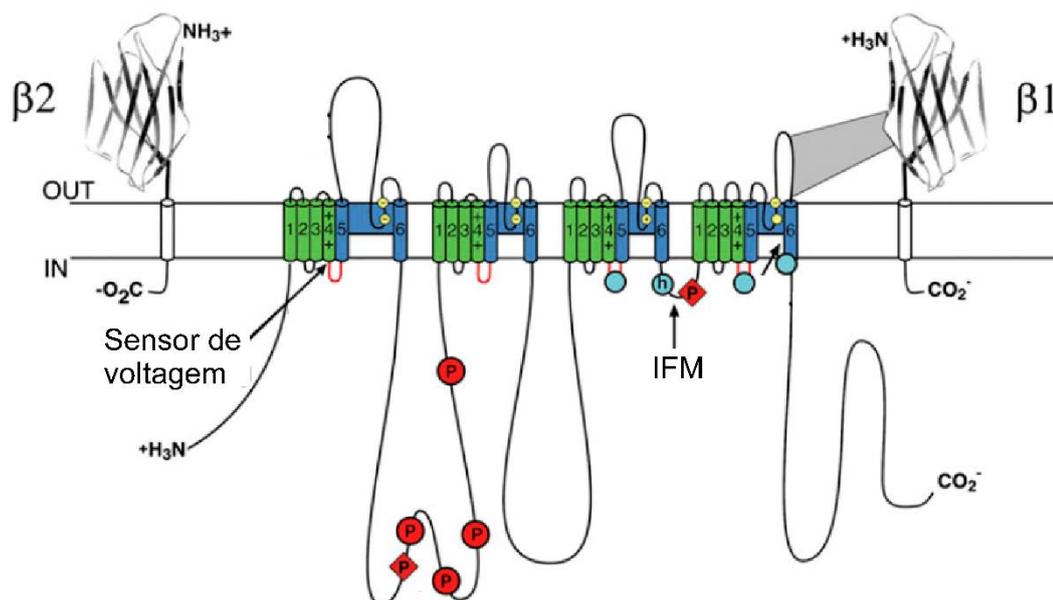


Figura 2 - Representação esquemática do Canal de Sódio Dependente de Voltagem. Em verde a representação da região sensor de voltagem S1-S4. Em vermelho as alças intracelulares entre os segmentos S4-S5. Em Azul escuro representação dos segmentos formadores de poro S5-S6 (Adaptado de W. A. Catterall and Swanson 2015).

O filtro de seletividade está presente na parte superior do caminho de passagem para o íon, sendo formado por 4 cargas negativas oriundas de resíduos de ácido glutâmico na parte mais extracelular no canal de bactéria Na_vAb , formando a estrutura chamada de HFS (*High-Field-Strength*) altamente carregada, também conhecida como DEKA em canais de mamífero, formada pelos resíduos Asp373-Glu901-Lys1421-Ala1713, sendo essa estrutura essencial para a seletividade ao íon Na^+ (Payandeh et al., 2011; Catterall, 2017; Jiang et al., 2020).

Em humanos, são descritas atualmente 9 isoformas da subunidade α ($\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$) com particularidades quanto ao funcionamento e distribuição nos tecidos do sistema nervoso central, sistema nervoso periférico, músculo esquelético e músculo cardíaco (Alexander et al., 2015; Kwong and Carr, 2015) (Tabela1).

Tabela 1 - Isoformas do Canais Nav humanos. SNC - Sistema Nervoso Central; SNP – Sistema Nervoso Periférico

Isoforma	Expressão	Gene
Nav1.1	SNC, SNP	SCN1A
Nav1.2	SNC, SNP	SCN2A
Nav1.3	SNC, SNP	SCN3A
Nav1.4	Músculo Esquelético	SCN4A
Nav1.5	Músculo Cardíaco	SCN5A
Nav1.6	SNC, SNP	SCN8A
Nav1.7	SNP	SCN9A
Nav1.8	SNP	SCN10A
Nav1.9	SNC	SCN11A

Existem dois tipos de subunidades β no canal de sódio $\beta 1/\beta 3$ e $\beta 2/\beta 4$, sendo que as subunidades $\beta 1/\beta 3$ não são ligadas covalentemente à subunidade α , já as subunidades $\beta 2/\beta 4$ apresentam ligações dissulfeto com a subunidade formadora de poro (Gilchrist et al., 2013). As subunidades beta são capazes de modular o funcionamento da subunidade alfa aumentando a amplitude das correntes, alterando a dependência de voltagem na ativação e inativação do canal (Bouza and Isom, 2018).

Os canais de sódio dependentes de voltagem em insetos são bastante semelhantes aos canais de mamíferos, com pequenas modificações em sequência e sensibilidade aos moduladores. Igualmente aos canais de mamífero, são constituídos de 4 domínios homólogos e cada domínio possui os seis segmentos transmembrânicos, com a região do sensor de voltagem, a região formadora de poro e a de inativação rápida pela presença de um motivo MFM, similar ao motivo IFM de mamíferos (Du et al., 2016). Já foram caracterizados diversos canais de insetos, como o BgNav da barata *Blattella germanica*, Vssc1 da mosca doméstica e os canais PaFPC1e Navpas da barata *Periplaneta americana* (Du et al., 2016; Shen et al., 2017)

Sítios de Ligação nos Nav e as Toxinas ICK

Devido à sua grande função como iniciador do potencial de ação em diversos tecidos, o canal de sódio é o alvo de diversas toxinas com sítios de ligação ao canal bem definidos (Cestèle and Catterall, 2000; Catterall et al., 2007).

São descritos 5 sítios de interação das neurotoxinas ao canal de sódio, o sítio de interação 1 é o poro iônico, formado pelas alças intracelulares S5-S6 dos quatro domínios, sendo esse o sítio de ligação das toxinas tetrodotoxina (TTX) e saxitoxina (STX), que ao ligarem ao canal promovem bloqueio da corrente iônica sem alteração na dependência da voltagem. O sítio de interação 2 consiste no segmento S6 do domínio I pela porção intracelular, sendo o alvo molecular toxinas lipossolúveis e alcaloides, a ligação a esse sítio promove uma inibição do processo de inativação rápida do canal de sódio. O sítio de interação 3 é conhecido por ser a região de interação das toxinas α de escorpião, constituído da alça extracelular S3-S4 do domínio 4, sua interação por toxinas α de escorpião promove um atraso ou inibição do processo de inativação rápida, efeito similar ao da ligação pelo sítio 2, mas com interação extracelular. O sítio de interação 4 é o sítio de atuação das toxinas β de escorpião, formado pelas alças extracelulares do sensor de voltagem do domínio II, a sua ligação por β -toxinas de escorpião promove um aumento da excitabilidade do canal em voltagens próximas ao potencial de repouso, alterando a dependência de voltagem do canal de sódio junto com a inibição da amplitude de corrente. O sítio de interação 5 é composto pelo segmento S6 do domínio I e do segmento S5 do domínio 4 pela região intracelular, sua ligação por compostos lipofílicos promove efeito parecido com o da ligação ao sítio 2, com inibição da inativação rápida, mas com o adicional de deslocamento da voltagem para ativação do canal para potenciais mais negativos (Catterall et al., 2007; Cestèle and Catterall, 2000; Cestèle et al., 1998; Zilberberg et al., 1997; Lukowski and Narayan, 2019).

Toxinas de aranha com o motivo ICK são descritas com a capacidade de interagir com os sítios 3 e/ou 4 dos canais de sódio, promovendo tanto a inibição do canal por aprisionar o sensor de voltagem do domínio II no estado fechado, quanto o aumento da excitabilidade do canal por manter o sensor de voltagem do domínio II no estado ativado *up* e a inibição da inativação rápida por manter o sensor de voltagem do domínio 4 aprisionado na posição *down* (Dongol et al., 2019).

A superfície hidrofóbica rodeada por resíduos carregados formado pelo dobramento das toxinas compactadas pelo motivo ICK é uma característica essencial para a interação com canais iônicos (Dongol et al., 2019). A presença de resíduos hidrofóbicos e aromáticos entre as cisteínas C1 e C2, entre C5 e C6 e na região C-terminal, juntamente com os resíduos com carga positiva entre C5 e C6 e no C-terminal são essenciais para a complementariedade da toxina (Dongol et al., 2019). Na interação da toxina ProTx-II e o canal Nav1.7, o triptofano na posição

24 forma uma espécie de âncora hidrofóbica com a cavidade hidrofóbica entre os segmentos S2 e S3 do canal formada pelos resíduos A766-S2, L770-S2 e L812-S3 (Xu et al., 2019).

Na toxina HwTx-IV, a substituição da tirosina por um aminoácido mais hidrofóbico, triptofano, Y33W, aumentou a potência da toxina em Nav1.7 (Revell et al., 2013).

A carga geral do peptídeo afeta a interação com os canais de sódio, tal efeito foi mostrado com mutações na toxina HwTx-IV, apresentando uma redução de potência na inibição com a substituição de resíduos carregados negativamente de ácido glutâmico para resíduos neutros, glicina, nas posições 1 e 4 (Revell et al., 2013).

Canais de Cálcio (Cav)

Os canais Cav são proteínas de múltiplas subunidades, sendo compostas por uma subunidade principal ($\alpha 1$) e quatro subunidades auxiliares ($\alpha 2$, β , γ e δ). A subunidade $\alpha 1$ possui uma massa molecular de 190kDa, formada por quatro domínios repetidos (I-IV), cada domínio possui seis segmentos transmembrânicos (S1-S6), sendo que entre os segmentos S5-S6 de cada domínio existe um *loop* que é responsável pela formação do poro iônico e o segmentos S1-S4 responsáveis pelos sensores de voltagem, seguindo o mesmo padrão encontrado nos canais de sódio dependentes de voltagem (Wu et al., 2015). As subunidades $\alpha 1$ são caracterizadas pelo tipo de corrente produzida e pelas características farmacológica em L, P, Q, N, R e T, cada tipo dessas correntes é produzida por uma isoforma por uma das dez subunidades $\alpha 1$ existentes ou um grupo de isoforma $\alpha 1$ (Catterall, 2011; Catterall and Swanson, 2015).

As correntes do tipo L são produzidas pelos canais Cav1 e suas isoformas Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4, e são caracterizadas por apresentarem corrente duradoura quando utilizado o íon bário como principal íon condutível (*Long Lasting*) e serem sensíveis a dihidropiriminas (Lipscombe, 2004). As correntes produzidas pelos canais Cav2 são conhecidas como P-Q, N e R dependendo do subtipo.

O subtipo Cav2.1 produz corrente do tipo P nos canais com *splicing* alternativo encontrado nas células de Purkinje e Q para o *splicing* alternativo encontrado no cerebelo. Ambas são correntes que apresentam sensibilidade a toxinas de artrópodes e moluscos do gênero *Conus* (Richards et al., 2007). As correntes produzidas pelo subtipo Cav2.2 são caracterizadas como N por sua distribuição em neurônios do sistema nervoso central e periférico, relacionado também com o processo de exocitose em terminais pré-sinápticos,

apresentando sensibilidade a uma grande diversidade de toxinas de artrópodes (Catterall, 2011; Liu et al., 2006; Dolphin, 2016). O subtipo Cav2.3 é o canal responsável pela corrente do tipo R, tendo esse nome por sua característica de resistência a compostos que inibem as correntes dos outros representantes Cav2, sendo a toxina SNX-482 caracterizada como seu bloqueador mais sensível (Dolphin, 2016; Newcomb et al., 1998).

As correntes produzidas pelo subtipo Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3 são responsáveis pela corrente do tipo T, devido à sua abertura transiente, rápida. São os únicos representantes do grupo dos canais de cálcio ativados por pequena variação de voltagem (*Low Voltage Activated* – LVA) (Dolphin, 2016). Estão distribuídos em diversos neurônios e sua função está relacionada com a capacidade de disparos repetitivos de potenciais de ação e a atividade de marca-passo (Catterall, 2011; Zhao et al., 2019).

Tabela 2 - Isoformas das subunidades $\alpha 1$ dos canais Cav

Isoforma	Tipo de corrente	Distribuição	Gene
Cav1.1	L	Fibras musculares	CACNA1S
Cav1.2	L	Musculo Cardíaco	CACNA1C
Cav1.3	L	Neural	CACNA1D
Cav1.4	L	Retina	CACNA1F
Cav2.1	P - Q	Neural	CACNA1A
Cav2.2	N	Neural	CACNA1B
Cav2.3	R	Neural	CACNA1E
Cav3.1	T	Neural	CACNA1G
Cav3.2	T	Neural, Cel. Marca passo	CACNA1H
Cav3.3	T	Neural	CACNA1I

A subunidade β possui 55 kDa, formada por estrutura de α -hélice localizada na porção intracelular do canal (Wu et al., 2015). Sua associação à subunidade alfa promove deslocamento na dependência de voltagem para valores mais negativos. Em associação ao canal Cav2.1 diminuiu o efeito da inibição de corrente por estímulos em alta frequência além de proteger o canal Cav2.2 de degradação proteossomal (Dolphin, 2003, 2016; Richards et al., 2007; Page et al., 2016).

A subunidade γ é uma glicoproteína associada com quatro segmentos transmembrânicos e possui massa molecular de 33 kDa. Tal subunidade só foi encontrada em associação ao canal Cav1.1 em músculos esqueléticos (Wu et al., 2015; Logan and Iii, 2003).

As subunidades $\alpha 2$ e δ estão presentes no mesmo gene, sendo a região responsável pela subunidade δ alocada no final 3'. Estas duas subunidades são ligadas por ligação dissulfeto, muitas vezes sendo reconhecida apenas como subunidade $\alpha 2\delta$ de 170 kDa (Wu et al., 2015). As subunidades $\alpha 2\delta$ estão presentes apenas nos canais Cav1 e Cav2. Sua atividade está relacionada com o aumento da densidade de canais na membrana celular por facilitar a apresentação da proteína na membrana e modulação das cinéticas de ativação do canal (Dolphin, 2018).

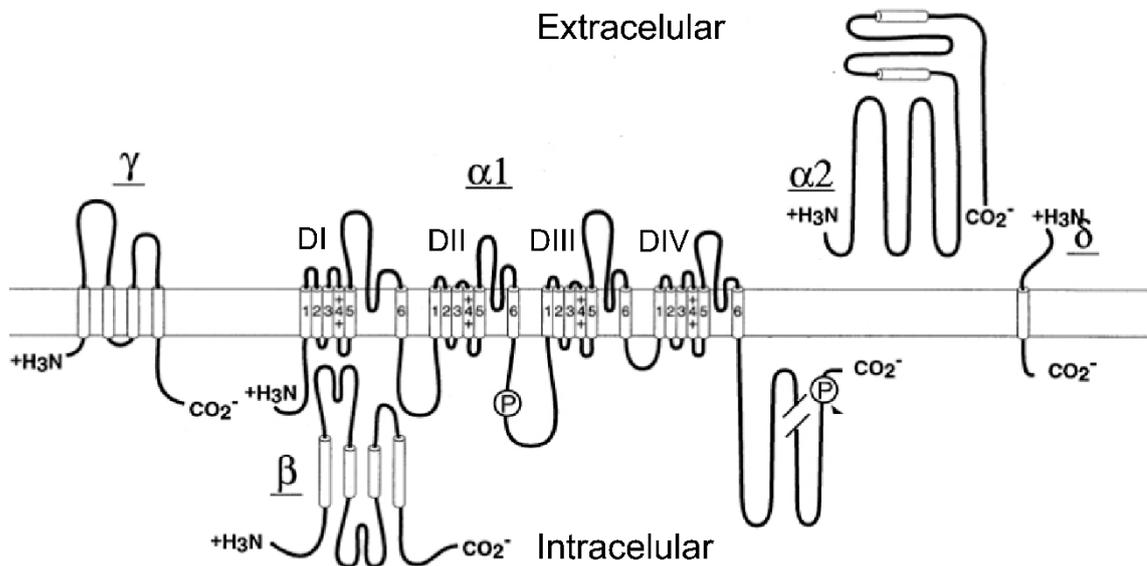


Figura 3 - Ilustração Canal de Cálcio Dependente de Voltagem. Adaptado de Catterall, 2000

Durante o registro das correntes de cálcio, algumas técnicas são utilizadas para obtenção de registros com melhor qualidade e correntes mais estáveis. As correntes de cálcio em canais de cálcio dependentes de voltagem apresentam, durante os registros, um fenômeno conhecido como *Rundown*, que consiste na diminuição da amplitude da corrente. Esse efeito tem início imediato após o rompimento da membrana e diluição do citosol, que contém fatores que regulam o canal de cálcio (Zamponi and Ph, 2005). Diversas técnicas podem ser usadas para minimizar esse efeito, desde o uso da técnica de *Perforated Patch Clamp* que leva à formação de pequenos poros na região de contato da pipeta de registro com a membrana celular (pelo uso de antimicrobianos formadores de poro ex: Amfotericina B), promovendo menor diluição do conteúdo intracelular, quanto à suplementação da solução interna de pipeta com ATP e inibidores de protease tipo calpastatina (Zamponi and Ph, 2005; Springer, 2013).

Nomenclatura para toxinas

Em 2008 King e colaboradores elaboraram uma nomenclatura racional para as toxinas peptídicas baseados na sua propriedade farmacológica e a posição taxonômica da espécie (King et al., 2008). Foi utilizado um caractere grego para representação da atividade farmacológicas, como, por exemplo, α para atividade em receptores de acetilcolina, β para moduladores da ativação de canais de Na^+ e ω inibidores de canais de Ca^{2+} (Tabela 3) (King et al., 2008).

Tabela 3 – Nomenclatura de toxinas baseadas na função farmacológica. Adaptado de King et al., 2008

Caractere Grego	Função farmacológica
α (alpha)	Receptores de acetilcolina
β (Beta)	Altera Dependência de voltagem para ativação dos canais de Na^+
γ (gamma)	Canais catiônicos não específicos HCN
δ (Delta)	Atrasa inativação dos canais de Na^+
ϵ (Episolon)	Canais de Cl^-
ζ (Zeta)	Canais cíclicos ativados por nucleotídeos
η (eta)	Canais de potássio tipo KIR
θ (Theta)	Canais de Potássio tipo K2P
ι (Iota)	Agonista de canais de Na^+
κ (Kappa)	Bloqueadores de canais de Potássio K_v
λ (Lambda)	Bloqueadores de canais de Potássio Dependentes de Cálcio K_{ca}
μ (Mu)	Bloqueadores de canais de sódio Na_v
ν (Nu)	Receptores de Acetilcolina
ξ (Xi)	Receptores de Endotelina
\omicron (Omicron)	Receptores de Octopamina
π (Pi)	Canais sensíveis a ácidos ASICs
ρ (Rho)	Adrenoreceptores
σ (Sigma)	Receptores de 5-HT
τ (Tau)	Canais TRP
υ (Upsilon)	Receptores de vasopressina/Oxitocina
ϕ (Phi)	Receptores de Rianodina
χ (Chi)	Transportadores de Noradrenalina
ψ (Psi)	Antagonista não-competitivos dos receptores de acetilcolina
ω (Omega)	Bloqueadores de canais de Ca^{2+}
Γ (Gamma)	Receptores de Glutamato
Λ (Lambda)	Receptores de GABA
\omicron (Omicron)	Receptores P2X
Σ (Sigma)	Canais CFTR
Ω (Omega)	Receptor do Fator de Crescimento Epitelial
Δ (Delta)	Atividade citolítica
U (<i>Unknown</i>)	Atividade desconhecida

Peçonha de aranha e seus potenciais farmacológicos

As peçonhas dos animais evoluíram por milhares de anos resultando na formação de compostos para proteção e predação, sendo selecionados pela natureza e que apresentam grande potencial farmacológico com alvos moleculares específicos (Pennington et al., 2018).

Compostos peptídicos com o motivo ICK vêm sendo descritos na peçonha de aranhas caranguejeiras e apresentam atividades em diversos tipos de canais iônicos dependentes de voltagem. Um dos compostos mais bem conhecidos é a toxina PrTx-II da aranha *Thrixopelma pruriens* com atividade inibitória em uma grande gama de canais Nav, com maior especificidade ao canal Nav1.7 (IC₅₀ = 0,3 nM) que está diretamente relacionado ao processo da dor (Middleton et al., 2002). A sensibilidade do canal Nav1.7 a toxinas de aranhas não está restrito à toxina ProTx-II, outras toxinas como a Huwentoxin-IV de *Selenocosmia huwena* possui um IC₅₀ de 26 nM em Nav1.7 (Xiao et al., 2008), μ -theraphotoxin-Pn3a de *Pamphobeteus nigricolor* com IC₅₀ de 0,9 nM (Deuis et al., 2017).

Toxinas isoladas de aranhas e seu potencial uso em doenças cardiovasculares é um tema bem discutido, sendo os canais iônicos com maior relevância nesse estudo os canais Nav1.1, Nav1.3, Nav1.5, Kv1, Kv2, Kv4, Kv11, K_{ATP} e o canal sensível a estiramento SAC (Lima, 2009). As toxinas PaTx1 e PaTx2 isoladas da aranha *Paraphysa scrofa* apresentam atividade nos canais Kv4.2 e Kv4.3 que possuem alta expressão no tecido cardíaco e modulam a duração e o formato do potencial de ação por suas correntes de potássio (Diochot et al., 1999). As toxinas JZTX-I/Delta-theraphotoxin-Cg1a e JZTX-III/Beta/kappa-theraphotoxin-Cg1a isoladas da aranha *Chilobrachys guangxiensis* apresentam atividade em diversos canais de Nav. Entretanto, tais toxinas apresentam uma maior sensibilidade sobre o canal Nav1.5 que é o canal de sódio majoritário nas células cardíacas (Xiao et al., 2004, 2005).

A utilização de toxinas de aranhas como biopesticidas é uma proposta biotecnológica como alto valor agregado no mercado de agrotóxicos para o controle de pragas (Windley et al., 2012). Toxinas com alvo molecular para canais iônicos de insetos são uma das estratégias evolutivas utilizadas pelas aranhas para sua predação efetiva, com a ocorrência de proteínas ricas em cisteínas formando muitas delas o motivo ICK (Windley et al., 2012). A toxina x-HXTX-Hv2a, da aranha *Hadronyche versuta*, é um dos exemplos de toxinas que convergiram para atuação mais seletiva em canais de insetos, apresentando o motivo ICK, tal toxina atua nos canais de cálcio de insetos com uma preferência avaliada em 10.000 vezes em comparação a canais de cálcio em vertebrados (Wang et al., 2001). A toxina Ap1a, isolada da aranha

Acanthoscurria paulensis, apresentou atividade de paralisia sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*, considerada uma das maiores pragas para a agricultura do milho no Brasil (Mourão et al., 2013a).

Estudos da caracterização da peçonha de *Acanthoscurria paulensis*

No primeiro estudo com a peçonha da aranha *Acanthoscurria paulensis* em 2012, a partir da separação cromatográfica da peçonha bruta, foram identificados 97 distintos componentes com massas moleculares entre 601,4 Da e 21.932,3 Da. Adicionalmente foi também caracterizada a LD₅₀ da peçonha bruta em camundongos de 25,4 ± 2,4 mg/g (Mourão et al., 2013b).

A primeira toxina isolada da peçonha foi a toxina Ap1a, sendo o peptídeo mais abundante na peçonha, com massa molecular monoisotópica de 5457,79 Da. Ao ser testada em lagartas *Spodoptera frugiperda* apresentou efeito dose-dependente de paralisia com uma DE₅₀ de 13.0±4.2 µg/g (Mourão et al., 2013a). Injeções intra-craniais da toxina Ap1a apresentara toxicidades em camundongos na dose de 30 ug por animal promovendo mioclonias, hipermotilidade, saltos e convulsões generalizadas. A partir do RNA total da glândula de peçonha de *Acanthoscurria paulensis* foi construída uma biblioteca de cDNA(Mourão et al., 2013a). Experimentos no circuito de Fibra Gigante de *Drosophila melanogaster* indicaram atividade sobre a junção neuromuscular, sugerindo possível efeito sobre receptores glutamatérgicos. Ap1a não apresentou atividade em canais de sódio Nav1.2, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6 e no receptor de acetilcolina nAch (Mourão et al., 2013a). Posteriormente, foi caracterizada fraca atividade em canais de sódio Nav1.1, Nav1.3 e Nav1.7 com inibição máxima de 30 % no canal Nav1.7 (Garcia, 2018).

2 – Justificativa

Estudos de componentes que possam modificar a atividade de canais são de grande interesse para os pesquisadores, tanto na descrição de suas estruturas quanto seus alvos farmacológicos. Na peçonha das aranhas, diversos componentes são descritos com atividade em canais iônicos, mais especificamente os peptídeos. Todavia da grande quantidade de aranhas existentes, poucas têm sua peçonha estudada e com isso diversos componentes potencialmente úteis para esses estudos farmacológicos não foram ainda descritos.

Da peçonha da aranha *Acanthoscurria paulensis* foram identificados inicialmente 97 componentes com massas de entre 601,4 Da e 21.932,3Da. Desses componentes, apenas o peptídeo Ap1a foi descrito quanto à sua atividade biológica em canais iônicos, atividade em camundongos e potencial bioinseticida.

O mal funcionamento de canais iônicos dependentes de voltagem pode levar a doenças conhecidas como canalopatias, sendo as mais conhecidas o distúrbio cardíaco intitulado síndrome de Brugada, síndromes de paralisia, dores crônicas e alguns tipos de epilepsia. O uso de moduladores de canais iônicos dependentes de voltagem, que podem interferir no funcionamento do canal e promover uma possível reversão da condição patológica é uma área da pesquisa de grande interesse médico.

O estudo de toxinas da peçonha de aranhas caranguejeiras é importante tanto para a caracterização dos componentes existentes na peçonha desse grupo de aranhas quanto para o potencial biotecnológico da utilização de suas toxinas como ferramentas farmacológicas para estudo de seus alvos.

3 – Objetivos

3.1 – Objetivo Geral

Caracterização da atividade de toxinas isoladas da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis* em canais iônicos dependentes de voltagem

3.2 – Objetivos Específicos

- Purificar os peptídeos presentes na peçonha da aranha *Acanthoscurria paulensis*
- Determinar as sequências primárias dos peptídeos purificados
- Avaliar ação dos peptídeos isolados por meio de ensaios eletrofisiológicos nos canais de Na⁺ Nav1.1, Nav1.5, Nav1.7 e canais de Ca²⁺ Cav1.2, Cav2.1 e Cav2.2

4 - Metodologia

4.1 Extração da Peçonha por eletroestimulação

Espécimes adultos da aranha *Acanthoscurria paulensis* de ambos os sexos, acondicionados vivos no Biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, foram estimulados na região basal das quelíceras utilizando eletroestimulador caseiro e suas peçonhas foram coletadas diretamente em tubos de polietileno tipo *ependorf* de 1,5 ml. Amostras foram solubilizadas em água Mili-Q, centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos para a remoção de substâncias que possam sedimentar, quantificadas por espectrofotômetro com luz UV a 280 nm (NanoVue® GE Healthcare) para proteínas totais, secas a vácuo (SpeedVac) e armazenadas a -20°C. O processo de extração é realizado com um intervalo de 40 dias e os animais são alimentados após a extração com baratas *Nauphoeta cinerea*.

Os espécimes de *Acanthoscurria paulensis* foram coletados conforme a permissão legal 24227-1 cedida pelo ICMBio. Espécimes foram coletados na região de cerrado próximo a Universidade de Brasília.

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 foram ressuspensas em uma solução de 0,12 % (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) em água. O material foi submetido ao sistema de cromatografia líquida de alta eficiência LC10A Shimadzu Co. (Kyoto, Japão) em coluna semipreparativa C18 Phenomenex. Para a eluição, utilizou-se gradiente binário de solução aquosa de TFA 0,12% (A) e de solução de acetonitrila de TFA 0,1 % (B), com 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 até seu uso.

4.2.2 Purificação do peptídeo Ap2

Após a separação da fração contendo o peptídeo Ap2 na cromatografia de peçonha bruta foi realizada uma segunda etapa de cromatografia utilizando coluna Phenomenex Kinetex F5 Core-shell. O método foi elaborado da seguinte forma: A partir da concentração de 15% ACN

atingida aos 15 min de corrida, um gradiente de 0,375 % de ACN por minuto foi iniciado até os 50 minutos de corrida atingindo concentração máxima de 50 % de ACN.

4.2.3 Purificação do peptídeo Ap3

A etapa final de purificação da fração contendo o peptídeo Ap3 utilizou uma coluna Phenomenex Kinetex F5 Core-shell aquecida a 45° C em um forno para coluna. O método utilizado foi construído da seguinte forma: A partir de uma concentração de 10 % de ACN estabelecida aos 10 minutos, foi iniciado um gradiente de 0,33 % de ACN por minuto até os 70 minutos de corrida atingindo a concentração final de 30% de ACN.

4.2.4 Purificação do peptídeo Ap4

A fração contendo o peptídeo Ap4 foi purificada utilizando coluna Phenomenex Kinetex F5 Core-shell. As garrafas contendo as soluções de HPLC foram resfriadas a 4° C por banho frio e as soluções foram preparadas utilizando uma concentração de 1 % de TFA. O método foi construído da seguinte forma: A partir de uma concentração de 10 % de ACN estabelecida aos 10 minutos, foi iniciado gradiente de 0,33 % de ACN por minuto até os 70 minutos de corrida atingindo a concentração final de 30 % de ACN.

4.2.5 Purificação do peptídeo Ap5

A etapa final de purificação da fração contendo o peptídeo Ap3 utilizou coluna Phenomenex Kinetex F5 Core-shell aquecida a 45°C em forno para coluna. O método utilizado foi construído da seguinte forma: A partir de uma concentração de 15% de ACN estabelecida aos 10 minutos, foi iniciado um gradiente de 0,33 % de ACN por minuto até os 70 minutos de corrida atingindo a concentração final de 35 % de ACN.

4.2.6 Purificação do peptídeo Ap6

O peptídeo Ap6 após a separação de sua fração na cromatografia de peçonha bruta foi submetido a apenas uma etapa adicional de purificação utilizando Coluna Phenomenex Kinetex C18 Core-shell. O método foi construído da seguinte forma: A partir de uma concentração de 20% acetonitrila estabelecido aos 10 minutos, iniciou-se um gradiente de 0,5% ACN por minuto até os 50 minutos de corrida atingindo a concentração final de 40% ACN.

4.3 Espectrometria de massa (MALDI TOF/TOF)

Para a avaliação do grau de pureza dos peptídeos de interesse e aferência da massa experimental utilizou-se espectrometria de massas em sistema MALDI TOF/TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha). Os peptídeos foram solubilizados em água Milli-Q e dissolvidos em matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (acetonitrila/água/TFA 3 %; 5:4:1) em uma razão de 2 μ L de amostra para 2 μ L de matriz, depositadas em uma placa de aço inox Anchorchip (600 mm) e secas à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em modo linear para avaliação da massa média e no modo refletido para avaliação das massas monoisotópicas utilizando o *software* FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha)

4.4 Quantificação dos peptídeos (Colorimetria BCA-Cobre)

Os peptídeos puros foram quantificados utilizando o *kit* para proteína BCA Protein Assay Kit[®] (ThermoFischer) utilizando o protocolo *enhanced*. Os peptídeos foram diluídos em água Milli-Q, misturados com os reagentes do kit na razão 1:1 e incubados a 60° C por 30 minutos. O produto da reação foi lido na absorbância de 562 nm e quantificado por cálculo em curva padrão calibrada com albumina bovina.

4.5 Sequenciamento (*In-source Decay* – MALDI TOF-TOF)

O sequenciamento parcial foi realizado em um sistema MALDI TOF-TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha) com o método de *In-source Decay* (ISD). Amostras dos peptídeos foram solubilizados em água Milli-Q em uma concentração de 1 μ g/ μ l e dissolvidos em uma matriz redutora saturada de 1,5-diaminonaphtaleno em uma razão de 1,5 μ L de amostra para 1,5 μ L de matriz.

4.6 Busca por similaridade

As seqüências completas obtidas foram submetidas a buscas por similaridade usando o programa BlastP, disponível online em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Os alinhamentos de seqüências foram realizados pelo programa Clustal Omega disponível *online* em <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

4.7: Cultura de células

4.7.1 Culturas de células expressando canais de sódio dependentes de voltagem (Nav1.1-Nav1.7)

Células HEK (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) expressando canais iônicos Nav1.1, e Nav1.5 de forma estável 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 (0,4 mg/mL). Células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) expressando canais iônicos Nav1.7 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 uma atmosfera umedecida contendo 5 % de CO₂ a 37° C. As culturas estáveis expressando canais de sódio dependentes de voltagem foi uma generosa doação da Dra. Rita Restano-Cassulini do Instituto de Biotecnologia da Universidade Autônoma do México (IBT-UNAM Cuernavaca – Morelos).

4.7.2 Célula HEK 293T

Células HEK 293T (*Human Embryonic Kidney SV-40 T-antigen*) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 4,5 % de Glicose, 10 % de Soro Fetal Bovino e 1 % de Antibiotic-Antimycotic® (Gibco). As células foram incubadas em uma atmosfera umedecida contendo 5 % de CO₂ a 37° C. A cultura de células HEK293T foi obtida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ.

4.8 Plasmídeos – Canais de cálcio dependentes de voltagem

Os plasmídeos contendo as sequências para a expressão dos canais de cálcio foram obtidos comercialmente do repositório da Addgene (Estados Unidos). Para a expressão das subunidades alfas foram utilizados os plasmídeos pcDNA6CaV1.2 (número de catálogo #26572) – Cav1.2, pcDNA6-Cav2.1(#26578) – Cav2.1, pcDNA6-Cav2.2 (#26570) – Cav2.2. Para a expressão da subunidade Beta foi utilizado o plasmídeo pcDNA3.1-β3 (#26574) - Cavβ₃. Para a expressão da subunidade α₂δ foi utilizado o plasmídeo pcDNA3.1- α₂δ₁ (#26575). O plasmídeo pEGFP-c1(Clontech, EUA) foi utilizado como repórter de transfecção transiente por expressar a proteína fluorescente verde *enhanced green fluorescent protein* EGFP.

4.9 Transfecção Transiente canais de Calcio dependentes de voltagem

Células HEK293T cultivadas em placas de petri de 40x10mm com confluência de 70-90% foram transfectadas utilizando Lipofectamine3000[®] (ThermoFischer scientific) em meio Opti-MEM[®] (Gibco) com 4 plasmídeos simultaneamente: pcDNA6-Ca_vα, pcDNA3.1-Ca_vβ₃, pcDNA3.1-α₂δ₁ e pEGFP-c1 em uma razão 1:1:1:0,1 μg respectivamente.

4.10 Eletrofisiologia – *Setup experimental para Patch Clamp*

4.10.1 Ensaios eletrofisiológicos em canais de sódio dependentes de voltagem

As macrocorrentes dos canais Nav foram estimuladas e registradas com a técnica de *Patch Clamp* utilizando o amplificador HEKA EPC 10 na configuração *Whole Cell* e o *software* PATCHMASTER (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Germany). Experimentos foram realizados a temperatura ambiente (21 a 25° C). Pipetas feitas de vidro borosilicato foram fabricadas imediatamente antes do uso no *Puller* horizontal (Sutter Instruments, USA) e após o preenchimento com a solução interna foram detectadas resistências de pipeta entre 1,5 e 2,5 MΩ. A Resistência em série foi de aproximadamente 10MΩ para todos os experimentos e foi compensada em pelo menos 60 %. Correntes capacitivas foram canceladas por protocolo *online* de estímulos p/4 com a voltagem de repouso em -120 mV. As correntes foram ativadas por um protocolo duplo de estímulo a partir de uma voltagem de repouso de -100 mV. Na primeira parte do protocolo, as correntes foram ativadas por 27 *sweeps* sequenciais com acréscimos de 5mV por *sweep* durante 30 ms, atingindo uma voltagem máxima de 30 mV, para a avaliação da ativação do canal. Na segunda parte do protocolo, um estímulo de -10 mV durante 10ms imediatamente após a primeira parte foi utilizado para avaliação da Inativação Lenta dos canais de sódio. Entre cada *sweep* do protocolo completo de estímulo foi realizado um intervalo de 2 s (Figura 5A). 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). As células foram banhadas em uma solução externa contendo (mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Glicose (pH ajustado para 7,4 com NaOH).

4.10.1 Ensaios eletrofisiológicos em canais de cálcio dependentes de voltagem

As macrocorrentes dos canais Cav foram estimuladas e registradas com a técnica de *Patch Clamp* utilizando o amplificador HEKA EPC 10 na configuração *Whole Cell* e o *software* PATCHMASTER (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Germany). Experimentos foram realizados a temperatura ambiente (21 a 25° C). Pipetas feitas de vidro borosilicato foram

fabricadas imediatamente antes do uso no *Puller* horizontal (Sutter Instruments, USA) e suas pontas foram polidas em uma microforja MF-900 (Narishige, Japão), após o preenchimento com a solução interna foram detectadas resistências de pipeta entre 2,5 e 4 MΩ. Correntes capacitivas foram canceladas por protocolo *online* de estímulos p/4 com a voltagem de repouso em -100 mV. As correntes foram inicialmente estimuladas em um protocolo I/V, aonde as correntes foram estimuladas a partir -50 mV até 30 mV, com acréscimos de 5 mV por *sweep* para determinação da voltagem que promove a corrente com maior amplitude (V_{Max}). Após a determinação de V_{Max} foram realizados estímulos com a voltagem estabelecida durante 200ms com intervalos de 30s entre cada estímulo (Figura 5B). As micropipetas foram preenchidas com solução interna contendo (mM): 126 CsCl₂, 10 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, 4 Mg ATP (pH ajustado para 7,3 com CsOH). As células foram banhadas em uma solução externa contendo (mM): 5 BaCl₂, 135 Colina-Cl, 10 HEPES, 4 MgCl₂ (pH ajustado para 7,4 com CsOH).

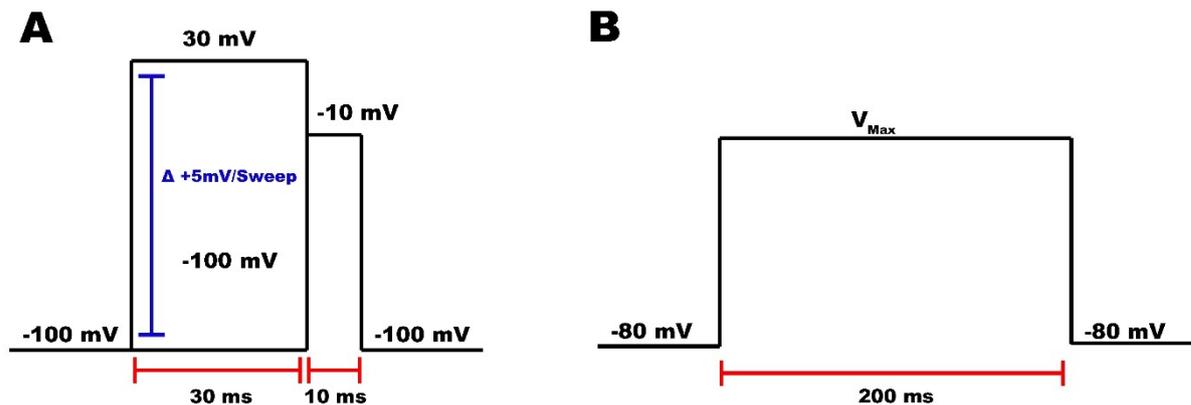


Figura 4 - Protocolos de estímulo utilizado para o Patch Clamp. **A:** Representação esquemática do protocolo de variação de voltagem utilizado para ativar as correntes de sódio dependentes de voltagem. **B:** Representação esquemática do protocolo de variação de voltagem utilizado para ativar as correntes de cálcio dependentes de voltagem.

4.11 Eletrofisiologia – Análise de dados

4.11.1 Análise de dados – Ensaios em canais de sódio dependentes de voltagem

A condutância ao sódio (g_{Na}) foi calculada a partir das correntes obtidas na primeira parte do protocolo utilizando a lei de Ohm,

$$g_{Na} = \frac{I_{Na}}{(V - V_{rev})}$$

onde V representa o potencial de estímulo que ativou a corrente, I_{Na} a corrente do íon sódio no dado potencial V, e V_{Rev} é o potencial de reversão do íon sódio calculado a partir das soluções internas e externa com a equação de Nernst,

$$V_{Rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na]_{Externa}}{[Na]_{Interna}}$$

onde R é a constante dos gases ideais, T a temperatura em Kelvin, F é a constante de Faraday, $[Na]_{Externa}$ é a concentração do íon sódio no meio externo e $[Na]_{Interna}$ é a concentração do íon sódio no meio interno.

Os dados experimentais foram ajustados em uma equação simples de Boltzmann para avaliar a probabilidade de abertura dos canais (pO),

$$g \text{ ou } pO = \frac{1}{1 + e^{\{(V-V_{1/2})/k\}}}$$

onde $V_{1/2}$ é a voltagem em que metade dos canais estão no estado aberto, k é *slope* de voltagem. Os valores de $\Delta V_{1/2}$ foram estipulados pela diferença entre o $\Delta V_{1/2}$ na condição controle menos $\Delta V_{1/2v}$ na presença do composto avaliado.

As correntes obtidas da segunda parte do protocolo (Figura 4) foram ajustados em equação simples de Boltzmann para avaliação da inativação lenta ou *Steady-State Inactivation* (SSI)

$$SSI = \frac{1}{1 + e^{\{(V-V_{1/2})/k\}}}$$

A porcentagem de canais de sódio foi estipulada pela a seguinte fórmula,

$$\text{Porcentagem de inibição} = \left(\frac{100 \times I_{maxToxina}}{I_{maxControle}} \right) - 100$$

4.11.2 Análise de dados – Ensaio em canais de cálcio dependentes de voltagem

As correntes de cálcio em *Patch Clamp* na configuração *Whole Cell* apresentam uma diminuição da amplitude da corrente conhecido como *Rundown*. Para que seja possível a avaliação da porcentagem de bloqueio de um composto sobre um canal que sofre *Rundown* é

necessário estimar o valor de corrente controle (I_{Pred}) correspondente ao mesmo tempo do valor da corrente na presença do composto avaliado, assumindo a tendência linear na ausência da toxina, levando em consideração o número de *sweep* decorridos a partir da aplicação da toxina.

A corrente controle foi estipulada com a seguinte fórmula:

$$I_{pred} = \frac{(I_{lavagem\ toxina} - I_{controle})}{(\#SW_{lavagem\ toxina} - \#SW_{controle})(\#SW_{toxina} - \#SW_{controle}) + I_{controle}}$$

Onde, $I_{Controle}$ é amplitude da corrente do último *sweep* antes da aplicação da toxina, I_{Toxina} é a amplitude corrente avaliada na presença da toxina, $I_{LavagemToxina}$ é a amplitude da corrente do último *sweep* da lavagem da toxina, I_{Pred} é a amplitude da corrente controle assumindo o comportamento linear *Rundown.*, $\#SW_{Controle}$ é o número do *sweep* no qual a $I_{Controle}$ foi medida, $\#SW_{Toxina}$ é o número do *sweep* no qual a I_{Toxina} foi medida e $\#SW_{LavagemToxina}$ é o número do *sweep* no qual a $I_{Lavagem}$ foi medida.

A porcentagem de inibição (%Inib) foi calculada da seguinte maneira:

$$\%Inib = \frac{(I_{Toxina} \times 100)}{I_{pred}} - 100$$

As diferenças entre as médias foram avaliadas estatisticamente com Teste T pareado e foram considerados estatisticamente quando obtido o valor de $P < 0.05$. Análises foram realizadas com o *software* GraphPad prism 5

5 – Resultados

5.1 Fracionamento de peçonha Bruta e Purificação dos peptídeos

Foram realizadas 20 cromatografias de peçonha bruta de *Acanthoscurria paulensis* utilizando aproximadamente 100 mg de peçonha bruta extraída de espécimes machos e fêmeas. As frações de interesse eluíram entre 26 e 33 % de acetonitrila (36 a 43 min), sendo que a fração eluída entre 36 e 38 minutos (26-28 % ACN) contém os peptídeos Ap2, Ap3 e Ap6. A fração que elui entre 39 e 41 minutos (29-31 % ACN) contém os peptídeos Ap1a, previamente descrito em Mourão e colaboradores 2013, e o peptídeo Ap4. A fração que elui aos 43 minutos (33 % ACN) contém o peptídeo Ap5 (Figura 5). Para a subsequente purificação dos compostos de interesse encontrados nas frações foram realizadas recromatografias utilizando colunas analíticas Kinetex C18, Core Shell C18, Core Shell F5 (Phenomenex) seguidos de otimização de gradiente de acetonitrila, concentração do agente de emparelhamento de íons TFA e temperatura da fase móvel e estacionária.

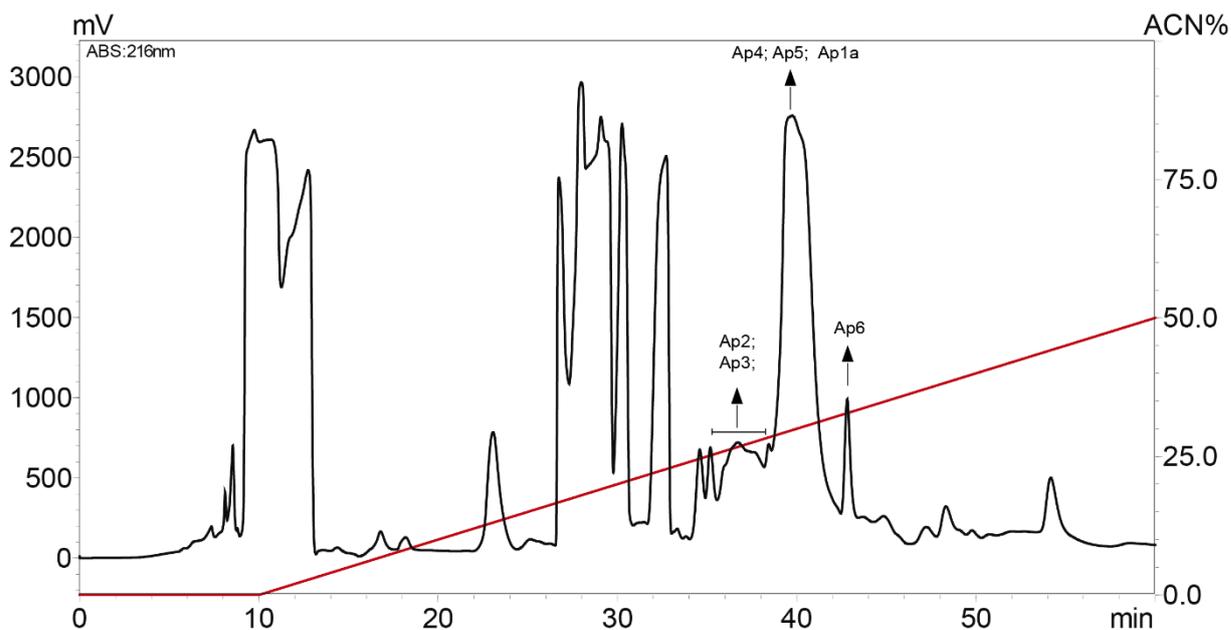


Figura 5 - Cromatograma de 5 mg peçonha bruta *A. paulensis* por RP-HPLC. O fracionamento foi realizado por meio de uma coluna C18 semipreparativa C18 (Phenomenex) com gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha vermelha com um fluxo de 1,5mL/min e absorbância monitorada a 216 nm.

O peptídeo Ap2 eluiu aos 35,9 minutos com 22,80 % de acetonitrila (Figura 6). A avaliação da pureza do peptídeo foi realizada por MALDI TOF/TOF no modo linear e sua massa molecular monoisotópica experimental foi de 4886,32 Da (Figura 7). Foi obtido total de 95,92 µg desse peptídeo puro.

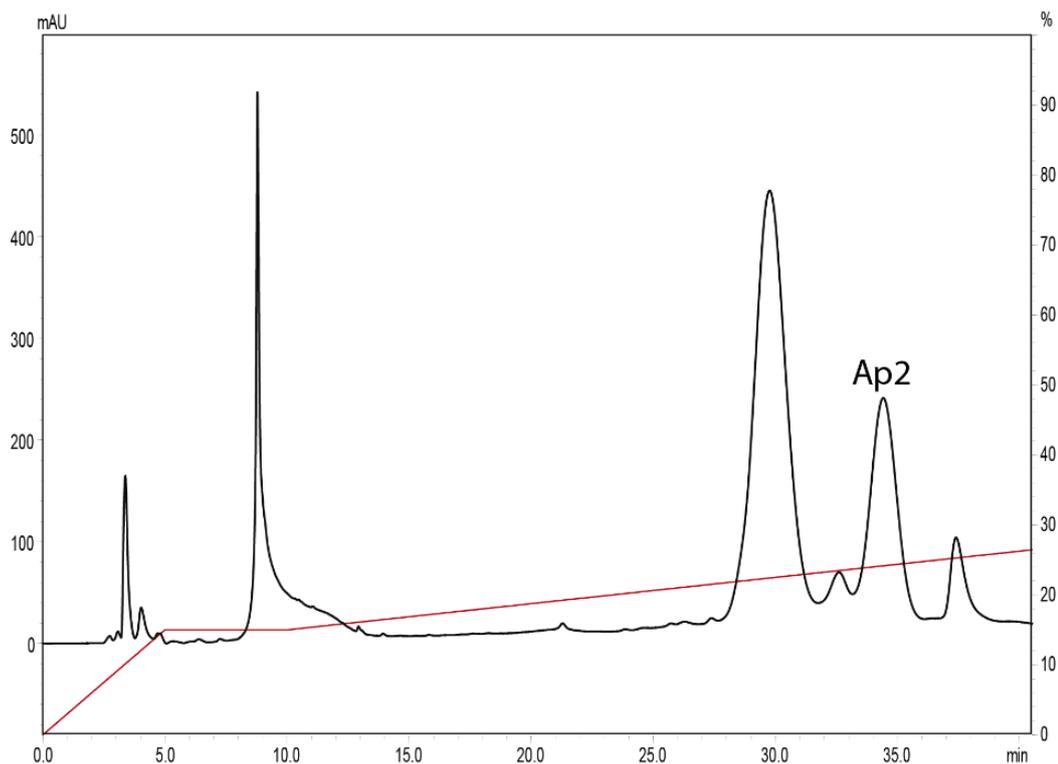


Figura 6 – Cromatograma purificação do peptídeo Ap2. A purificação foi realizada por meio de uma coluna Analítica C18 (phenomenex) com um gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha vermelha , com um fluxo de 1,0 mL/min e absorvância monitorada a 216 nm.

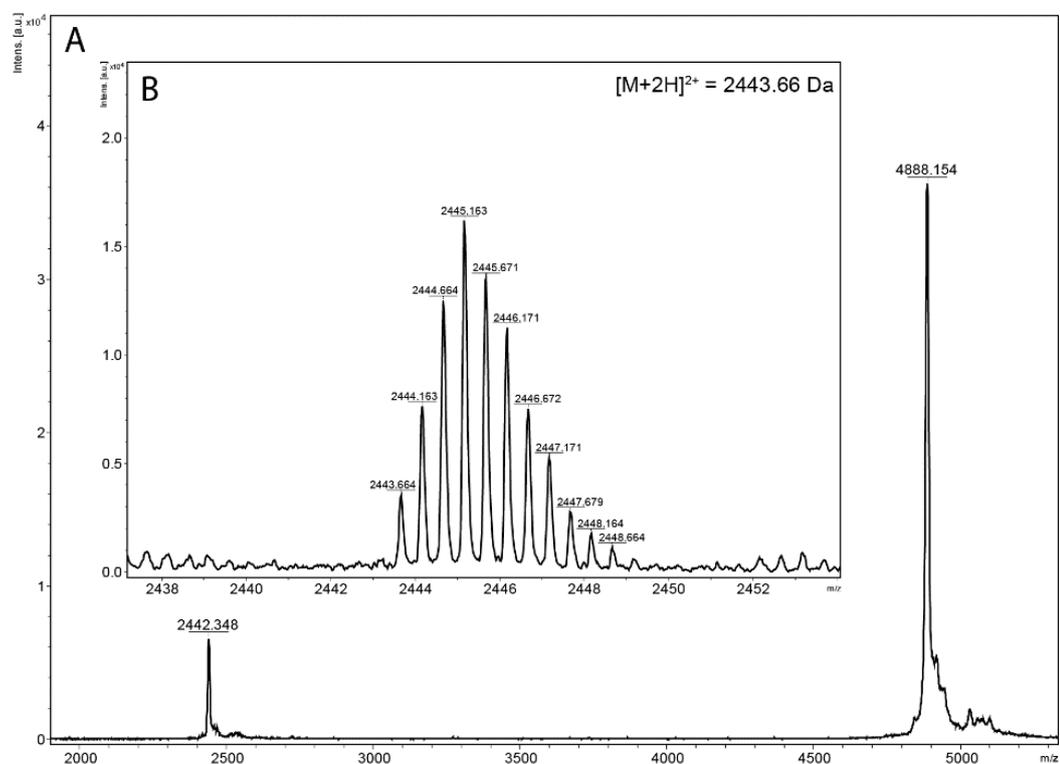


Figura 7 - Espectro de Massas do peptídeo Ap2. A: Massa molecular média $[M+H]^+$ de 4888,1 Da do peptídeo Ap2 utilizando a técnica de espectrometria de massas (MS) no modo linear. B: Massa molecular monoisotópica de $[M+2H]^{2+}$ de 2443,6 Da utilizando a espectrometria de massas no modo refletido, totalizando massa experimental de 4886,3 Da.

O peptídeo Ap3 eluiu aos 30 minutos na recromatografia apresentada na purificação do peptídeo Ap2 (Figura 6) aos 22,62 % de ACN, entretanto não continha o grau de pureza necessário para as etapas subsequentes e foi submetido a mais uma etapa de purificação (Figura 8). A avaliação da pureza do peptídeo foi realizada por MALDI TOF/TOF no modo linear e sua massa molecular monoisotópica experimental inferida de 4883,7 Da (Figura 9). Foi obtido total de 57,6 µg desse peptídeo puro.

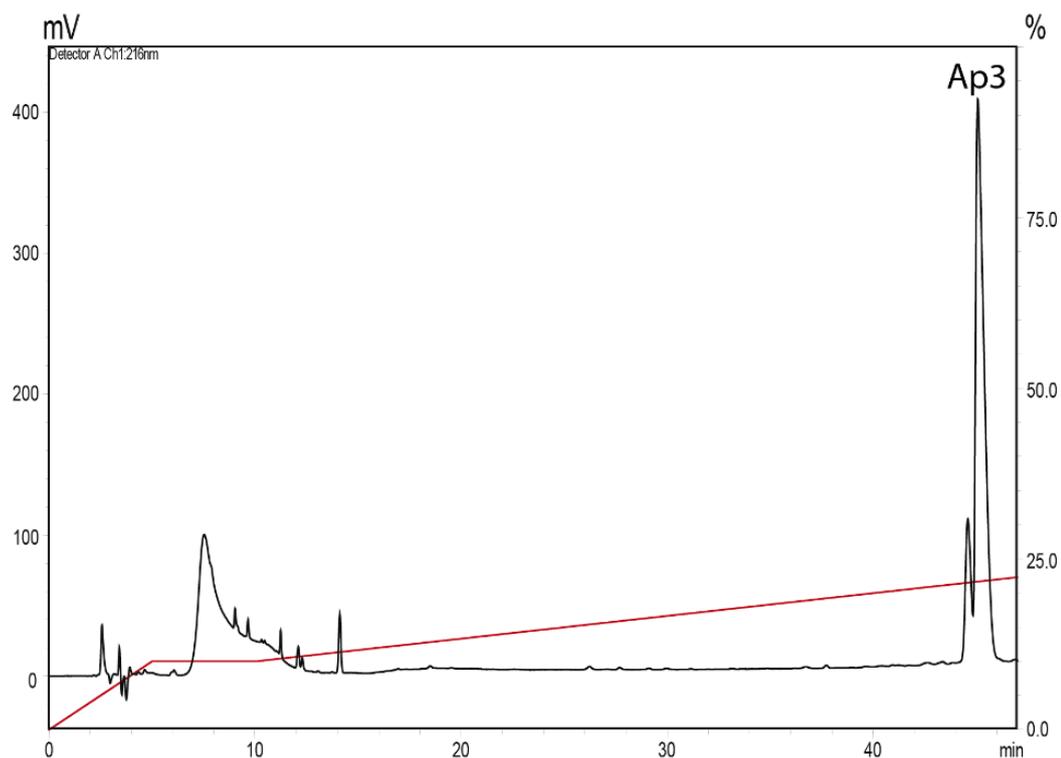


Figura 8 – Cromatograma Purificação do peptídeo Ap3. A purificação foi realizado por meio de coluna Analítica Core Shell F5 (Phenomenex) com gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha vermelha, coluna aquecida a 45° C, fluxo de 1,0 mL/min e absorbância monitorada a 216 nm.

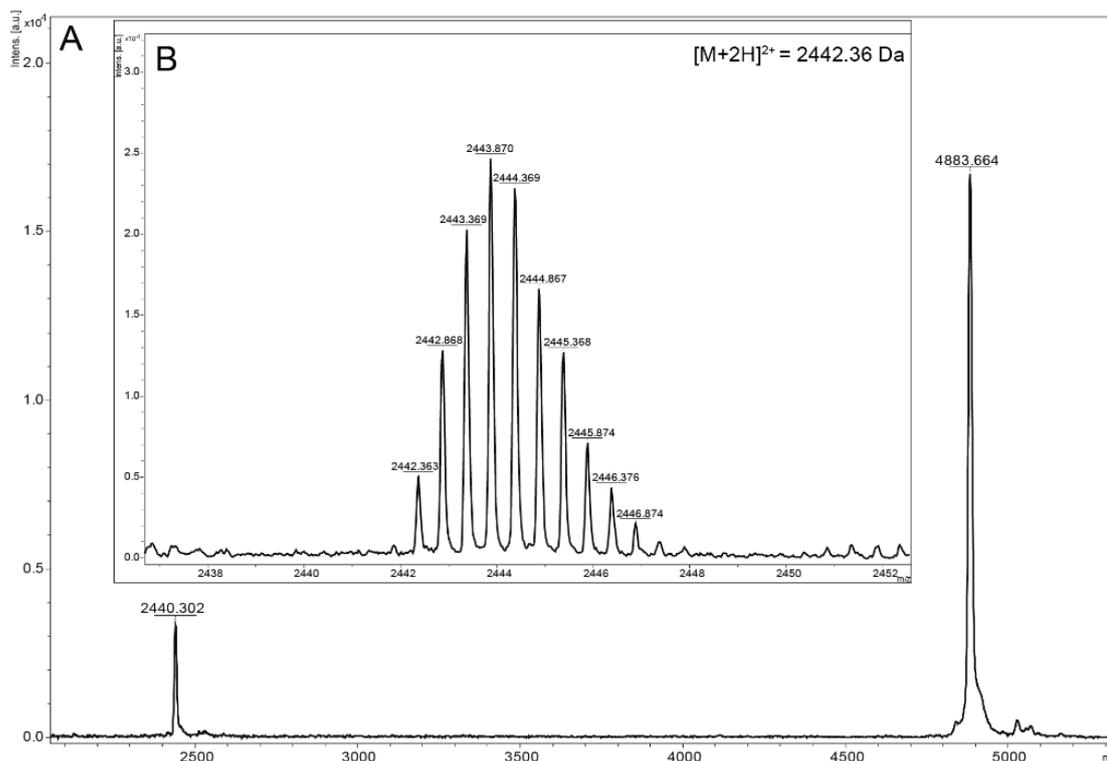


Figura 9 - Espectro de Massas do peptídeo Ap3. A: Massa molecular média $[M+H]^+$ de 4883,66 Da do peptídeo Ap3 utilizando a técnica de espectrometria de massas (MS) no modo linear. **B:** Massa molecular monoisotópica de $[M+2H]^{2+}$ de 2442,36 Da utilizando a espectrometria de massas no modo refletido, totalizando massa experimental de 4883,7 Da.

O peptídeo Ap4, Ap5 e Ap1a eluíram juntos no mesmo processo de cromatografia (Figura 5). Com isso, foi necessária uma etapa adicional de cromatografia utilizando a coluna Core shell F5 para um fracionamento dessa fração com diversos compostos. Essa fração foi subfracionada em 5 subfrações, sendo que na subfração 1 (20,50% ACN) foi encontrado um composto com a massa molecular média de 5478 Da, na subfração 2(20,60% ACN), o composto com massa molecular média de 5443 Da que é, provavelmente, a toxina Ap1b (dados não mostrados), na sub-fração 3 (20,70% ACN) foi encontrado o peptídeo Ap1a , em ambas subfrações 4 e 5 foram encontrados os peptídeos Ap4 e Ap5 (Figura 10).

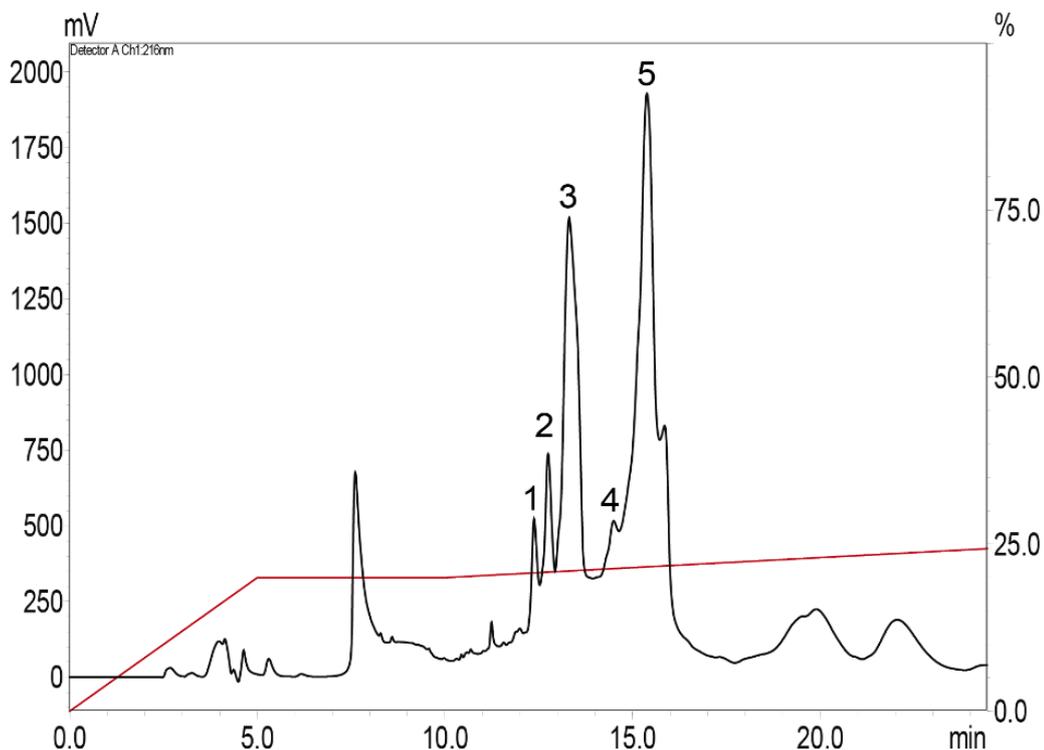


Figura 10 – Cromatograma Sub-fracionamento da fração os peptídeos Ap4 e Ap5. Cromatografia da fração contendo os peptídeos Ap4 e Ap5 utilizando coluna core shell F5 com gradiente de acetonitrila. Os peptídeos Ap4 e Ap5 estão presentes em ambas sub-frações 4 e 5.

As subfrações 4 e 5 foram reunidas e submetidas a cromatografia de fase reversa com a coluna Core shell F5, com as soluções contendo 1% de TFA e a 4° C utilizando-se um banho resfriado. O peptídeo Ap4 eluiu aos 52,6 minutos com 25,33 % de acetonitrila (Figura 11). A avaliação da pureza do peptídeo foi realizada por MALDI TOF/TOF no modo linear e sua massa molecular monoisotópica experimental de 3870,7 Da (Figura 12). Foi obtido um total de 29,36 µg desse peptídeo puro.

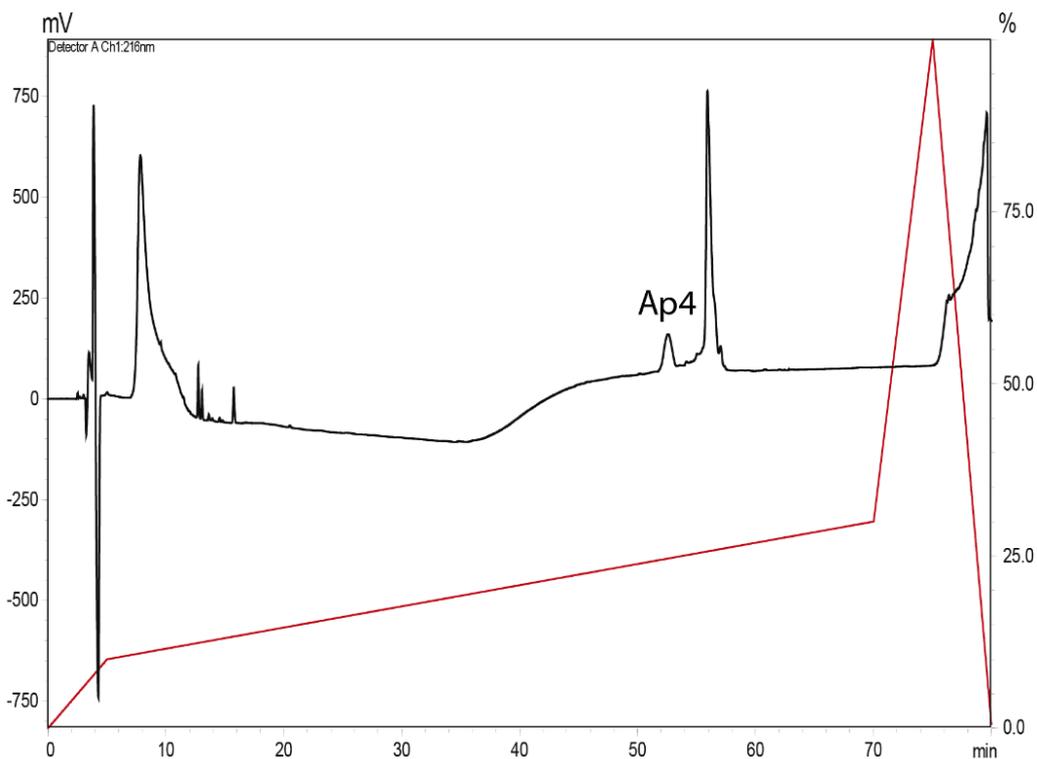


Figura 11 – Cromatograma Purificação do peptídeo Ap4. O fracionamento foi realizado por meio de coluna Analítica Core Shell F5 (Phenomenex) com gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha vermelha com 1 % de TFA(v/v), fase móvel resfriada a 4° C, fluxo de 1,0 ml/min e absorvância monitorada a 216 nm.

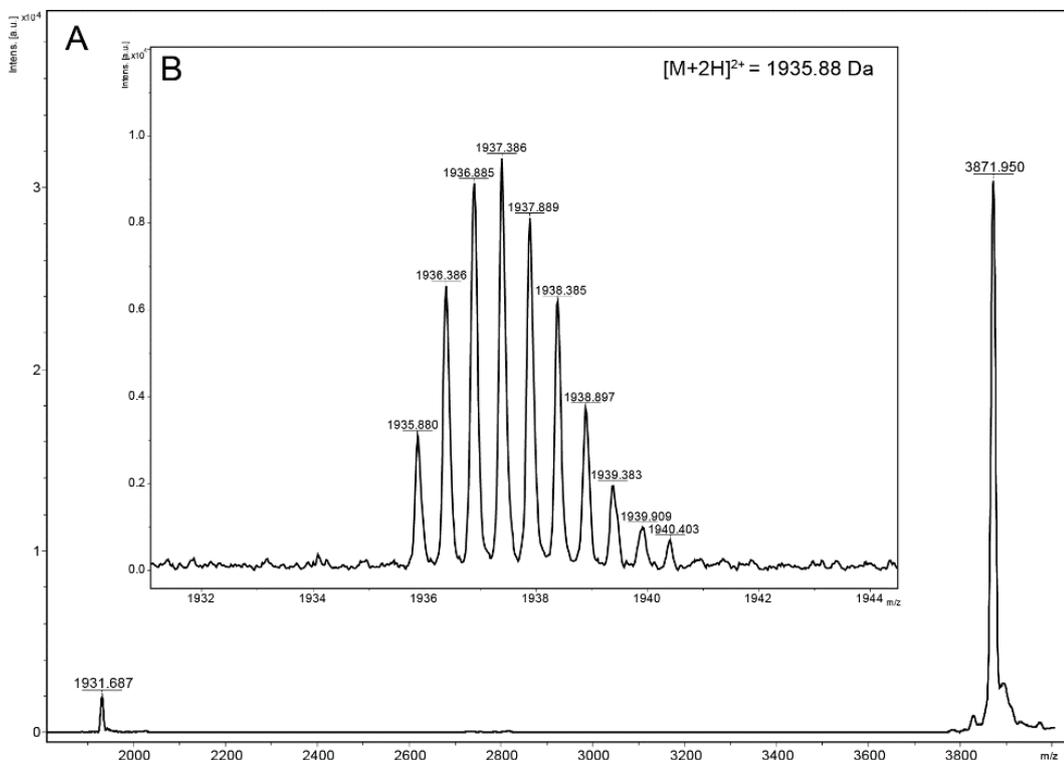


Figura 12 - Espectro de Massas do peptídeo Ap4. A: Massa molecular média $[M+H]^+$ de 3871,95 Da do peptídeo Ap4 utilizando a técnica de espectrometria de massas (MS) no modo linear. B: Massa molecular monoisotópica de $[M+2H]^{2+}$ de 1935,88 Da utilizando a espectrometria de massas no modo refletido, totalizando massa experimental de 3870,76 Da.

O peptídeo Ap5 eluiu na cromatografia de purificação da Ap4 aos 56,7 minutos com 26,64 % de acetonitrila (Figura 11); entretanto, por não possuir o grau de pureza necessário, foi submetido a mais uma etapa de cromatografia (Figura 13), eluindo aos 41,3 minutos, com 25,11 % de acetonitrila. A avaliação da pureza do peptídeo foi realizada por MALDI TOF/TOF no modo linear e sua massa molecular monoisotópica experimental de 5454,9 Da (Figura 14). Foi obtido total de 36,12 μg desse peptídeo puro.

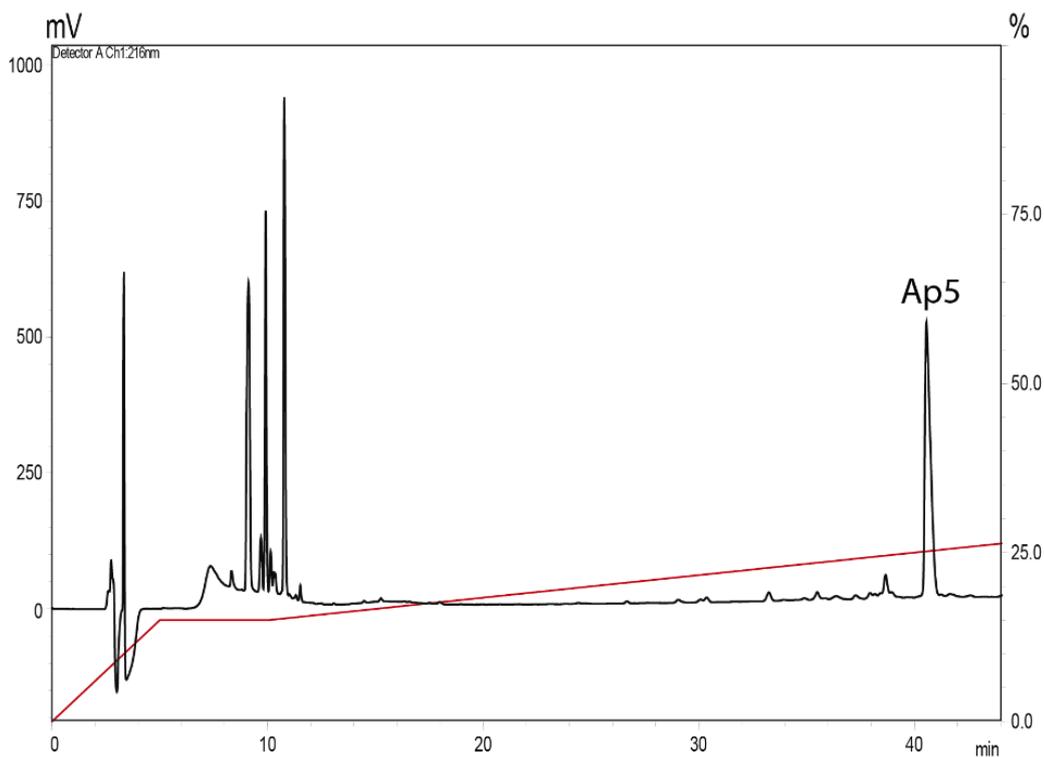


Figura 13 – Cromatograma Purificação do peptídeo Ap5. O fracionamento foi realizado por meio de coluna Analítica Core Shell F5 (Phenomenex) com gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha vermelha com 0,1% de TFA(v/v), a coluna foi aquecida a 45° C, fluxo de 1,0 ml/min e absorvância monitorada a 216 nm.

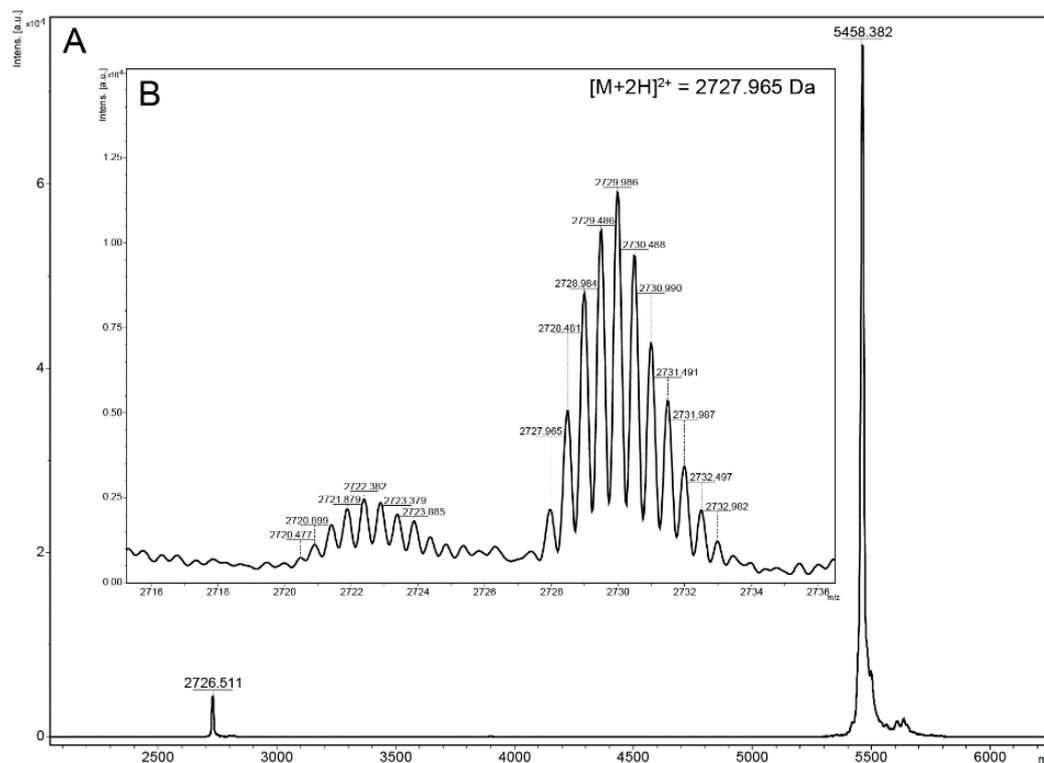


Figura 14 - Espectro de massas do peptídeo Ap5. **A:** Massa molecular média $[M+H]^+$ de 5458,3 Da do peptídeo Ap5 utilizando a técnica de espectrometria de massa (MS) no modo linear. **B:** Massa molecular monoisotópica de $[M+2H]^{2+}$ de 2727,96 Da utilizando a espectrometria de massa no modo refletido, totalizando uma massa experimental de 5454,9 Da.

O peptídeo Ap6 foi submetido a apenas uma etapa de purificação adicional após fracionamento da peçonha bruta (Figura 15) e eluiu 16,8 minutos com 23,14 % de acetonitrila. A avaliação da pureza do peptídeo foi realizada por MALDI TOF/TOF no modo linear e sua massa molecular monoisotópica experimental de 3717,9 Da. Foi obtido total de 51,79 μg desse peptídeo puro.

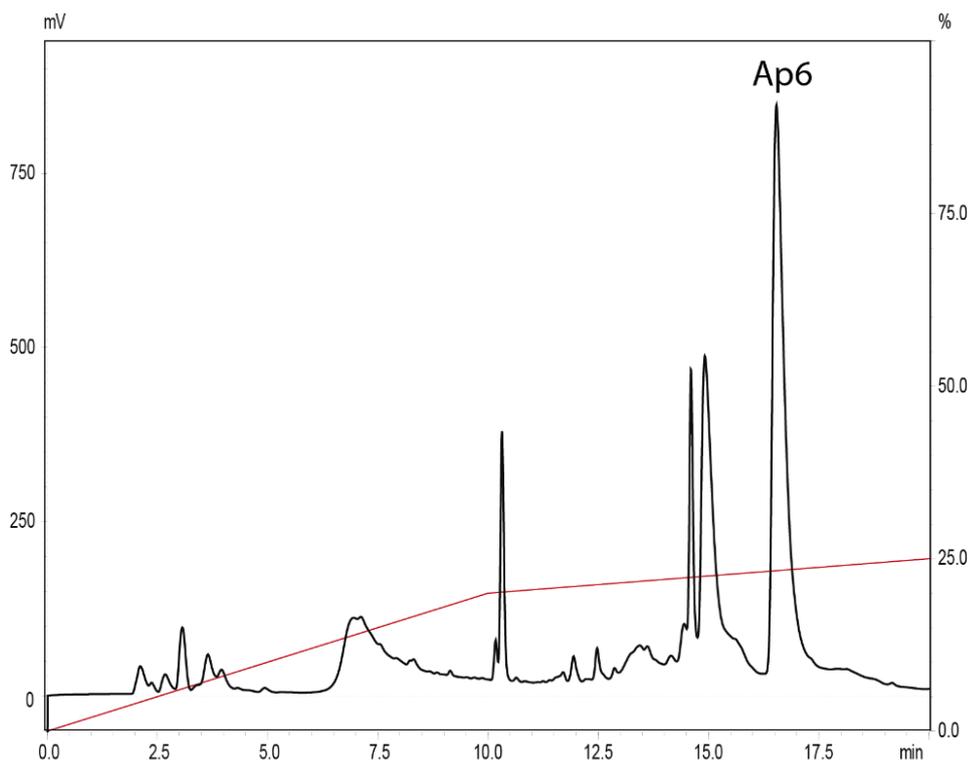


Figura 15 – Cromatograma Purificação do peptídeo Ap6. O fracionamento foi realizado por meio de coluna Analítica C18 (Phenomenex) com gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha vermelha com 0,1% de TFA (v/v).

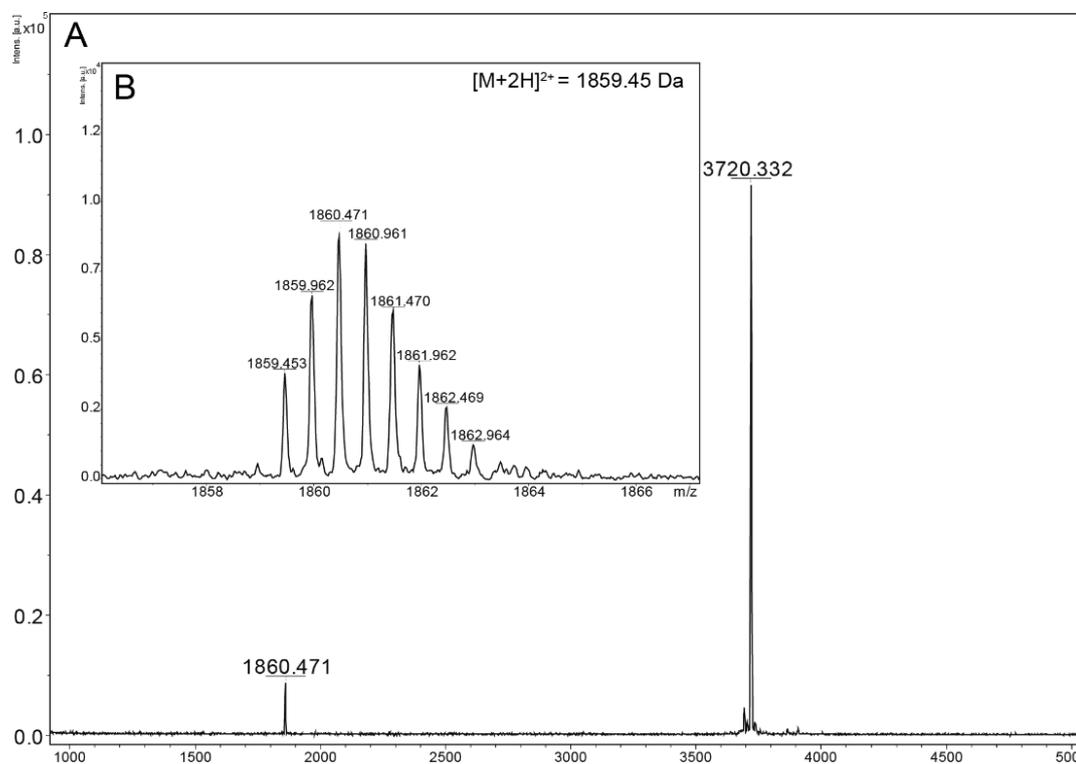


Figura 16 - Espectro de massas do peptídeo Ap6. **A:** Massa molecular média $[M+H]^+$ de 3720,33 Da do peptídeo Ap6 utilizando a técnica de espectrometria de massas (MS) no modo linear. **B:** Massa molecular monoisotópica de $[M+2H]^{2+}$ de 1859,45 Da utilizando a espectrometria de massas no modo refletido, totalizando massa experimental de 3717,9 Da.

5.2 Sequenciamentos

Os peptídeos Ap2, Ap3, Ap4, Ap5, Ap6, após purificados, foram parcialmente sequenciados utilizando a espectrometria de massas no equipamento Maldi TOF TOF Ultraflex III no método de *In-source decay* (Figuras 17-21) e as sequências parciais que foram posteriormente completadas com a análise do transcrito da glândula de peçonha de *A. paulensis*. (Figura 22).

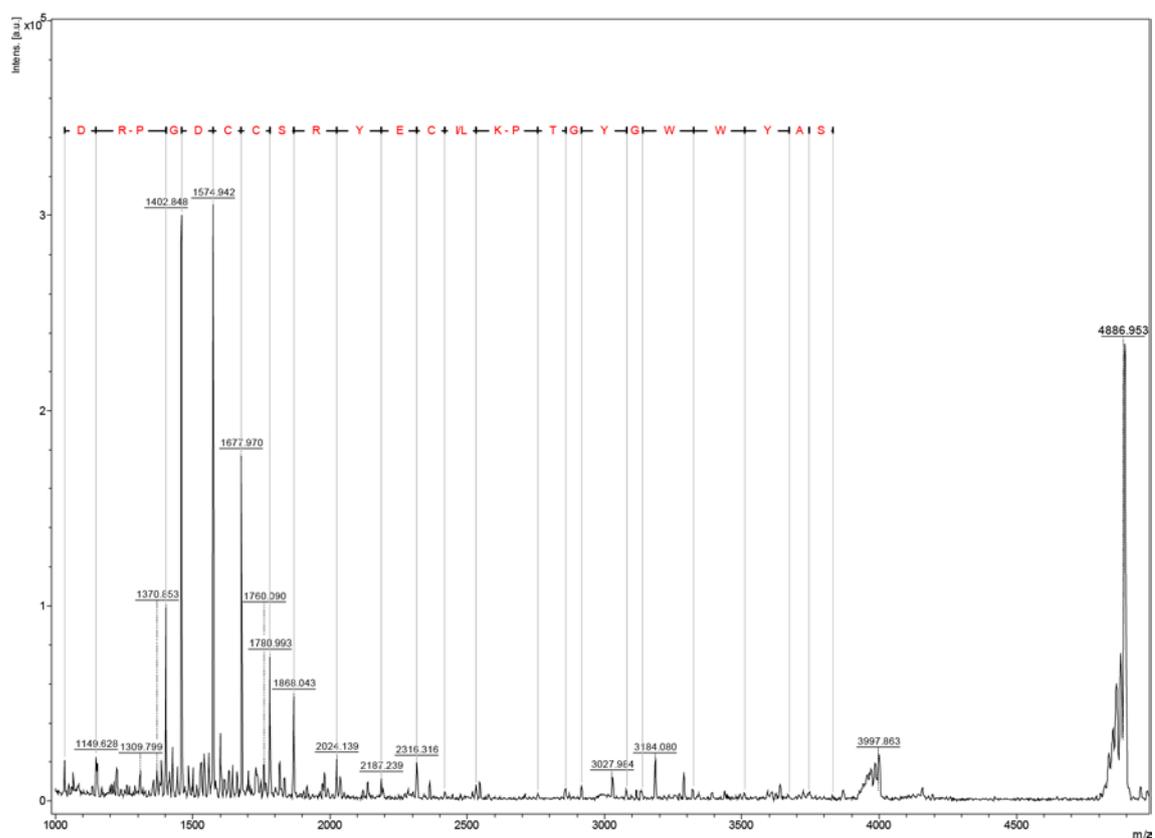


Figura 17 - Sequência parcial do peptídeo Ap2 obtida por meio da técnica de espectrometria de massas (MS) pelo método de *In-Source Decay* (ISD). Foram obtidos 24 aminoácidos pela diferença de massa entre os fragmentos.

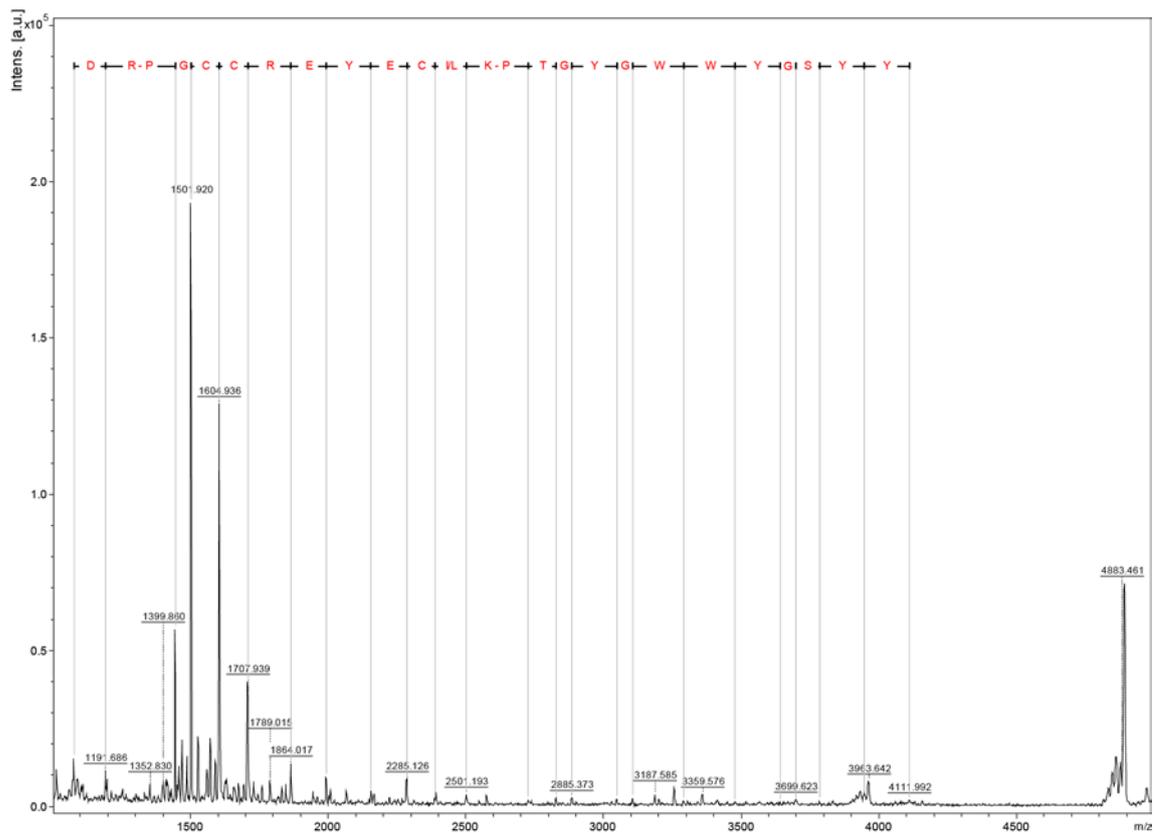


Figura 18 - Sequência parcial do peptídeo Ap3 obtida por meio da técnica de espectrometria de massas (MS) pelo método de *In-Source Decay* (ISD). Foram obtidos 25 aminoácidos pela diferença de massa entre os fragmentos.

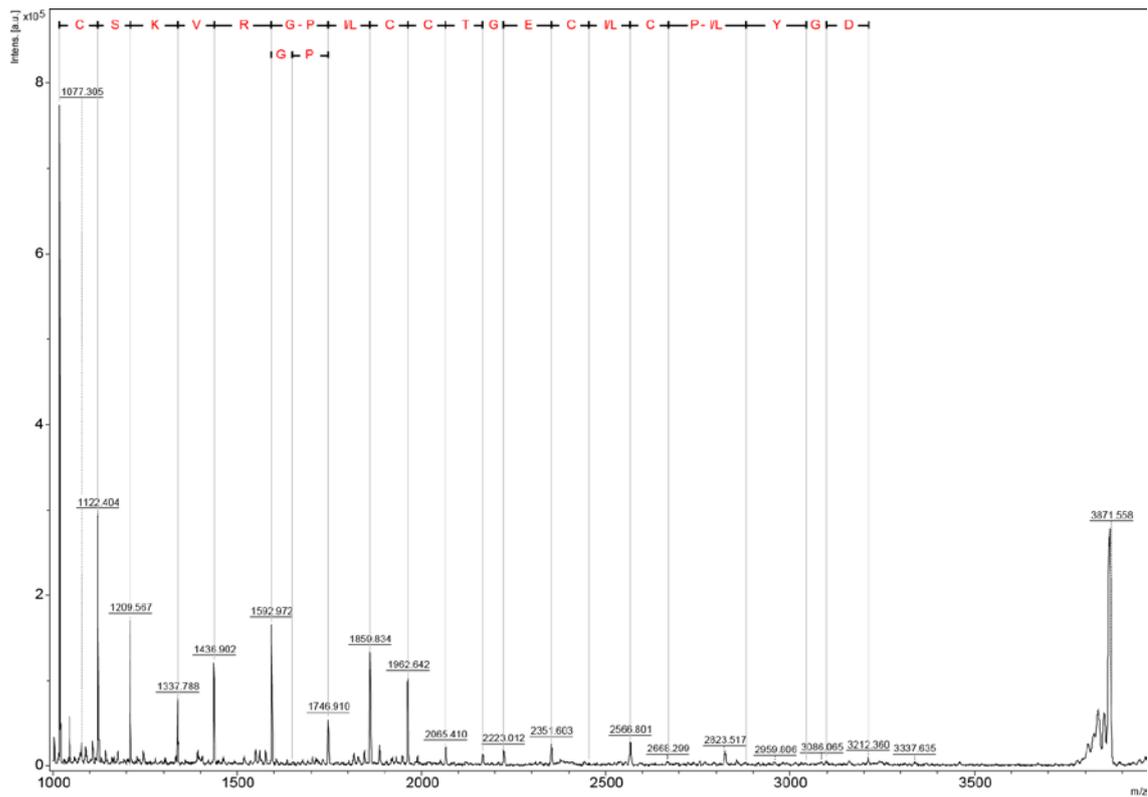


Figura 19 - Sequência parcial do peptídeo Ap4 obtida por meio da técnica de espectrometria de massas (MS) pelo método de *In-Source Decay* (ISD). Foram obtidos 21 aminoácidos pela diferença de massa entre os fragmentos.

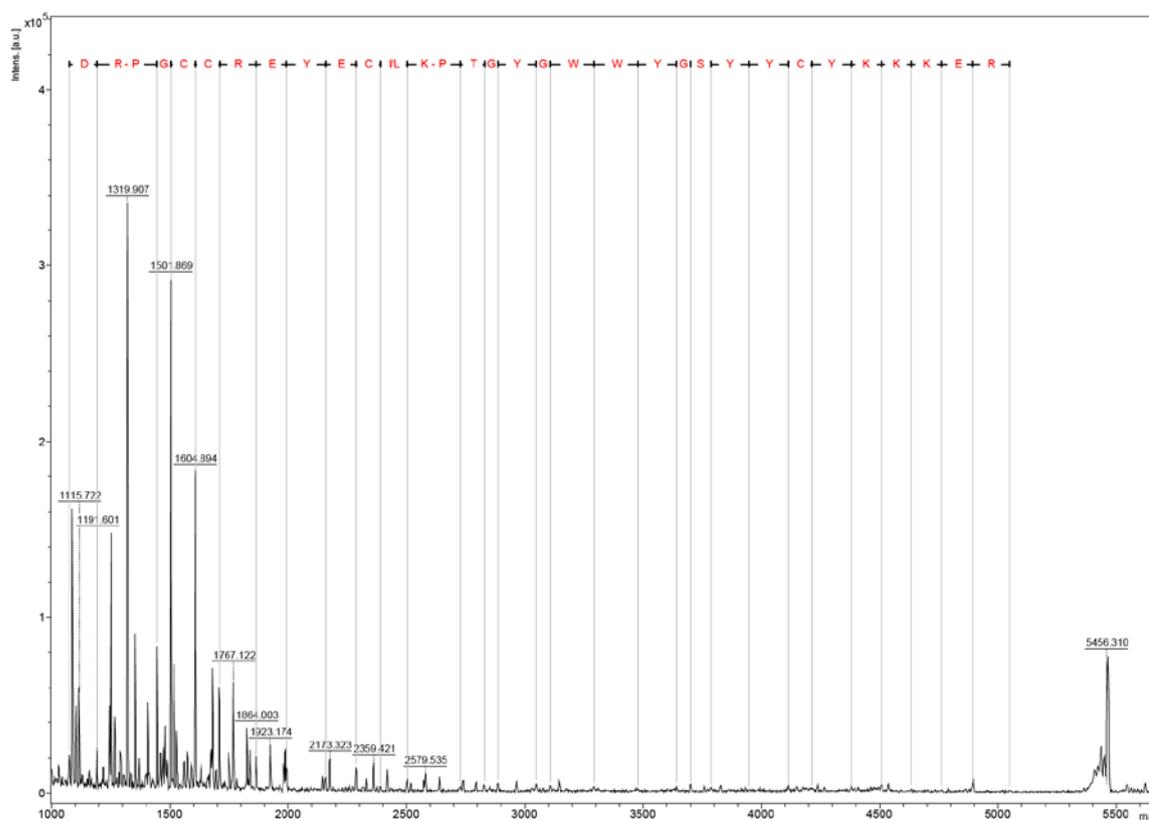


Figura 20 - Sequência parcial do peptídeo Ap5 obtida por meio da técnica de espectrometria de massas (MS) pelo método de *In-Source Decay* (ISD). Foram obtidos 32 aminoácidos pela diferença de massa entre os fragmentos.

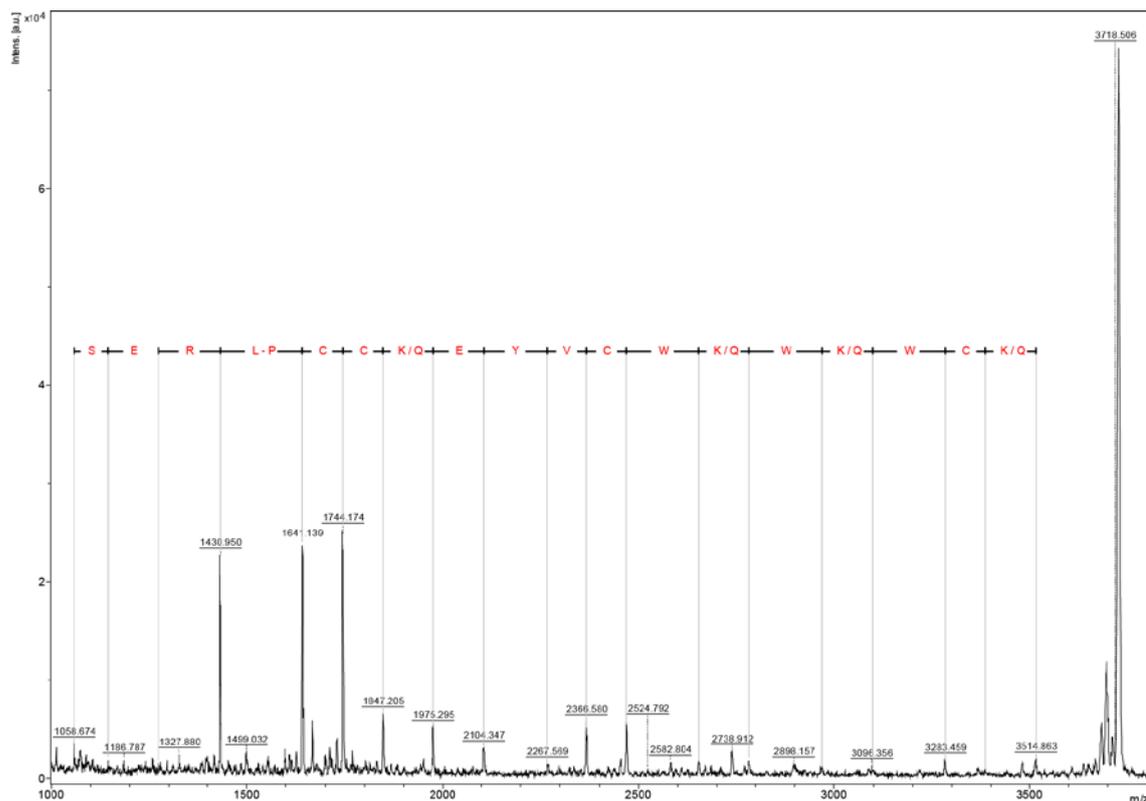


Figura 21 - Sequência parcial do peptídeo Ap6 obtida por meio da técnica de espectrometria de massas (MS) pelo método de *In-Source Decay* (ISD). Foram obtidos 19 aminoácidos pela diferença de massa entre os fragmentos.

Toxina		n.º AA
Ap6	ACGNFMWKC SE--RLPCCQEYVCS P-- QWKWC NP-----	31
Ap4	FCVHERET CSKVRGPLCCT-GE CICP----- IYGDCFCYGS -----	35
Ap2	-CAGENVPCDK DRPGDCCSRYECLKPTGYGWWYASYYCYKKKS -----	42
Ap3	-CAENVPCDK DRPG-CCREYECLKPTGYGWWYGSYYCYKKKE -----	41
Ap5	-CAENVPCDK DRPG-CCREYECLKPTGYGWWYGSYYCYKKKERLIST	46
	* * . . ** *	

Figura 22 - Alinhamento múltiplo das sequências completas obtidas dos peptídeos purificados. Regiões nas sequências em vermelho foram obtidas por sequenciamento ISD e completadas pela comparação com as sequências em biblioteca de cDNA.

Durante o processo de purificação do peptídeo Ap4 (3870,9 Da) foi encontrado um composto com 27 Da a mais que a massa molecular do peptídeo Ap4, uma massa monoisotópica de 3897,9 Da. Tal informação corrobora com as informações encontradas no transcrito da glândula de peçonha de *A. paulensis* sobre a existência de uma sequência similar à do peptídeo Ap4 com apenas uma substituição no último resíduo de aminoácido serina (massa molecular de 105,09 Da) para uma asparagina (massa molecular de 132,1 Da) (Figuras 23 e 24). Não foi possível purificar o peptídeo de 3897,9 Da devido à baixa quantidade de material disponível, mas foi intitulada como Ap4b por sua similaridade com a toxina Ap4.

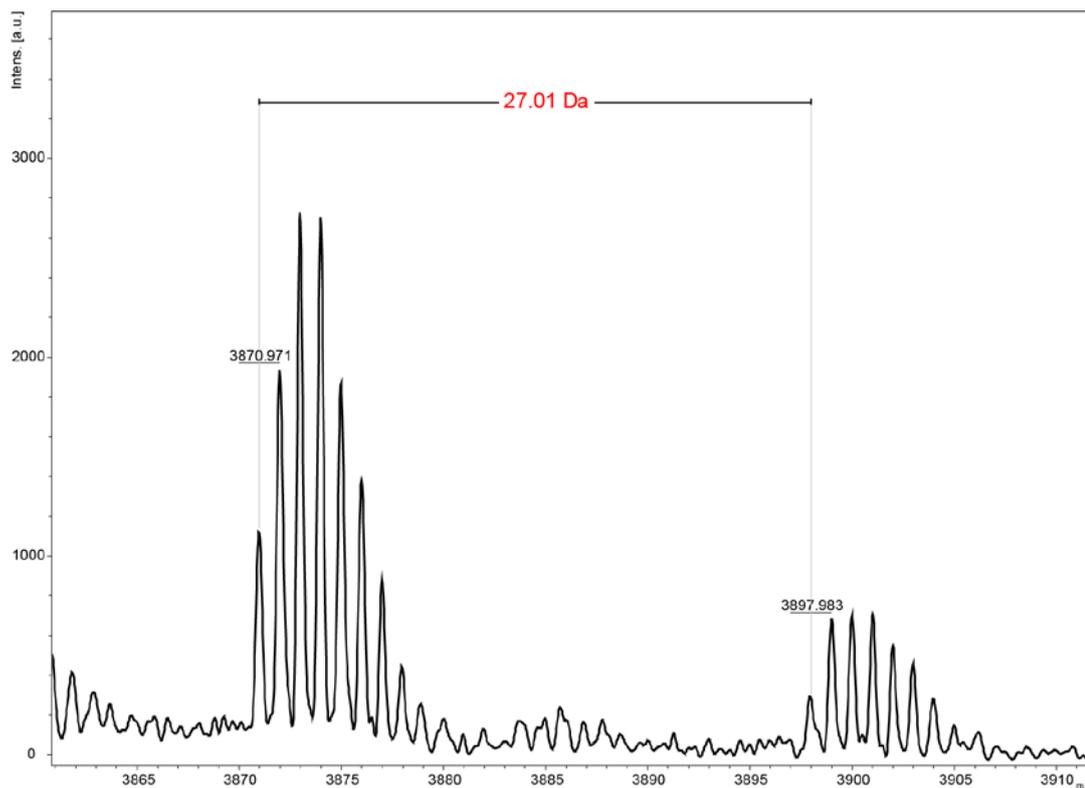


Figura 23 - Espectro de massas da fração contendo Ap4 e Ap4b. Espectrometria de massas dos peptídeos Ap4 e Ap4b apresentando a diferença de 27,01 Da entre as massas monoisotópicas.

Toxina		n.º AA
Ap4	FCVHERETCSKVRGPLCCTGECICPIYGDCFCYGS	35
Ap4b	FCVHERETCSKVRGPLCCTGECICPIYGDCFCYGN	35

Figura 24 - Alinhamento dos peptídeos Ap4 e Ap4b. Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) semi-conservativas. A direita o número de aminoácidos e porcentagem de identidade.

5.3 Eletrofisiologia em canais de sódio dependentes de voltagem

Os peptídeos Ap2 (Figura 25 e 26), Ap3 (Figura 27 e 28), Ap4 (Figura 29 e 30) e Ap5 (Figura 31 e 32) foram submetidos a ensaios eletrofisiológicos nos canais $Na_V1.1$, $Na_V1.5$ e $Na_V1.7$ para a avaliação da capacidade de alterar a amplitude da corrente pelo parâmetro de porcentagem de inibição, a probabilidade de abertura durante a ativação ($\Delta_{1/2ativação}$) e a probabilidade de abertura durante a inativação ($\Delta_{1/2inativação}$).

O peptídeo Ap2 não apresentou atividade nos canais de sódio dependentes de voltagem na concentração de $1 \mu M$, sem efeito sobre as cinéticas de ativação, inativação e ausência de inibição das correntes dos canais $Na_V1.1$, $Na_V1.5$ e $Na_V1.7$ (Figuras 25 e 26) (Tabela 4)

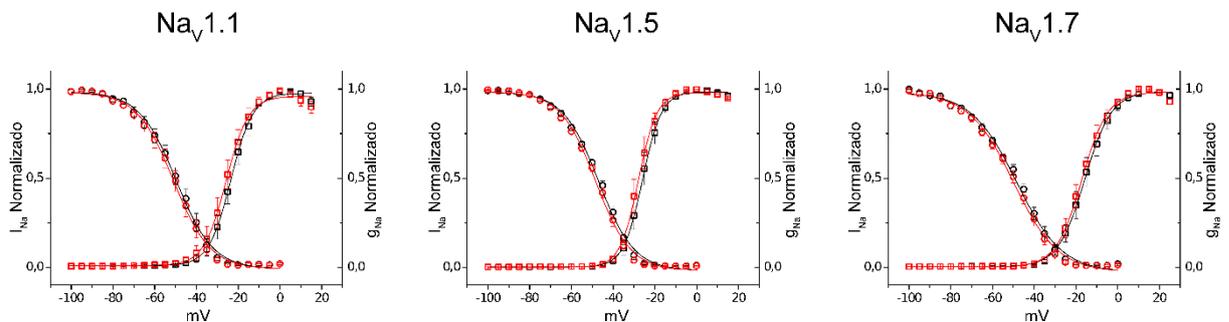


Figura 25 - Probabilidade de abertura em canais Na_V na presença da Ap2 $1 \mu M$. Quadrados pretos representam a condutância controle e quadrados vermelhos representam a condutância na presença da toxina. Linhas representam o ajuste dos valores na equação de Boltzmann, linhas pretas para controle e linhas vermelhas para a condição com a presença da toxina.

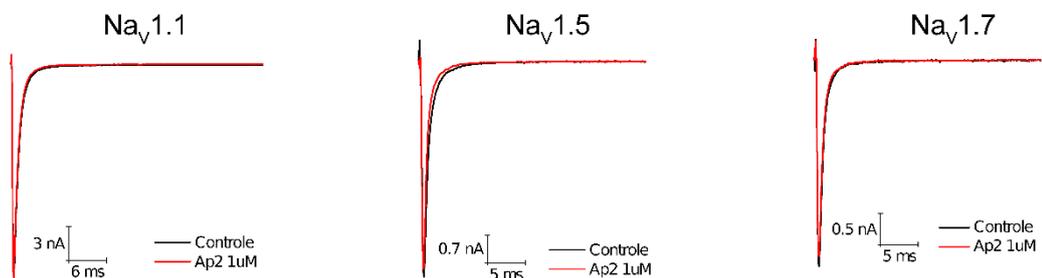


Figura 26 - Traços de registros obtidos nos Canais Na_V na presença do peptídeo Ap2 $1 \mu M$. Traços em preto representam os traços controle na voltagem em que a corrente de maior amplitude é estimulada e traços em vermelho representam a condição na presença da toxina.

A toxina Ap3 na concentração de $1\mu\text{M}$ inibiu as correntes em $6,67\pm 1,91\%$, $4,20\pm 1,09\%$ e $12,05\pm 5,14\%$ nos canais $\text{Nav}1.1$, $\text{Nav}1.5$ e $\text{Nav}1.7$ respectivamente. Os valores de $\Delta V_{1/2}$ da ativação foram de $4,80\pm 0,53\text{ mV}$, $5,04\pm 0,82\text{ mV}$ e $8,49\pm 2,42\text{ mV}$ para os canais $\text{Nav}1.1$, $\text{Nav}1.5$ e $\text{Nav}1.7$ respectivamente. Os valores de $\Delta V_{1/2}$ da inativação foram de $3,81\pm 0,32\text{ mV}$, $3,41\pm 0,73\text{ mV}$ e $8,49\pm 2,42\text{ mV}$ para os canais $\text{Nav}1.1$, $\text{Nav}1.5$ e $\text{Nav}1.7$ respectivamente (Figuras 27 e 28). Todos os valores citados para a toxina Ap3 são estatisticamente significantes ($P < 0.05$). (Tabela 4)

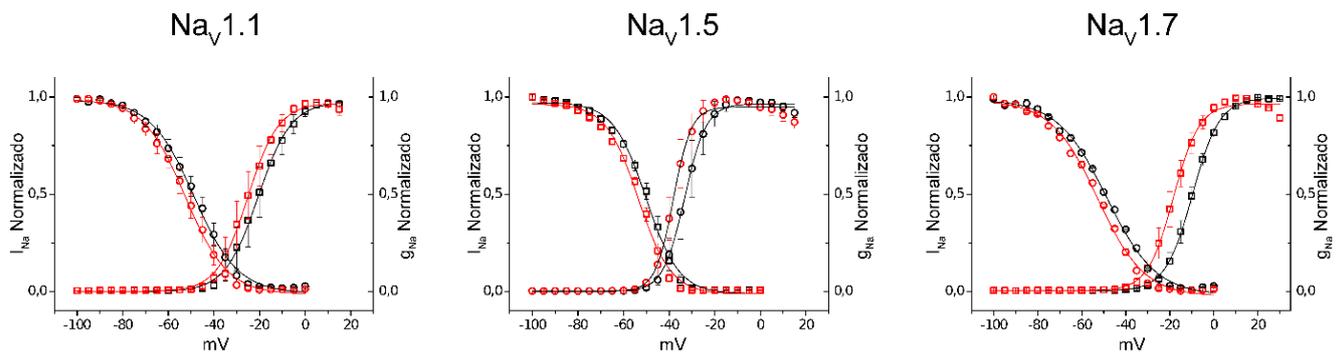


Figura 27 - Probabilidade de abertura em canais Nav na presença da Ap3 $1\mu\text{M}$. Quadrados pretos representam a condutância controle e quadrados vermelhos representam a condutância na presença da toxina. Linhas representam o ajuste dos valores na equação de Boltzmann, linhas pretas para controle e linhas vermelhas para a condição com a presença da toxina.

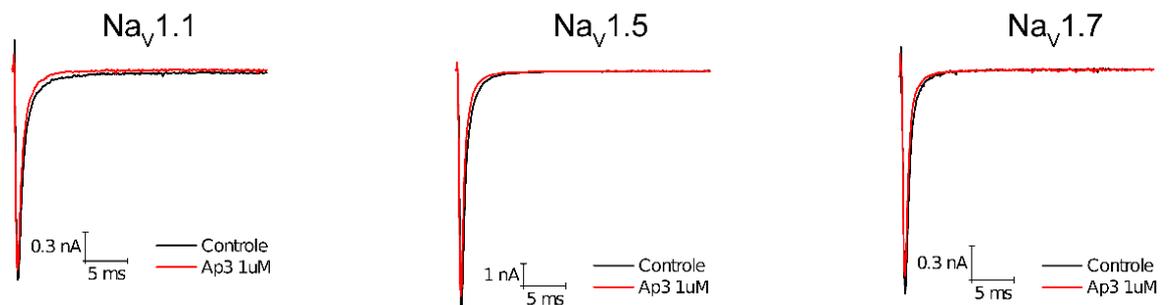


Figura 28 - Traços de registro obtidos nos Canais Nav na presença da Ap3 $1\mu\text{M}$. Traços em preto representam os traços controle na voltagem em que a corrente de maior amplitude é estimulada e traços em vermelho representam a condição na presença da toxina.

O peptídeo Ap4 não apresentou atividade nos canais de sódio dependentes de voltagem na concentração de 1 μM , sem efeito sobre as cinéticas de ativação, inativação e ausência de inibição das correntes dos canais $\text{Na}_V1.1$, $\text{Na}_V1.5$ e $\text{Na}_V1.7$ (Figuras 29 e 30)(Tabela 4)

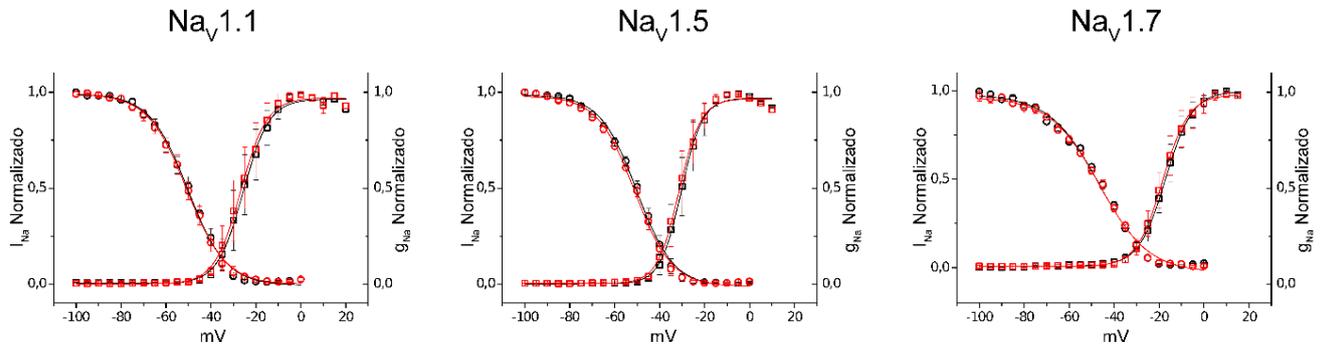


Figura 29 - Probabilidade de abertura em canais Na_V na presença da Ap4 1 μM . Quadrados pretos representam a condutância controle e quadrados vermelhos representam a condutância na presença da toxina. Linhas representam o ajuste dos valores na equação de Boltzmann, linhas pretas para controle e linhas vermelhas para a condição com a presença da toxina.

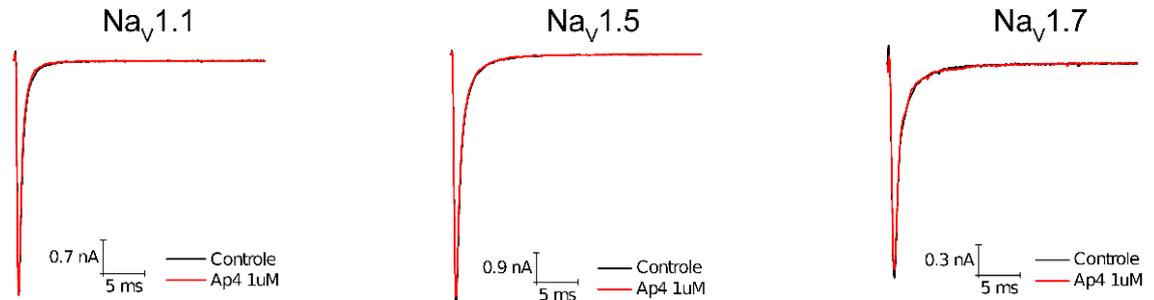


Figura 30 - Traços de registros obtidos em Canais Na_V na presença da Ap4 1 μM . Traços em preto representam os traços controle na voltagem em que a corrente de maior amplitude é estimulada e traços em vermelho representam a condição na presença da toxina.

O peptídeo Ap5 não apresentou atividade nos canais de sódio dependentes de voltagem na concentração de $1\mu\text{M}$, sem efeito sobre as cinéticas de ativação, inativação e ausência de inibição das correntes dos canais $\text{Na}_V1.1$, $\text{Na}_V1.5$ e $\text{Na}_V1.7$ (Figuras 31 e 32) (Tabela 4)

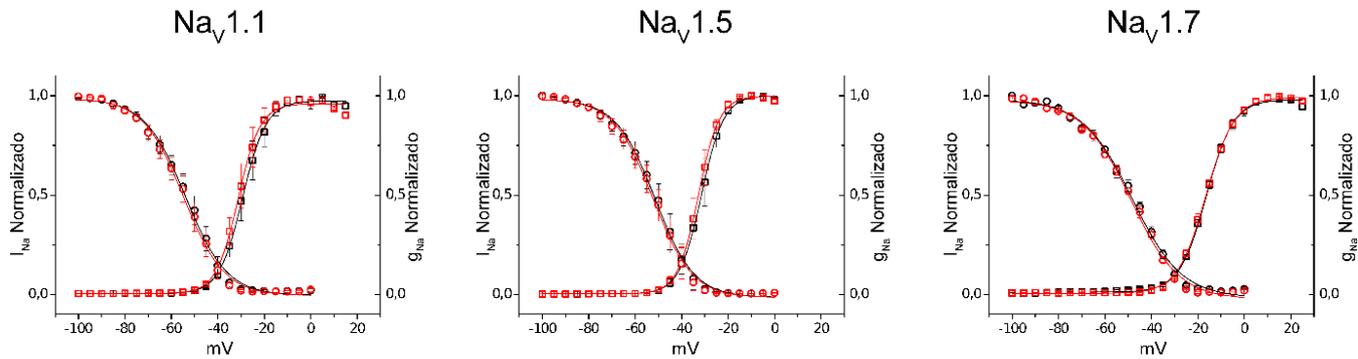


Figura 31 - Probabilidade de abertura em canais Na_V na presença de Ap5 $1\mu\text{M}$. Quadrados pretos representam a condutância controle e quadrados vermelhos representam a condutância na presença da toxina. Linhas representam o ajuste dos valores na equação de Boltzmann, linhas pretas para controle e linhas vermelhas para a condição com a presença da toxina.

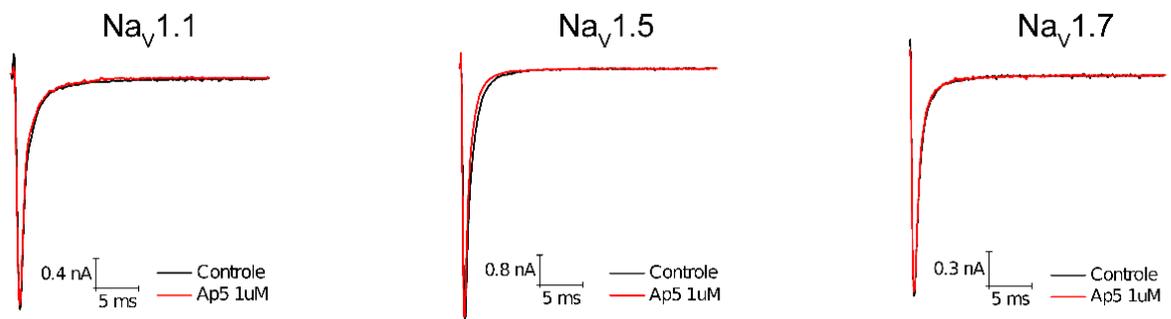


Figura 32 - Traços de registros obtidos em Canais Na_V na presença de Ap5 $1\mu\text{M}$. Traços em preto representam os traços controle na voltagem em que a corrente de maior amplitude é estimulada e traços em vermelho representam a condição na presença da toxina.

O peptídeo Ap6 não apresentou atividade nos canais de sódio dependentes de voltagem na concentração de 1 μM , sem efeito sobre as cinéticas de ativação, inativação e ausência de inibição das correntes dos canais $\text{Na}_V1.1$, $\text{Na}_V1.5$ e $\text{Na}_V1.7$ (Figuras 33 e 34) (Tabela 4)

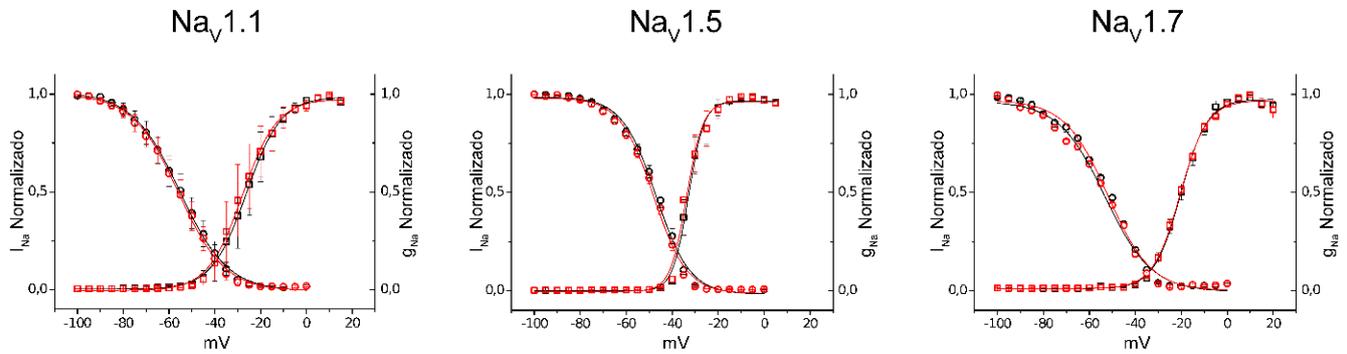


Figura 33 - Probabilidade de abertura em canais Na_V na presença de Ap6 1 μM . Quadrados pretos representam a condutância controle e quadrados vermelhos representam a condutância na presença da toxina. Linhas representam o ajuste dos valores na equação de Boltzmann, linhas pretas para controle e linhas vermelhas para a condição com a presença da toxina.

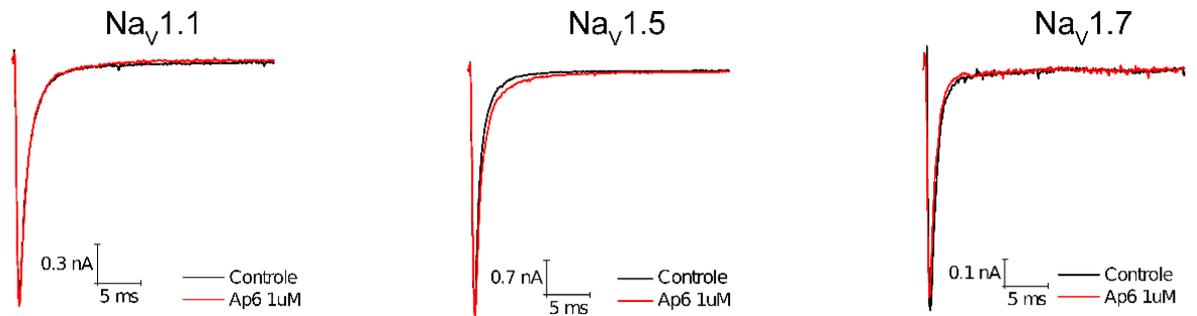


Figura 34 - Traços de registros obtidos em Canais Na_V na presença de Ap6. Traços em preto representam os traços controle na voltagem em que a corrente de maior amplitude é estimulada e traços em vermelho representam a condição na presença da toxina.

Tabela 4 Valores das médias de $\Delta V_{1/2}$ e F_u obtidos para os canais de sódio na presença dos peptídeos de aranha. Dados obtidos pelo ajuste na equação de Boltzmann ($\Delta V_{1/2}$), cálculo da fração de fração não inibida (F_u) e número de observações (n). Valores de média e erro padrão. Valores com (*) são estatisticamente significantes.

Ap2 1uM	$\Delta V_{1/2}$ativação (mV)	$\Delta V_{1/2}$inativação (mV)	Inib(%)	n
	Média	Média	Média	
hNav1.1	1,99 \pm 0,58	1,19 \pm 0,38	2,04 \pm 1,89	5
hNav1.5	2,35 \pm 0,39	1,44 \pm 0,22	+1,94 \pm 3,59	5
hNav1.7	1,31 \pm 0,24	1,59 \pm 0,29	1,52 \pm 2,64	4
Ap3 1uM				
	Média	Média	Média	
hNav1.1	4,80 \pm 0,53 *	3,81 \pm 0,32*	6,67 \pm 1,91*	5
hNav1.5	5,04 \pm 0,82*	3,41 \pm 0,73*	4,20 \pm 1,09*	5
hNav1.7	8,49 \pm 2,42*	4,05 \pm 0,61*	12,05 \pm 5,14*	4
Ap4 1uM				
	Média	Média	Média	
hNav1.1	1,13 \pm 0,75	0,56 \pm 0,11	+1,27 \pm 0,52	4
hNav1.5	0,98 \pm 0,19	0,90 \pm 0,14	3,26 \pm 1,96	5
hNav1.7	0,71 \pm 0,86	0,43 \pm 0,99	0,83 \pm 5,05	4
Ap5 1uM				
	Média	Média	Média	
hNav1.1	1,83 \pm 0,47	0,87 \pm 0,13	0,005 \pm 1,8	3
hNav1.5	1,27 \pm 0,41	0,88 \pm 0,18	0,07 \pm 1,09	4
hNav1.7	0,24 \pm 0,23	0,54 \pm 0,20	1,74 \pm 0,59	4
Ap6 1uM				
	Média	Média	Média	
hNav1.1	1,001 \pm 1,02	0,70 \pm 0,37	2,35 \pm 2,16	5
hNav1.5	0,54 \pm 0,13	1,11 \pm 1,19	0,33 \pm 1,48	4
hNav1.7	0,31 \pm 0,81	1,23 \pm 0,71	6,45 \pm 3,33	4

5.4 Eletrofisiologia em canais de cálcio dependentes de voltagem

Os peptídeos Ap2 (Figura 35), Ap3 (Figura 36), Ap4 (Figura 37), Ap5 (Figura 38) e Ap6 (Figura 39) foram submetidos a ensaios eletrofisiológicos nos canais $Ca_v1.2$, $Ca_v2.1$ e $Ca_v2.2$ para avaliar a capacidade de alterar a amplitude das correntes por meio do cálculo da porcentagem de inibição.

Devido à condição de *Rundown* que os canais de cálcio dependentes de voltagem sofrem, as correntes controles foram estipuladas por uma função de diminuição de corrente linear, conforme descrito no item 4.11.2, sendo a corrente controle intitulada $I_{Pred,Controle}$. As correntes são apresentadas como de I_{Ba} por escolha de usar o íon Ba^{2+} como carreador da corrente no canal de cálcio, tal escolha se deve ao fato que o íon Ba^{2+} permite maior condutância por canal unitário em comparação ao íon Ca^{2+} (Hess et al., 1986).

A toxina Ap2 na concentração de 1 μM inibiu em $31,17 \pm 7,96 \%$ ($n=5$) a corrente do canal $\text{Ca}_v2.1$ sem efeito nos outros canais de cálcio testados (Figura 35) (Tabela 5). Resultado estatisticamente significativo ($p < 0.05$).

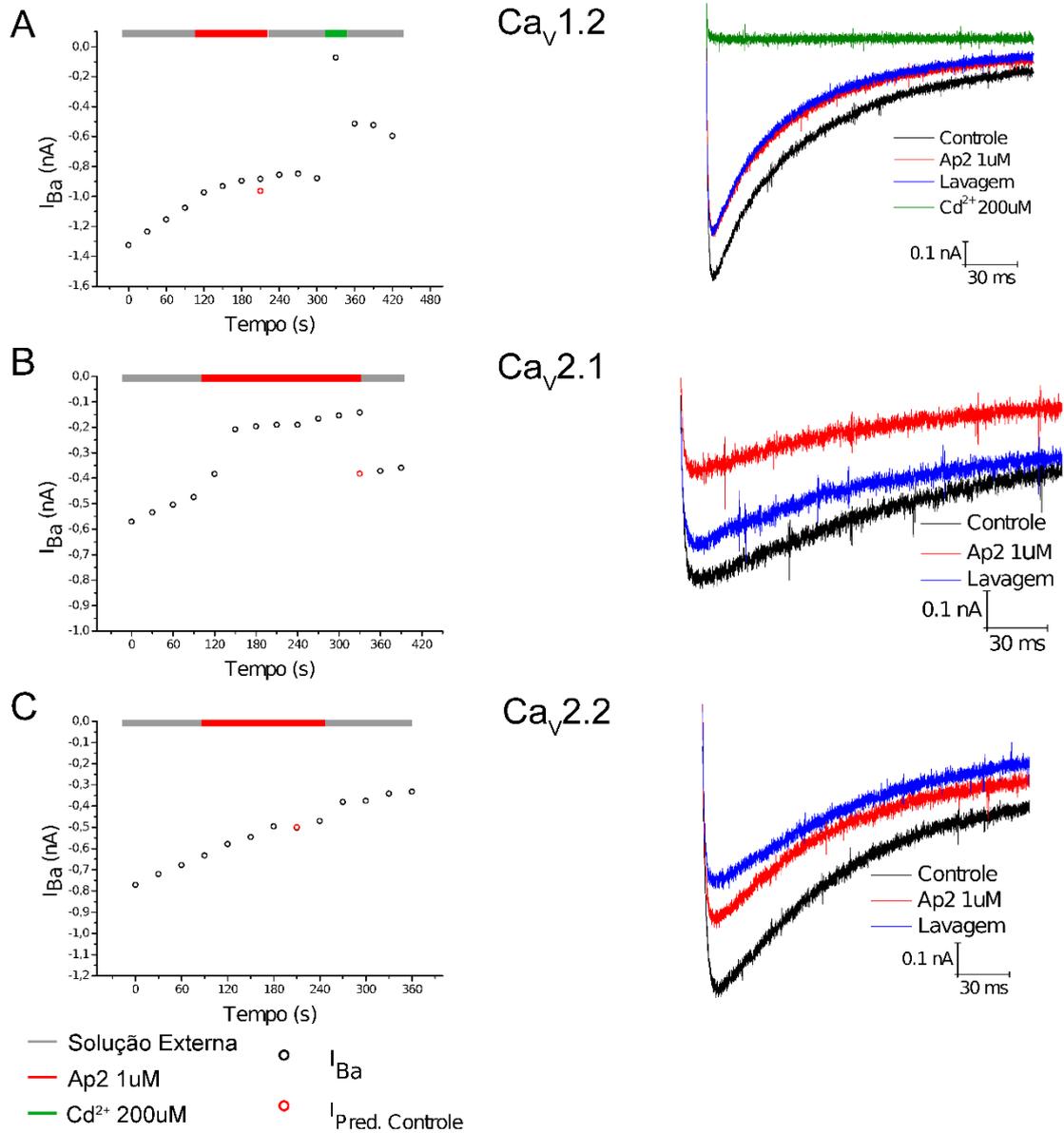


Figura 35 – Caracterização eletrofisiológica obtida em canais Ca_v na presença do Peptídeo Ap2. A: Efeito de 1 μM do peptídeo Ap2 sobre o canal $\text{Ca}_v1.2$. **B:** Efeito de 1 μM do peptídeo Ap2 sobre o canal $\text{Ca}_v2.1$. **C:** Efeito de 1 μM do peptídeo Ap2 sobre o canal $\text{Ca}_v2.2$

A toxina Ap3 na concentração de 1 μM inibiu em $22,08 \pm 2,9 \%$ ($n=4$) a corrente do canal $\text{Ca}_v2.1$ sem efeito nos outros canais de cálcio testados (Figura 36) (Tabela 5). Resultado estatisticamente significativo ($p < 0.05$).

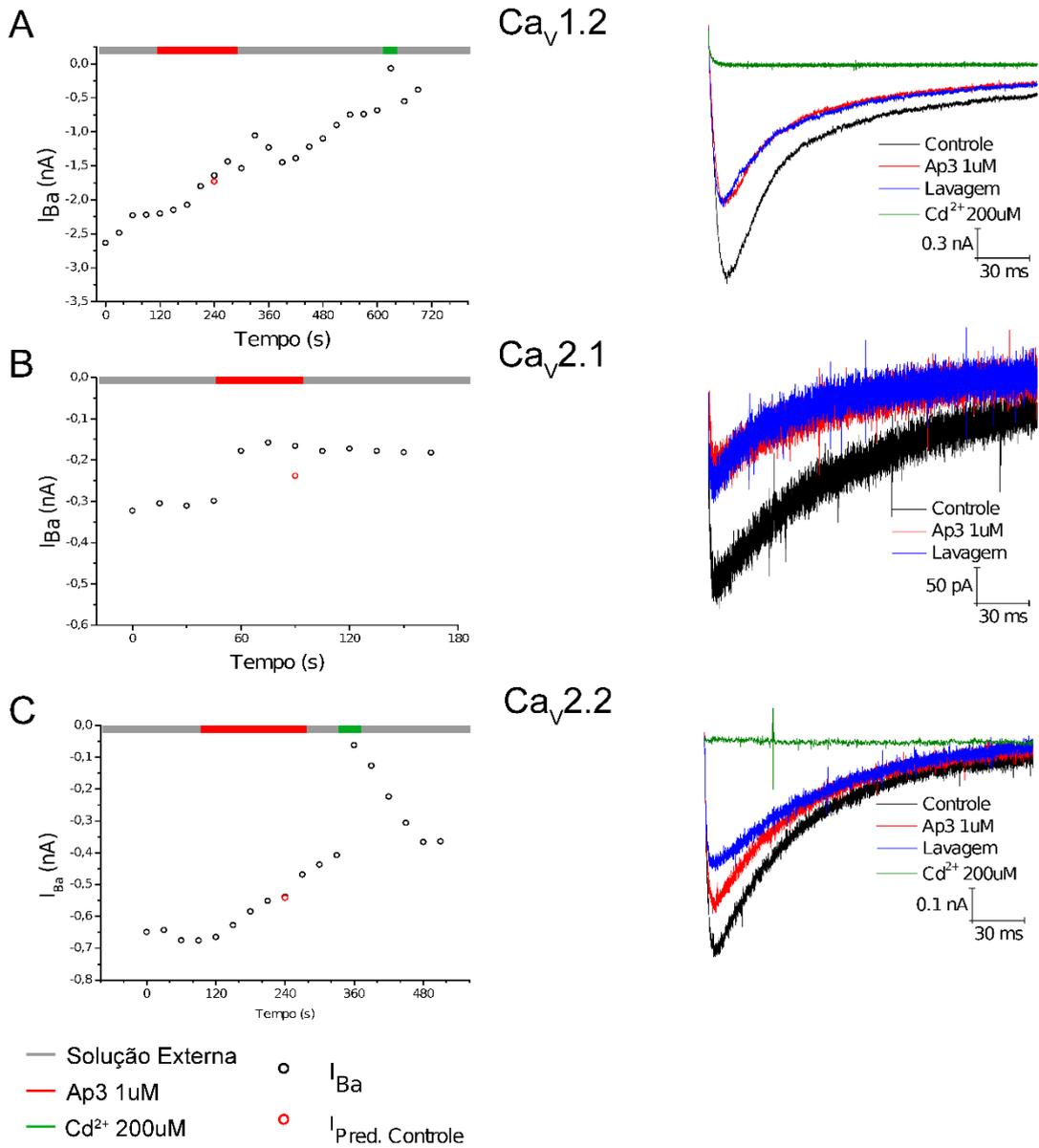


Figura 36 – Caracterização eletrofisiológica obtida em canais Ca_v na presença do Peptídeo Ap3. A: Efeito de 1 μM do peptídeo Ap3 sobre o canal $\text{Ca}_v1.2$. **B:** Efeito de 1 μM do peptídeo Ap3 sobre o canal $\text{Ca}_v2.1$. **C:** Efeito de 1 μM do peptídeo Ap3 sobre o canal $\text{Ca}_v2.2$

A toxina Ap4 na concentração de 1 μM não apresentou atividade nos canais testados (Figura37) (Tabela5).

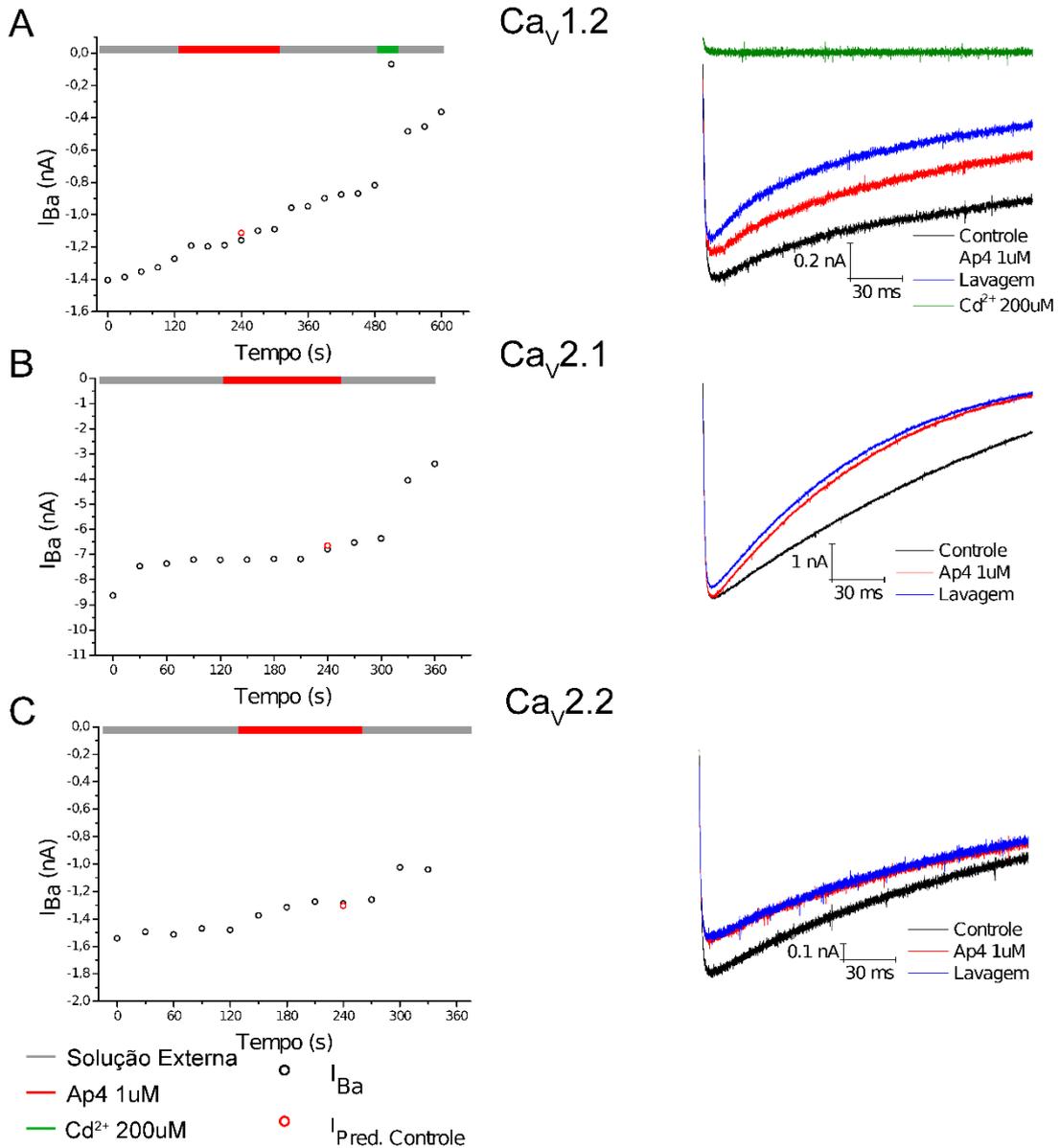


Figura 37 – Caracterização eletrofisiológica obtida em canais Ca_v na presença do Peptídeo Ap4. A: Efeito de 1 μM do peptídeo Ap4 sobre o canal $\text{Ca}_v1.2$. **B:** Efeito de 1 μM do peptídeo Ap4 sobre o canal $\text{Ca}_v2.1$. **C:** Efeito de 1 μM do peptídeo Ap4 sobre o canal $\text{Ca}_v2.2$.

A toxina Ap5 na concentração de 1 μ M inibiu em 28,06 \pm 6,10 % (n=3) a corrente do canal Ca_v2.1 sem efeito nos outros canais de cálcio testados (Figura 38) (Tabela 5). Resultado estatisticamente significante(p<0.05).

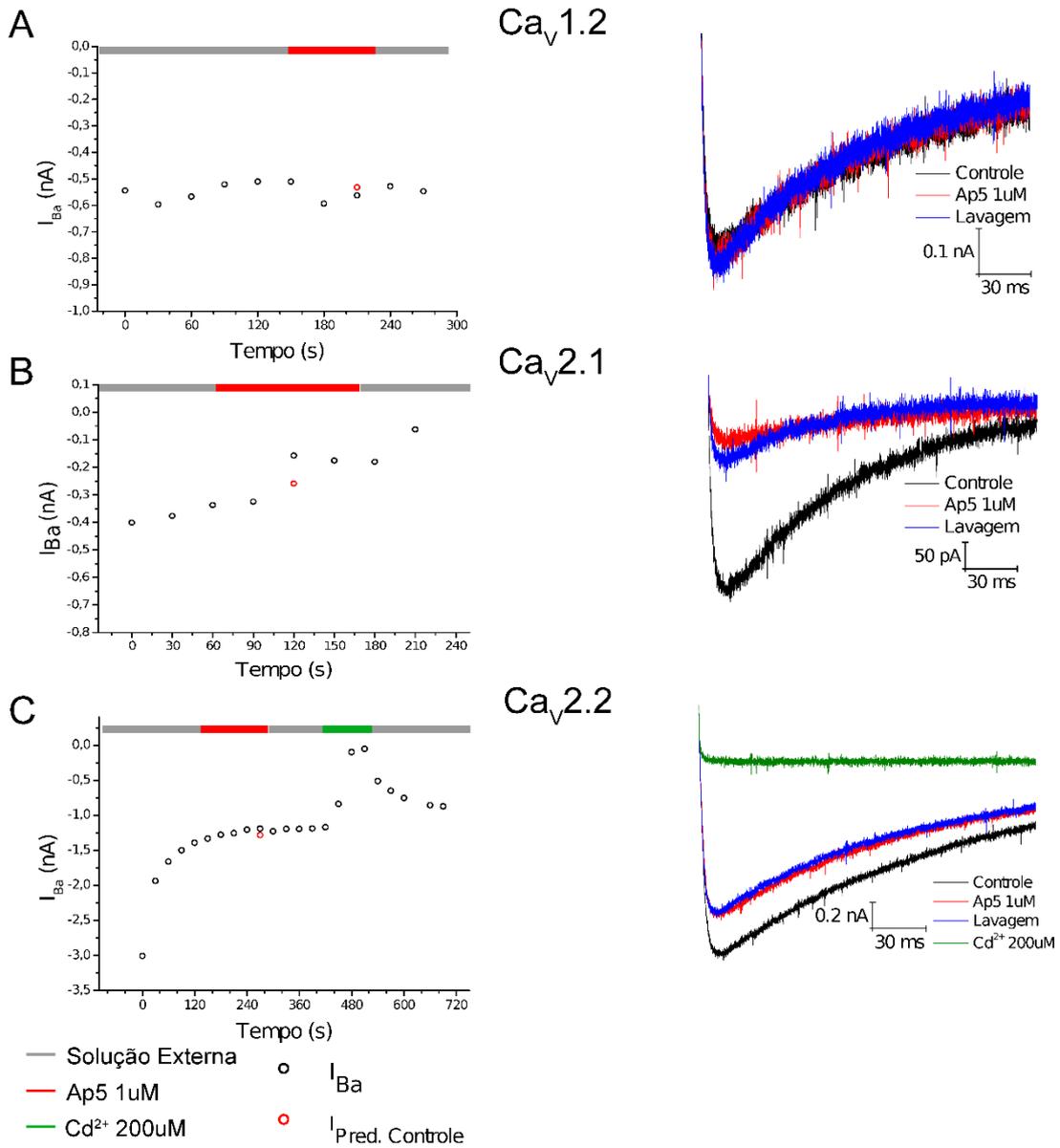


Figura 38 – Caracterização eletrofisiológica obtida em canais Cav na presença do Peptídeo Ap5. A: Efeito de 1 μ M do peptídeo Ap5 sobre o canal Cav1.2. **B:** Efeito de 1 μ M do peptídeo Ap5 sobre o canal Cav2.1. **C:** Efeito de 1 μ M do peptídeo Ap5 sobre o canal Cav2.2.

A toxina Ap6 na concentração de 1 μM inibiu em $12,48 \pm 1,11$ ($n=3$) a corrente do canal $\text{Ca}_v2.1$ sem efeito nos outros canais de cálcio testados (Figura 39) (Tabela 5). Resultado estatisticamente significante($p<0.05$).

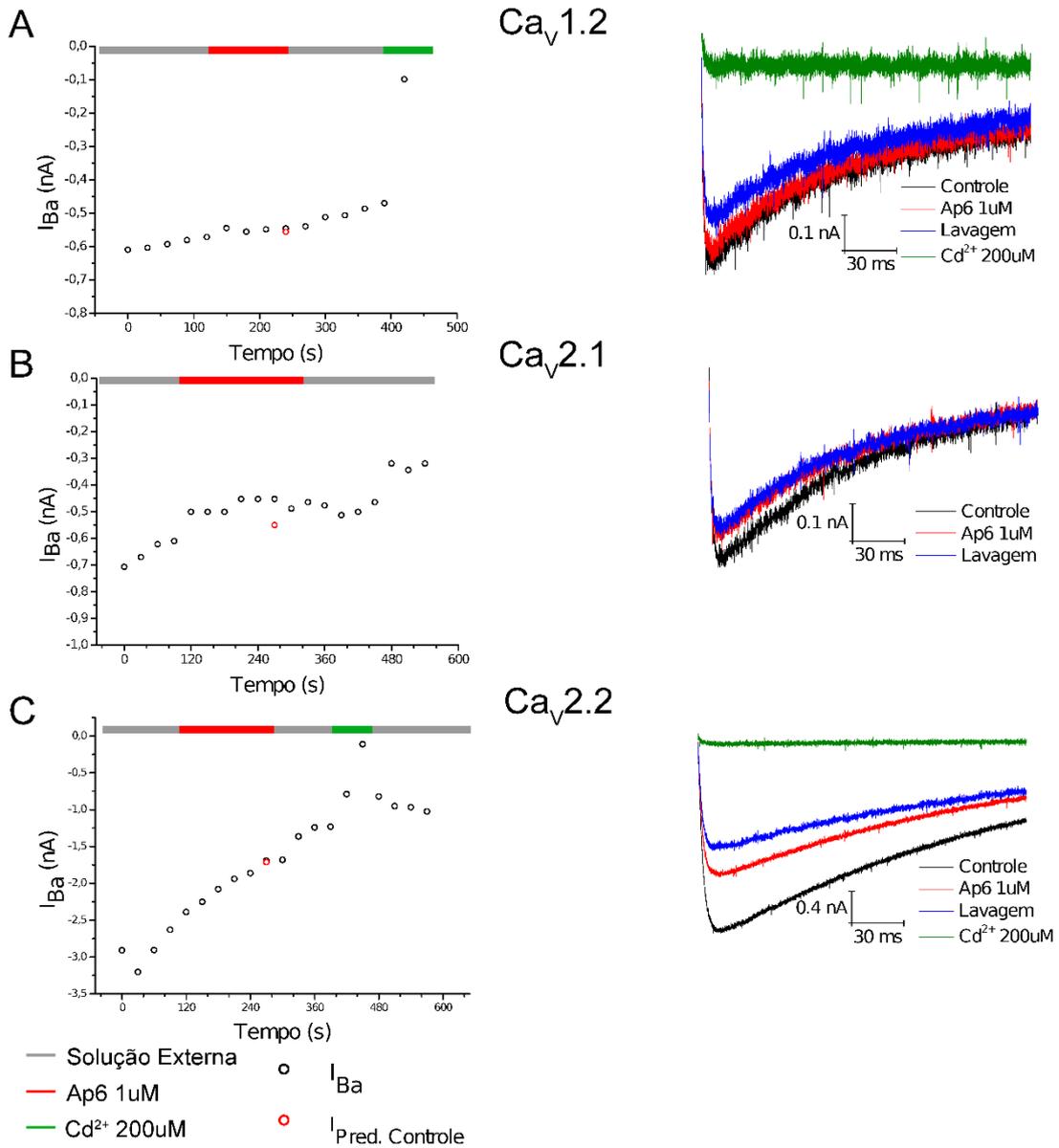


Figura 39 – Caracterização eletrofisiológica obtida em canais Ca_v na presença do Peptídeo Ap6. A: Efeito de 1 μM do peptídeo Ap6 sobre o canal $\text{Ca}_v1.2$. **B:** Efeito de 1 μM do peptídeo Ap6 sobre o canal $\text{Ca}_v2.1$. **C:** Efeito de 1 μM do peptídeo Ap6 sobre o canal $\text{Ca}_v2.2$.

Tabela 5 – Valores das médias da porcentagem de inibição (%) em canais cálcio. Valores com * são estatisticamente significantes.

	Ca_v1.2		Ca_v2.1		Ca_v2.2	
	Média (%)	n	Média (%)	n	Média (%)	n
Ap2 1μM	4,69 ±1,35	4	31,17 ±7,96*	5	0,88 ±0,66	3
Ap3 1μM	3,21 ±1,78	4	22,08 ±2,9*	4	0,84 ±0,49	3
Ap4 1μM	-6,66 ±1,31	3	-2,05 ±1,16	5	0,36 ±0,92	4
Ap5 1μM	0,04 ±1,14	4	28,06 ±6,10*	3	4,76 ±1,37	4
Ap6 1μM	4,04 ±3,96	3	12,48 ±1,11*	3	3,85 ±4,69	3

6 – Discussão

6.1 Os peptídeos Ap2, Ap3, Ap4, Ap5 e Ap6

O sequenciamento dos peptídeos e a confirmação de suas sequências por análise no transcrito da glândula de *Acanthoscurria paulensis* mostraram que as toxinas Ap2, Ap3, Ap4, Ap5 e Ap6 (Figura 22) apresentam as cisteínas posicionadas seguindo o consenso das cisteínas para o motivo estrutural ICK ($C^1X_{3-7}C^2X_{3-6}C^3X_{0-5}C^4X_{1-4}C^5X_{4-13}C^6$), com a região PSM conservada, indicando uma possível atividade neurotóxica para tais toxinas (Kozlov et al., 2005). A toxina Ap4 e seu possível peptídeo similar Ap4b apresentam em suas sequências primárias (Figura 24) o consenso ICK com a adição do motivo extra ESM uma vez que apresenta 8 cisteínas e o motivo PSM conservado.

O sequenciamento por ISD e a comparação com as possíveis sequências precursoras da toxina Ap2 encontradas na biblioteca de RNA da glândula de peçonha da *Acanthoscurria paulensis* resultaram em apenas uma sequência precursora que contém equivalência aos resíduos obtida pelo método do ISD. Tal sequência possui na sua região C-terminal uma G43 CAGENVPCDKDRPGDCCSRYECLKPTGYGWWYASYCYKKKSG que provavelmente sofre um processo de modificação pós-traducional com o corte da glicina na posição 43 e amidação da serina C-terminal. O peptídeo Ap2 foi identificado por Maldi TOF-TOF com uma massa molecular experimental monoisotópica de 4886,3 Da, sendo que a massa molecular monoisotópica teórica é de 4887,06 sem a amidação, e, com a presença da amidação C-terminal, é calculada uma massa molecular monoisotópica teórica de 4886,06 Da. A toxina Omega-theraphotoxin-Bs2a, que possui 80% de identidade com a toxina Ap2, apresenta o mesmo padrão C-terminal em sua sequência precursora KKKSG com corte da G42 e amidação da S41 (Corzo et al., 2008). O sinal de amidação em neurotoxinas de aranhas caranguejeiras pode ser apenas a presença de uma Glicina na região C-terminal ou uma Glicina seguida de até dois aminoácidos com cadeias laterais básicas, como por exemplo os sinais de amidação encontrados em toxinas escorpiônicas GKK e GKR (Zhang et al., 2015; Delgado-Prudencio et al., 2019)

O peptídeo Ap3 apresentou massa molecular monoisotópica experimental obtida por Maldi TOF-TOF de 4883,7 Da e massa molecular teórica de 4884,09 Da. O peptídeo Ap4 possui massa molecular monoisotópica experimental de 3870,7 Da e massa molecular teórica monoisotópica de 3870,51 Da. O peptídeo Ap5 possui massa monoisotópica experimental de 5454,9 Da e massa teórica monoisotópica de 5454,43 Da. O peptídeo Ap6 possui massa monoisotópica experimental de 3717,9 Da e massa monoisotópica teórica de 3718,50 Da. As

massas teóricas foram calculadas utilizando o programa Compass Isotope Pattern da Bruker Daltonics, as diferenças entre as massas teóricas e experimentais estão dentro da margem de erro do sistema de espectrometria de massas Maldi TOF.

As toxinas Ap2, Ap3 e Ap5 possuem grande similaridade entre si quanto às sequências primárias (Figura 40). As toxinas Ap3 e Ap5 diferem na região C-terminal com a presença de cinco aminoácidos a mais na sequência da toxina Ap5. A toxina Ap2 apresenta 42 resíduos de aminoácidos, um resíduo a mais que a toxina Ap3, com substituições em relação a Ap3 de V para G na posição 3, R para S na posição 18, E para R na posição 19, G para A na posição, E para S na posição 41 e uma adição de D entre a G14 e C15 (Posições definidas em relação aos peptídeos Ap3 e Ap5). A substituição dos aminoácidos V3G, R3S, E41S são mudança de aminoácidos hidrofílicos para aminoácidos considerados neutros (Monera et al., 1995), tal mudança poderia diminuir a solubilidade da toxina em água, todavia a adição do aminoácido Asp com cadeia lateral carregada negativamente entre a posição 14 e 15 compensa a diminuição da solubilidade por ser um aminoácido altamente hidrofílico. Comparando os valores teóricos de grandeza média de hidrofiliicidade (*Gravy*) calculados pelo programa Expsy Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>) observamos valor de -1.000 e -1.012 para as toxinas Ap2 e Ap3, respectivamente, demonstrando que a toxina Ap3 é mais hidrofílica, uma vez que valores mais positivos indicam uma condição mais hidrofóbica.

Ao analisar os dados do transcrito obtido no trabalho de Mourão e colaboradores (2013) foi encontrada apenas uma sequência precursora que possui a sequência para as toxinas Ap3 e Ap5, com isso acredita-se que a toxina Ap3 possa ser derivada de uma modificação pós-traducional com a clivagem dos 5 resíduos C-terminais Arginina-Leucina-Isoleucina-Serina-Treonina.

Toxina		n. ° AA
Ap2	CAGENVPCDKDRPGDCCSRYECLKPTGYGWWYASYCYKKKS-----	42
Ap3	CAVENVPCDKDRPG-CCREYECLKPTGYGWWYGSYYCYKKKE-----	41
Ap5	CAVENVPCDKDRPG-CCREYECLKPTGYGWWYGSYYCYKKKERLIST	46
	** ***** ** .***** .***** .	

Figura 40 - Alinhamento Ap2, Ap3 e Ap5. Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) semi-conservativas. A direita o número de aminoácidos e porcentagem de identidade.

6.2 Identidade de toxinas de aranha com os peptídeos isolados Ap2, Ap3 e Ap5

As toxinas Ap2, Ap3 e Ap5, devido à grande similaridade entre si, apresentaram os mesmos resultados de sequências (*hits*) no BlastP (Figuras 41), sendo que, dentre todos esses *hits*, uma pequena parcela das toxinas possui experimentos quanto à sua possível atividade biológica. A toxina com maior identidade com Ap2 (80,95%), Ap3 (80,49%) e Ap5 (80,49%) é o peptídeo isolado da aranha caranguejeira *Brachypelma smithi* Omega-TrTx-Bs2a, ou também conhecido como Bs1, que apresentou pequena capacidade de modular as correntes de sódio do canal de inseto Para/tipE, com pequena redução na amplitude da corrente e sem apresentar modulação no processo de ativação, inativação lenta e inativação rápida na concentração de 2µM. Em canais Nav1.2, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6 e Kv1.3, Bs1 não apresentou atividade (Corzo et al., 2008). A segunda toxina com maior identidade entre Ap2 (78,54%), Ap3 (75%) e Ap5 (75%) foi o peptídeo isolado da aranha caranguejeira do gênero *Aphonopelma* Asp3a (Uniprot - P0CI04) registrada sobre o número de patente US19920973323 19921103 com a descrição de inibir canais Cav em células granulares de cerebelo de ratos, provavelmente canais Cav2.1, o canal Cav com maior densidade nessas célula (Simms and Zamponi, 2014).

A toxina HnTx-XVI-22 (Tang et al., 2010), isolada da aranha caranguejeira *Cyriopagopus hainanus*, possui 62,5%, 61,54% e 61,54% de identidade com as toxinas Ap2, Ap3 e Ap5 respectivamente, caracterizada com atividade de inibição fraca nos canais Kv1.2, Kv1.3 e Kv2.1 (Correnti et al., 2018).

Desta forma, trata-se de toxinas que atuam em diferentes canais iônicos voltagem dependentes, incluindo canais de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺. Optamos por testar as toxinas descritas no presente trabalho inicialmente nos canais de Na⁺ e de Ca²⁺ devido à quantidade restrita de material obtido na purificação das toxinas.

A toxina Ap2 e Ap5 não alteram a amplitude correntes dos canais Nav1.1, Nav1.5 e Nav1.7, apresentando inibições não significativas estatisticamente, sem efeitos nas cinéticas de ativação e inativação dos canais de sódio (Figuras 25-26) (Tabela4). Tal ausência de efeito no canal Nav1.5 também se verificou para a toxina Bs1, indicando grupo de toxinas que provavelmente não age em canais de sódio de mamíferos (Corzo et al., 2008).

A toxina Ap3 apresentou pequena variação com significância estatística na amplitude das correntes nos canais Nav1.1 (Inib%=6,67±1,917), Nav1.5 (Inib%=4,20±1,09) e Nav1.7

(Inib%=12,05±5,14) (Figura 27-28)(Tabela 4). As cinéticas de ativação e inativação foram levemente alteradas, apresentando deslocamentos nos valores de $V_{1/2}$ da ativação e inativação do canal, representando alteração na sensibilidade à voltagem para a abertura do canal. O $\Delta V_{1/2}$ na ativação foi de 4,80 ±0,53 mV, 5,04 ±0,82 mV e 8,49 ± 2,42 mV para os canais Nav1.1, Nav1.5 e Nav1.7, respectivamente. $\Delta V_{1/2}$ na inativação foi de 3,81 ±0,32 mV, 3,41 ±0,73 e 4,05 ±0,61 para os canais Nav1.1, Nav1.5 e Nav1.7, respectivamente (Tabela 4). A toxina Ap3 se apresentou como um modulador de correntes de Na⁺ fraco na concentração de 1µM e por sua modulação na dependência de voltagem da ativação/inativação para valores de potência de membrana mais negativos, representa uma possível atividade no sítio 4 do canal de sódio, parecida com a atividade de β-Toxinas de escorpião (Catterall et al., 2007). Nas β-Toxinas de escorpião, a redução da amplitude de corrente ocorre por aprisionamento do sensor de voltagem em uma condição pré-ativado, estabiliza o sensor de voltagem em uma condição parcialmente ativado e fechado, onde a condição de fechado é preferida, reduzindo assim a amplitude da corrente (Cestèle et al., 1998). Entre as toxinas que apresentam similaridade com Ap3, não foram encontrados relatos de atividade nos canais Nav de mamíferos. As toxinas Ap3 e Ap5 diferem entre si na presença dos cinco resíduos adicionais na região C-terminal na Ap5; R42, L43, I44, S45 e T46 (Figura 40). A região C-terminal alongada pode ser responsável por uma mudança no enovelamento da proteína em relação à Ap3 e responsável por impedir efeitos nos canais de Nav de mamíferos uma vez que apresenta resíduos hidrofóbicos que tendem a não ficarem expostos ao meio aquoso.

As toxinas Ap2, Ap3 e Ap5 não alteraram as amplitudes das correntes dos canais Cav1.2 e Cav2.2, com valores de inibição para o canal Cav1.2 de 4,69 ±1,35 %, 3,21 ±1,78 %, 0,04 ±1,14 % para as toxinas Ap2, Ap3 e Ap5, respectivamente e valores de inibição para o canal Cav2.2 de 0,88 ±0,66 % , 0,84 ±0,49 % e 4,76 ±1,37 % para as toxinas Ap2, Ap3 e Ap5, respectivamente (Tabela 5) representando uma ausência de efeito nos canais do Tipo L e canal do tipo N. Ao analisar o efeito das Ap2, Ap3 e Ap5 nos canais Cav2.1 foi constatada a inibição de parte da corrente no Cav2.1 na concentração de 1µM, sendo a inibição de 31,17±7,96 % para a toxina Ap2, 22,06±2,9 % para a toxina Ap3 e 28,06±6,10 % para a toxina Ap5. Os canais Cav2.1 foram os únicos canais Cav que apresentaram uma inibição maior que 5% por essas toxinas (Tabela 5). Tal atividade de inibição de corrente dos canais Cav2.1 foi descrita para a toxina (Uniprot - P0CI04) (registrada sobre o número de patente US19920973323 19921103), Omega-TrTx-Asp3a. Dentre os canais testados apenas foi encontrada atividade de inibição mais expressiva nos canais de cálcio dependentes de voltagem, caracterizando as toxinas Ap2, Ap3

e Ap5 como ω -toxinas. Entre as toxinas Ap2, Ap3 e Ap5, a toxina Ap2 apresentou uma inibição pouco superior às outras toxinas, aproximadamente 3% a mais que a toxina Ap5 e, aproximadamente, 7% a mais que a toxina Ap3. Ao comparar as sequências primárias de Ap3 e Ap5, observa-se a presença de cinco resíduos extras na região C-terminal da Ap5 em relação à sequência da Ap3, os resíduos R42, L43, I44, S45 e T46, contribuindo para um aumento da hidrofobicidade geral com os resíduos L43, I44 e possível aumento da superfície hidrofóbica de interação, com um hidrofobicidade média teórica de -0.852 em comparação com as toxinas Ap2 e Ap3 que apresentaram -1.000 e -1.012 respectivamente (<https://web.expasy.org/protparam/>) tal aumento da hidrofobicidade pela região C-terminal pode ser um fator de uma atividade maior da toxina Ap5 em relação a Ap3 no canal Cav2.1. A superfície hidrofóbica bordada por resíduos carregados promove uma característica anfifílica, sendo uma das características conservadas em toxinas moduladores de *Gating* para interação com canais iônicos, ajudando a interação com as partes dos canais iônicos mais internamente associados a membrana fosfolipídica (Agwa et al., 2017, 2018).

Toxina		n. °	AA	ID-Ap2 (%)	ID-Ap3 (%)	ID-Ap5 (%)
U12-BATX-T11a	-CLGEDISCGEKPGDLVRMP-CCAKEYECKETAGY-WWYQKRFCVKKKS-----	45	46,81	50,00	50,00	
U17-BATX-T11c	-CLGENVPCGDN-----IP-CCGKLSCEKTFGYPWWYKSPYCVKPS-----	40	52,38	48,78	52,63	
U26-TRTX-Cg1a	-CWGANVPCEDEN-----SP-CCSPLKCEKTFGYGWWYGSFFCVRSGS-----	41	50,00	46,15	46,15	
U26-TRTX-Cg1b	-CWGANVPCEDEN-----SP-CCPPLKCEKTFGYGWWYGSFFCVRSGS-----	41	47,62	46,15	46,15	
U16-BATX-T11b	-CNGENVPCGPNH-----ST-CCSGLSCEETFGYGWWYASPYCVK-----	38	56,41	50,00	50,00	
U16-BATX-T11d	-CNGNNVPCGPDH-----PP-CCSGLSCEKTFGYGWWYKSPYCVR-----	38	56,41	52,63	52,63	
U16-BATX-T11e	-CNGNNVPCGPDH-----PP-CCSGLSCEETFGYGWWYKSPYCVR-----	38	53,85	50,00	50,00	
U2-TRTX-Lsp1a	-CGVDAPCDKDR-----PD-CCSYAECLR-SGYGWWHGTYYCYRKRER----	41	61,90	60,98	61,90	
HwTx-VI	NCIGEQVPCDEND-----PR-CCSGLVVLKKTTLHGIWIKSSYCYCK-----	41	53,85	50,00	50,00	
HNTX-XVI-13	-CIGKDVPCDEND-----PR-CCSGLICLPTLHGIWYKSYCYKK-----	39	60,00	56,41	56,41	
HNTX-XVI-8	---GEGVPCDEND-----PR-CCPRLVCLKPTLHGIWYKSYCYKK-----	37	65,79	63,89	63,89	
HNTX-XVI-19	-CIGEGVPCDEND-----PR-CCSGLVCLKPTLHGIWYKSYCYCK-----	39	62,50	58,97	58,97	
HNTX-XVI-22	-CIGEGVPCDEND-----PR-CCFGLVCLKPTLHGIWYKSYCYCK-----	39	62,50	61,54	61,54	
HNTX-XVI-16	-CIGEGVPCDEND-----PR-CCSGLVCLKPTLHGIWYKSYCYCK-----	39	62,50	58,97	58,97	
HNTX-XVI-6.2	-CIGEGVPCDEND-----PR-CCSGLVCLKPTLHGIWYKSYCYRK-----	39	62,50	58,97	58,97	
HNTX-XVI-7	-CIGEGVPCDEND-----PR-CCSGLICLKPTLHGIWYKSYCYCK-----	39	65,00	61,54	61,54	
HNTX-XVI-21	-CIGEGVPCDENV-----PR-CCSGLVCLKPTLHGIWYKSYCYCK-----	39	65,00	61,54	61,54	
HNTX-XVI-2	-CIGEGVPCDEND-----PR-CCSGLVCLKPTLHGIWYKSYCYKRS-----	41	64,24	58,54	58,54	
HNTX-XVI.19	-CIGEGVPCDEND-----PR-CCSGLVCLKPTLHGIWYKSYCYCK-----	39	65,00	61,54	61,54	
HNTX-XVI-3	-CIGEGVPCDEND-----PR-CCSGLVCLKPTLHGIWYKSYCYCK-----	39	65,00	61,54	61,54	
HNTX-XVI-11	-CIGEGVPCDEND-----PR-CCSGFVCLKPTLHGIWYKSYCYCK-----	39	65,00	61,54	61,54	
Omega-TRTX-Asp3a	-CLGENVPCDKDR-----PN-CCSKYECLPTGYGRCYASYSYKKTTL----	42	78,54	75,00	75,00	
Ap2	-CAGENVPCDKDR-----PGDCCSRYECLKPTGYGWWYASYYCYKKS-----	42	100,0	85,71	85,71	
Ap5	-CAENVPCDKDR-----PG-CCREYECLKPTGYGWWYGSYYCYKKERLIST	46	85,71	100,0	100,0	
Ap3	-CAENVPCDKDR-----PG-CCREYECLKPTGYGWWYGSYYCYKKKE-----	41	85,71	100,0	100,0	
Omega-TRTX-Bs2a ; Bs1	-CIGESVPCDKDD-----PR-CCREYECLKPTGYGWWYASYYCYRKS-----	41	80,95	80,49	80,49	

Figura 41 – Alinhamento múltiplo com peptídeos que apresentaram similaridade com os Peptídeos Ap2, Ap3 e Ap5. Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) semi-conservativas. A direita o número de aminoácidos e porcentagem de identidade.

6.3 Identidade de toxinas de aranha com o peptídeo isolado Ap4

Durante a busca de similaridade foram encontradas oito sequências únicas que apresentavam identidade com a sequência da Ap4 (Figura 42), dentre as quais, a única toxina que apresenta identidade acima de 50 % e dados experimentais é a toxina HNTX-XVII.3, que possui 55,80% identidade e classificada como fraco inibidor de Kv1.2 e Kv1.3 a 20 μ M (Correnti et al., 2018).

O peptídeo Ap4 segue à disposição das cisteínas do motivo ICK com a presença do grupo extra ESM. Tal espaçamento encontrado na Ap4 entre as cisteínas segue o mesmo padrão das toxinas μ -agatoxin-Aa1a (Omecinsky et al., 1996), δ -PaluIT1 (Corzo et al., 2000) e a toxina HNTX-XVII com a qual possui 55,88 % de identidade (Tang et al., 2010). A ligação das pontes dissulfeto nos dois primeiros peptídeos é C¹-C⁴, C²-C⁵, C³-C⁸, C₆-C₇, padrão que pode ser presente na toxina Ap4. Entretanto, tal informação só poderá se confirmada com experimentos adicionais. A superfamília F das Hainantoxins (HNTX) possui dentre os seus representantes toxinas com a mesma disposição das 8 cisteínas ICK e ESM, sendo um deles a toxina HNTX-XVII (55,88% identidade com a toxina Ap4) e a toxina HWTX-XVIIb1, sendo esta última, com apenas 37,5% de identidade com a toxina Ap4, um inibidor de canais de cálcio de mamíferos (Tang et al., 2010), indicando baixa possibilidade de efeito da toxina Ap4 em canais de cálcio dependentes de voltagem.

O peptídeo Ap4 não apresentou atividade de modulação ou inibição de corrente nos canais de mamíferos testados Nav1.1, Nav1.5, Nav.17, Cav1.2, Cav2.1 e Cav2.2 (Tabelas 3 e 4). Em comparação com os representantes dos grupos das ICK com 8 cisteínas e motivo ESM, as toxinas μ -agatoxin-Aa1a e δ -PaluIT1 apresentam atividade nos canais Nav de insetos, sendo a primeira bloqueadora de poro e a segunda moduladora com atividade similar a uma α -like toxina escorpiônica. Para uma caracterização dos possíveis alvos moleculares da toxina Ap4 seria necessária uma avaliação eletrofisiológica de sua atividade em canais de insetos e canais de potássio de mamíferos por sua similaridade com as toxinas citadas (Figura 42).

Toxina		n.º AA	ID (%)
μ-agatoxin-Aa1a	ECVPENGHCRDWDYD-ECCEGFYCSQRQ-PPKCICRNNN	36	44,44
δ-PaluIT1	GCLGEGEKCADWSGSPCCDGFYCSRS-MPYCRCRNNS	37	47,37
U25-TRTX-Cg1b	SCIERMQTCGVEAGLPCCSGAPCICPY-IGDCICIQ--	35	46,88
HWTX-XVIIb1	SCAKPGEMCMRI---KCCDG-QCGCNRGTGRCFCCK---	31	37,50
Ap4	FCVHERETCSKVRGPLCCTG-ECICPI-YGDCFCYGS-	35	100,0
U1-TRTX-Agm2a	-CVHERETCSKVRGPLCCRG-ECICPI-YGDCFCYGS-	34	97,06
HNTX-XVII	-CAKPRENCNRM-NILCCRG-ECVCPT-FGDCFCYGD-	33	55,88
HNTX-XVII.3	-CAKPRENCNRM-NILCCRG-ECVCPT-FGDCFCYGD-	33	55,88
HNTX-XVII-2	-CAKPRENCNRM-NILCCRG-ECVCPT-FGDCFRYGD-	33	52,94
	* * ** * * *		

Figura 42 - Alinhamento Múltiplo com os peptídeos que apresentaram similaridade com o peptídeo Ap4. Os valores de identidade são em relação ao peptídeo Ap4. Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) ou semi-conservativas. A direita o número de aminoácidos e porcentagem de identidade.

6.4 Identidade de toxinas de aranha com o peptídeo isolado Ap6

A toxina Ap6 apresenta a mesma disposição das cisteínas e o mesmo número de aminoácidos entre as cisteínas presente na toxina Kappa-TrTx-Gr3a, também conhecida como Vstx1, isolada da aranha *Grammostola rósea* ($C^1X_6C^2X_5C^3C^4X_4C^5X_6C^6$) que apresenta o padrão de ligação dissulfeto esperado das ICK C^1-C^4 , C^2-C^5 , C^3-C^6 (Hoi et al., 2005). A toxina VsTx1, que possui 59,26% de identidade com a Ap6, apresenta face com a superfície exclusivamente hidrofóbica formada pelos resíduos F5, M6, L19, V20, W25, W27, V29 e L30 propiciando uma característica importante para interação com as fendas na estrutura de canais iônicos para possíveis modulações (Hoi et al., 2005). Na Ap6, estão presentes os resíduos hidrofóbicos F5, M6, V20, W25, W27 nas mesmas posições em relação à toxina VsTx1 (Figura 43). Na posição 19, existe uma substituição da leucina por uma tirosina, sendo um aminoácido menos hidrofóbico, nas posições 29 e 30 ocorre a substituição de dois aminoácidos hidrofóbicos (V29, L30) por um aminoácido neutro G29 e outro hidrofílico N30 (Monera et al., 1995). Tais substituições de aminoácidos que ocorrem na toxina Ap6 caracterizam uma diminuição da hidrofobicidade na superfície de interação e pode ser responsável por uma menor capacidade de ligação a canais iônicos em relação à toxina VsTx1 (Hoi et al., 2005), a hidrofobicidade média teórica da toxina VsTx1 é de -0.268 (<https://web.expasy.org/protparam/>), em relação a Ap6 que possui um a hidrofobicidade teórica de -0.584 é o que revela uma maior tendência hidrofóbica geral na toxina VsTx1. VsTx1 possui atividade descrita em diferentes tipos de canais iônicos, sendo capaz de modular o *gating* do canal KvAP e inibir os canais Nav1.7 e Kv11.1 (Ruta and MacKinnon, 2004; Bemporad et al., 2006; Redaelli et al., 2010).

A toxina Agm3a, isolada da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, possui 96,77% de identidade com a toxina Ap6, existindo apenas duas diferenças em sua sequência na região N-terminal em relação a Ap6, a presença de um aminoácido adicional Met1 e uma substituição N5S (Figura 43). Todos os aminoácidos da região PSM são idênticos, provavelmente as duas toxinas apresentem a mesma superfície de interação hidrofóbica e, com isso, atividade similar em canais iônicos (Abreu et al., 2017). Não existem dados experimentais sobre atividade biológica da toxina Agm3a.

A toxina Kappa-TRTX-Pg1a, também conhecida como GxTx1E, isolada da aranha caranguejeira *Chilobrachys guangxiensis* possui 54,84 % de identidade com a toxina Ap6 e foi caracterizada com atividade modulatória no processo de *gating* dos canais Kv2.1, Kv2.2 e Kv4.3 por um mecanismo de alteração da sensibilidade à voltagem dos canais de potássio para potenciais mais positivos, promovendo a estabilização dos sensores de voltagem S4 em um estado de repouso e necessitando de despolarizações com maior variação de voltagem para abertura do canal (Herrington et al., 2006; Herrington, 2007; Schmalhofer et al., 2009). Devido à similaridade com a toxina GxTx1E uma avaliação da atividade sobre os canais de K⁺ para uma descrição dos possíveis alvos molecular da toxina Ap6.

A toxina Mu-TxTx-Hs1a, ou também conhecida como HwTx-III, isolada da aranha caranguejeira *Cyriopagopus schmidti* apresenta 53,33% de identidade com a toxina Ap6. Tal toxina apresentou inibição dose-dependente em canais sódio de insetos de nervos DUM (*dorsal unpaired median*) de baratas *Periplaneta americana*, sem efeitos sobre as cinéticas de ativação ou inativação dos canais, indicando um potencial bloqueador do poro iônico (sítio I) com um IC₅₀ de aproximadamente 1 µm/L (Wang et al., 2010). Levando em consideração a identidade com a toxina Ap6, avaliação eletrofisiológica nos canais Nav de insetos seria de grande valor para a descrição dos possíveis alvos biológicos da toxina.

Da peçonha aranha caranguejeira chinesa *Chilobrachys guangxiensis* foi isolado o peptídeo Beta/Kappa-TrTx-Cg1a, também chamado de JZTX-III (Xiao et al., 2004), que possui 53,57% de identidade com a toxina Ap6 (Figura 43). A toxina Beta/Kappa-TrTx-Cg1a foi descrita inicialmente como inibidora da ativação dos canais Nav1.5 em cardiomiócitos de ratos, com um IC₅₀ 0,38 mM, ausência de efeito nos canais de sódio a 1 µM presente nos gânglios da raiz dorsal de ratos e ausência de efeitos nos canais de potássio Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.3 na mesma concentração de 1µM (Xiao et al., 2004). Posteriormente, foi descrita a capacidade de interagir com o canal Kv2.1 e inibir suas correntes iônicas, apresentando total inibição das correntes na

concentração de 5µM da toxina (Yuan et al., 2007). A resolução da estrutura da toxina por RMN descreveu a formação de duas faces na toxina, uma face predominante hidrofóbica importante para a interação com o canal iônico formada pelos resíduos F7, W8, W9, W28 e W30 (Liao et al., 2007) que difere na possível face hidrofóbica da toxina Ap6 na substituição do resíduo W8 por uma Metionina, que também apresenta uma característica hidrofóbica em pH neutro (Liao et al., 2007; Monera et al., 1995). As cisteínas na toxina Beta/Kappa-TrTx-Cg1a estão ligadas na disposição Cys4–Cys19, Cys11–Cys24 e Cys18–Cys31, seguindo o padrão esperado em toxinas com o motivo ICK (Liao et al., 2007; Pallaghy et al., 1994)

Toxina		n.º	AA	ID (%)
U10-TRTX-Cg1a	--QCGEFMWKCGAGKPTCCSGYDCSPTWKWCVLKSPGRR	37	64,29	
Kappa-TRTX-Pg1a;GxTx1E	EGECGGFWWKCGSGKPACCPKYVCSFKWGLCNFPMP---	36	54,84	
Beta/kappa-TRTX-Cg1a	DGECGGFWWKCGRGKPPCCKGYACSKTWGCAVEAP---	36	53,57	
HNTX-VIII-8	--DCAGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	53,33	
HNTX-VIII-9	--DCAGYMRECEE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	53,33	
HNTX-VIII-15	--DCAGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	50,00	
HNTX-VIII-4	--DCAGYMRECKG-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	50,00	
HNTX-VIII-7	--DCAGYMRECKE-K-LRCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	50,00	
HNTX-VIII-10	--DCAGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWRVLPAPWRR	35	53,85	
HNTX-VIII-13	--DCAGYMRECKE-E-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	53,33	
HNTX-VIII-12	--DCAGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	50,00	
HNTX-VIII-14	--DCAGHMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	53,33	
HNTX-VIII-17	--DCAGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	53,33	
HNTX-VIII-16	--DCVGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	53,33	
HNTX-VIII-6	--NCAGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	53,33	
HNTX-VIII-11	--DCAGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	55,56	
HNTX-VIII-2	--DCAGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVSPAPWRR	35	53,33	
HNTX-VIII-5	--DCAGYMRECKE-K-LCCNGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	53,33	
U3-TRTX-Hhn1r	--DCAGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAW---	32	53,33	
Mu-TRTX-Hs1a	--DCAGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAW---	33	53,33	
HNTX-VIII	--DCAGYMRECKE-K-LCCSGYVCSRWKWCVLPAWRR	35	53,33	
Ap6	--ACGNFMWKCSERL-PCCQYEVCSQWKCQNP-----	31	100,0	
U1-TRTX-Agm3a	--MACGSFMWKCSERL-PCCQYEVCSQWKCQNP-----	32	96,77	
U11-TRTX-Cg1a	--DCKGFQVKCKKDS-ECCSSYVCSQWKCVCVYPSPFGR	36	50,00	
Kappa-TRTX-Gr3a;Vstx1	--ECGKFMWCKNSN-DCCKDLVCSRWKWCVLASPF--	34	59,26	
U5-TRTX-Hs1b	----GCFGYKCDYYK-GCCSGYVCSPTWKWCVRPGPG--	32	55,17	
U5-TRTX-Hs1a	----GCLGDKCDYNN-GCCSGYVCSPTWKWCVLGPW--	32	53,33	

:* * * *

Figura 43 - Alinhamento Múltiplo com os peptídeos que apresentaram similaridade com o peptídeo Ap6. Os valores de identidade são em relação ao peptídeo Ap6. Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna,(:)substituições conservativas,(.) ou semi-conservativas. A direita o número de aminoácidos e porcentagem de identidade.

A caracterização eletrofisiológica da toxina Ap6 apresentada nesse trabalho demonstra a ausência de efeito na concentração de 1 µM nos canais de mamíferos Nav1.1, Nav1.5, Cav1.2 e Cav2.2. A toxina Ap6 1 µM inibiu 6,56±3,33 % da amplitude da corrente no canal Nav1.7, entretanto tal valor não foi considerado significativo pelo teste estatístico. O canal Cav2.1 teve a amplitude da corrente inibida em 12,48±1,11 % com 1 µM da toxina Ap6 (Tabelas 4 e 5).

Dentre as toxinas com similaridade com a toxina Ap6 foi descrita atividade em canais KvAP, Kv11.1, Kv2.1, Kv2.2, Kv4.3, Nav de insetos e Nav1.5, sendo que, no presente trabalho apenas o canal Nav1.5 foi testado e a Ap6 não apresentou atividade como descrito para a toxina Beta/Kappa-TrTx-Cg1a (Xiao et al., 2004). O possível alvo molecular da toxina Ap6 deverá ser avaliado entre os canais de potássio dependentes de voltagem e os canais de sódio de insetos.

6.5 Canal Cav2.1 – Função, canalopatias e moduladores

O canal Cav2.1 possui dois *splicing* alternativos responsáveis por duas correntes iônicas com características diferentes, as correntes P e Q (Bourinet et al., 1999). A diferença entre esses dois tipos de corrente e sua sensibilidade à toxina ω -agatoxin IVA têm sido explicada pela ausência dos aminoácidos na alça extracelular S3-S4 do domínio 4 e esses dois aminoácidos são codificados na presença do exon e31a no mRNA das células de Purkinje, onde são registradas as correntes tipo P (Bourinet et al., 1999; Lipscombe and Andrade, 2015). O canal Cav2.1 é um dos canais de cálcio do grupo dos canais de cálcio pré-sinápticos constituído pelos canais da família Cav2 e, portanto, são de grande interesse farmacológico pois possuem influência na transmissão sináptica (Catterall and Few, 2008). As sinapses no sistema nervoso central de mamíferos, em sua maioria, são possibilitadas pelas correntes tipo P/Q dos canais Cav2.1, componente essencial para a liberação de vesículas múltiplas para o espaço sináptico (Satake and Imoto, 2014), sendo também responsáveis por uma pequena parcela das sinapses de interneurônios inibitórios do hipocampo (Poncer et al., 1997).

Diversas canalopatias envolvendo a mutação no gene CACNA1A que codifica para o Cav2.1 foram registradas nos últimos anos, como classe de hemiplegia familiar (FHM1) envolvendo o funcionamento incorreto deste canal, com as condutâncias do canal alteradas, existindo casos de aumento ou diminuição da macrocorrente (Cao and Tsien, 2005; Nimmrich and Gross, 2012). Mutações no gene CACNA1A estão também relacionados a casos de epilepsia em humanos (Zamponi et al., 2010).

Os compostos que atuam no canal de cálcio Cav2.1 foram classificados em três grupos: os compostos peptídicos oriundos da peçonha de diversos animais, compostos de baixa massa molecular e compostos terapêuticos que afetam os canais de Cav2.1 como alvos secundários (Nimmrich and Gross, 2012). Devido à grande similaridade entre os canais Cav2.1 e Cav2.2, são descritos poucos compostos que possuem atividade com maior seletividade ou específicos para o canal Cav2.1 (Nimmrich and Gross, 2012).

Na concentração de 1 μM , foi detectada atividade das toxinas Ap2, Ap3, Ap5 e Ap6 no canal $\text{Ca}_v2.1$ sem nenhum efeito aparente nos outros canais de cálcio testados (Tabelas 4 e 5), sendo portanto toxinas que possuem em sua atividade descrita grande potencial para um ferramenta molecular, no estudo de interação canal-toxina, quanto um potencial farmacêutico para elaboração de outras drogas.

A toxina PhTx3-3, isolada da aranha armadeira encontrada no território brasileiro *Phoneutria nigriventer*, é um potente inibidor dos canais de cálcio $\text{Ca}_v2.1$. PhTx3-3 inibiu corrente P/Q em células granulares de cerebelo na concentração de 60 nM (Leão et al., 2000).

Toxinas que atuam em $\text{Ca}_v2.1$ com maior seletividade foram isoladas da aranha *Agelonopsis aperta* – “agatoxin” e de moluscos do gênero *Conus* – “conotoxinas” (Nimmrich and Gross, 2012). A toxina ω -agatoxin-IVA inibe totalmente as correntes a 40 nM e atua no canal deslocando a dependência de voltagem para potenciais mais positivos (+50mV), interage na alça extracelular S3-S4 do domínio 4 e altera o funcionamento do sensor de voltagem (Winterfield and Swartz, 2000; McDonough et al., 1997). A toxina ω -agatoxin-IVB possui K_D de 3nM para o bloqueio de correntes P registradas em células de Purkinje e o mesmo mecanismo de ação que a toxina ω -agatoxin-IVA e cinéticas de bloqueio muito parecidas (Reily and Bean, 1993; Adams, 2004).

A conotoxina isolada de *Conus magnus* ω -Conotoxina MVIIC apresenta atividade nos canais $\text{Ca}_v2.1$ e $\text{Ca}_v2.2$, com uma afinidade maior para os canais $\text{Ca}_v2.1$ com $K_D = 0,6$ nM (Lewis et al., 2000). A maioria das toxinas isoladas de *Conus* apresentaram uma atividade maior nos canais $\text{Ca}_v2.2$ como é o caso das toxinas GVIA, GVIIA, MVIIA, SVIA e SO-3 (Ramírez et al., 2017). Importante citar que a toxina MVIIA, conhecida pelos nome comerciais de Ziconotide ou Prialt, bloqueadora específica de canais $\text{Ca}_v2.2$, foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para seu uso terapêutico em dores crônicas com atividade analgésica maior que a morfina e sem efeitos de tolerância para seu efeito analgésico (Ramírez et al., 2017).

5 – Conclusão

Neste presente trabalho foi apresentada a purificação e caracterização eletrofisiológica de cinco novas toxinas da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*. A toxina Ap4 não apresentou atividade nos canais testados de Na⁺ e de Ca²⁺. Por similaridade de sequência com outras toxinas de aranhas, é possível que atuem em canais de potássio dependentes de voltagem e canais de sódio de insetos.

As toxinas Ap2, Ap3 e Ap5, que apresentam alta identidade entre si quanto suas sequências primárias, apresentaram atividade específica para o canal Cav2.1 entre os canais testados, sendo caracterizadas como ω -toxinas. A toxina Ap3 além de apresentar atividade nos canais de cálcio apresentou uma inibição fraca nas correntes de Na⁺ nos canais Nav1.1, Nav1.5 e Nav1.7. A Toxina Ap6 apresentou atividade em canais Cav2.1 sendo também caracterizada como uma ω -toxina

Este trabalho contribui tanto para o desenvolvimento do conhecimento sobre a peçonha de aranhas caranguejeiras presentes no Brasil e seus potenciais usos biotecnológicos, quanto para estudos futuros quanto a estrutura função da interação toxinas e canais iônicos.

6 – Perspectivas

- Caracterização eletrofisiológica dos peptídeos Ap4 e Ap6 em canais de potássio dependentes de voltagem e em canais de sódio de insetos
- Caracterização das curvas dose-resposta das toxinas Ap2, Ap3 e Ap5 no canal Cav2.1 e avaliação das cinéticas de ativação do canal.

Referências Bibliográficas

- Abreu, T.F., B.N. Sumitomo, M.Y. Nishiyama, U.C. Oliveira, G.H.M.F. Souza, E.S. Kitano, A. Zelanis, S.M.T. Serrano, I. Junqueira-de-Azevedo, P.I. Silva, and A.K. Tashima. 2017. Peptidomics of *Acanthoscurria gomesiana* spider venom reveals new toxins with potential antimicrobial activity. *J. Proteomics*. 151:232–242. doi:10.1016/j.jprot.2016.07.012.
- Adams, M.E. 2004. Agatoxins: Ion channel specific toxins from the american funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Toxicon*. 43:509–525. doi:10.1016/j.toxicon.2004.02.004.
- Agwa, A.J., Y.H. Huang, D.J. Craik, S.T. Henriques, and C.I. Schroeder. 2017. Lengths of the C-terminus and interconnecting loops impact stability of spider-derived gating modifier toxins. *Toxins (Basel)*. 9:1–15. doi:10.3390/toxins9080248.
- Agwa, A.J., S. Peigneur, C.Y. Chow, N. Lawrence, D.J. Craik, J. Tytgat, G.F. King, S.T. Henriques, and C.I. Schroeder. 2018. Gating modifier toxins isolated from spider venom: Modulation of voltage-gated sodium channels and the role of lipid membranes. *J. Biol. Chem*. 293:9041–9052. doi:10.1074/jbc.RA118.002553.
- Ahern, C.A., J. Payandeh, F. Bosmans, and B. Chanda. 2016. The hitchhiker’s guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *J. Gen. Physiol.* 147:1–24. doi:10.1085/jgp.201511492.
- Alexander, S.P., W.A. Catterall, E. Kelly, N. Marrion, J.A. Peters, H.E. Benson, E. Faccenda, A.J. Pawson, J.L. Sharman, C. Southan, J.A. Davies, and C. Collaborators. 2015. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Voltage-gated ion channels. *Br. J. Pharmacol.* 16:5904–5941. doi:10.1111/bph.13349/full.
- Bemporad, D., Z.A. Sands, C.L. Wee, A. Grottesi, and M.S.P. Sansom. 2006. Vstx1, a modifier of Kv channel gating, localizes to the interfacial region of lipid bilayers. *Biochemistry*. 45:11844–11855. doi:10.1021/bi061111z.
- Beneski, D.A., and W.A. Catterall. 1980. Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:639–643. doi:10.1073/pnas.77.1.639.
- Black, J.L. 2003. The Voltage-Gated Calcium Channel γ Subunits: A Review of the Literature. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35:649–660. doi:10.1023/B:JOB.0000008029.22650.c5.
- Bourinet, E., T.W. Soong, K. Sutton, S. Slaymaker, E. Mathews, A. Monteil, G.W. Zamponi,

- J. Nargeot, and T.P. Snutch. 1999. Splicing of $\alpha 1A$ subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat. Neurosci.* 2:407–415. doi:10.1038/8070.
- Bouza, A.A., and L.L. Isom. 2018. Voltage-Gated Sodium Channel β Subunits and Their Related Diseases. *In Handbook of experimental pharmacology.* 423–450.
- Cao, Y.Q., and R.W. Tsien. 2005. Effects of familial hemiplegic migraine type 1 mutations on neuronal P/Q-type Ca^{2+} channel activity and inhibitory synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:2590–2595. doi:10.1073/pnas.0409896102.
- Capes, D.L., M.P. Goldschen-Ohm, M. Arcisio-Miranda, F. Bezanilla, and B. Chanda. 2013. Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels. *J. Gen. Physiol.* 142:101–112. doi:10.1085/jgp.201310998.
- Catterall, W.A. 2000. Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:521–555. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.521.
- Catterall, W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:1–23. doi:10.1101/cshperspect.a003947.
- Catterall, W.A. 2017. Forty Years of Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Epilepsy. *Neurochem. Res.* 42:2495–2504. doi:10.1007/s11064-017-2314-9.
- Catterall, W.A., S. Cestèle, V. Yarovoy, F.H. Yu, K. Konoki, and Scheuer. 2007. Voltage-gated ion channel sand gating modifier toxins. *Toxicon.* 49:124–141.
- Catterall, W.A., and A.P. Few. 2008. Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity. *Neuron.* 59:882–901. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.005.
- Catterall, W.A., and T.M. Swanson. 2015. Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Mol. Pharmacol.* 88:141–150. doi:10.1124/mol.114.097659.
- Catterall, W.A., G. Wisedchaisri, and N. Zheng. 2017. The chemical basis for electrical signaling. *Nat. Chem. Biol.* 13:455–463. doi:10.1038/nchembio.2353.
- Cestèle, S., and W.A. Catterall. 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie.* 82:883–892. doi:10.1016/S0300-9084(00)01174-3.
- Cestèle, S., Y. Qu, J.C. Rogers, H. Rochat, T. Scheuer, and W.A. Catterall. 1998. Voltage

- sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron*. 21:919–31. doi:10.1016/S0896-6273(00)80606-6.
- Clairfeuille, T., A. Cloake, D.T. Infield, J.P. Llongueras, C.P. Arthur, Z.R. Li, Y. Jian, M.-F. Martin-Eauclaire, P.E. Bougis, C. Ciferri, C.A. Ahern, F. Bosmans, D.H. Hackos, A. Rohou, and J. Payandeh. 2019. Structural basis of α -scorpion toxin action on Nav channels. *Science*. 363:1–25. doi:10.1126/science.aav8573.
- Correnti, C.E., M.M. Gewe, C. Mehlin, A.D. Bandaranayake, W.A. Johnsen, P.B. Rupert, M.Y. Brusniak, M. Clarke, S.E. Burke, W. De Van Der Schueren, K. Pilat, S.M. Turnbaugh, D. May, A. Watson, M.K. Chan, C.D. Bahl, J.M. Olson, and R.K. Strong. 2018. Screening, large-scale production and structure-based classification of cystine-dense peptides. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25:270–278. doi:10.1038/s41594-018-0033-9.
- Corzo, G., E. Diego-García, H. Clement, S. Peigneur, G. Odell, J. Tytgat, L.D. Possani, and A. Alagón. 2008. An insecticidal peptide from the therapsid *Brachypelma smithi* spider venom reveals common molecular features among spider species from different genera. *Peptides*. 29:1901–1908. doi:10.1016/j.peptides.2008.07.003.
- Corzo, G., and P. Escoubas. 2003. Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:2409–2426. doi:10.1007/s00018-003-3108-6.
- Corzo, G., P. Escoubas, M. Stankiewicz, M. Pelhate, C.P. Kristensen, and T. Nakajima. 2000. Isolation, synthesis and pharmacological characterization of δ -palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). *Eur. J. Biochem.* 267:5783–5795. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01653.x.
- Delgado-Prudencio, G., L.D. Possani, B. Becerril, and E. Ortiz. 2019. The Dual α -Amidation System in Scorpion Venom Glands. *Toxins (Basel)*. 11:425. doi:10.3390/toxins11070425.
- Deuis, J.R., Z. Dekan, J.S. Wingerd, J.J. Smith, N.R. Munasinghe, R.F. Bholá, W.L. Imlach, V. Herzig, D.A. Armstrong, K.J. Rosengren, F. Bosmans, S.G. Waxman, S.D. Dib-Hajj, P. Escoubas, M.S. Minett, M.J. Christie, G.F. King, P.F. Alewood, R.J. Lewis, J.N. Wood, and I. Vetter. 2017. Pharmacological characterisation of the highly Nav 1.7 selective spider venom peptide Pn3a. *Sci. Rep.* 7:40883. doi:10.1038/srep40883.
- Diochot, S., M.D. Drici, D. Moinier, M. Fink, and M. Lazdunski. 1999. Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito_j in cardiac

- electrogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 126:251–263. doi:10.1038/sj.bjp.0702283.
- Dolphin, A.C. 2003. β Subunits of Voltage-Gated Calcium Channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35. doi:10.1023/b:jobb.0000008026.37790.5a.
- Dolphin, A.C. 2016. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J. Physiol.* 594:5369–5390. doi:10.1113/JP272262.
- Dolphin, A.C. 2018. Voltage-gated calcium channel $\alpha 2 \delta$ subunits : an assessment of proposed novel roles. *f1000Research.* 7:1–14. doi:10.12688/f1000research.16104.1.
- Dongol, Y., F.C. Cardoso, and R.J. Lewis. 2019. Spider Knottin Pharmacology at Voltage-Gated Sodium Channels and Their Potential to Modulate Pain Pathways.
- Du, Y., Y. Nomura, B.S. Zhorov, and K. Dong. 2016. Sodium channel mutations and pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *Insects.* 7:1–11. doi:10.3390/insects7040060.
- Escoubas, P., and L. Rash. 2004. Tarantulas: Eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon.* 43:555–574. doi:10.1016/j.toxicon.2004.02.007.
- Garcia, A.B. 2018. Busca pelo alvo molecular do peptídeo Ap1a isolado da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*. Universidade de Brasília. 95 pp.
- Gilchrist, J., S. Das, F. Van Petegem, and F. Bosmans. 2013. Crystallographic insights into sodium-channel modulation by the $\alpha 4$ subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110:E5016–E5024. doi:10.1073/pnas.1314557110.
- Goldschen-Ohm, M.P., D.L. Capes, K.M. Oelstrom, and B. Chanda. 2013. Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. *Nat. Commun.* 4:1350. doi:10.1038/ncomms2356.
- Herrington, J. 2007. Gating modifier peptides as probes of pancreatic β -cell physiology. *Toxicon.* 49:231–238. doi:10.1016/j.toxicon.2006.09.012.
- Herrington, J., Y.P. Zhou, R.M. Bugianesi, P.M. Dulski, Y. Feng, V.A. Warren, M.M. Smith, M.G. Kohler, V.M. Garsky, M. Sanchez, M. Wagner, K. Raphaelli, P. Banerjee, C. Ahaghotu, D. Wunderler, B.T. Priest, J.T. Mehl, M.L. Garcia, O.B. McManus, G.J. Kaczorowski, and R.S. Slaughter. 2006. Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic β -cells enhance glucose-dependent insulin secretion. *Diabetes.*

55:1034–1042. doi:10.2337/diabetes.55.04.06.db05-0788.

- Hess, P., J.B. Lansman, and R.W. Tsien. 1986. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations: Voltage and Concentration Dependence of Single Channel Current in Ventricular Heart Cells. *J. Gen. Physiol.* 88:293–319. doi:10.1085/jgp.88.3.293.
- Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, third edition (Sunderland: sinauer associates).
- Hodgkin, A.L., and A.F. Huxley. 1939. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature.* 144:710–711. doi:10.1038/144710a0.
- Hodgkin, A.L., and A.F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. 500–544.
- Hoi, J.J., Y.L. Ju, H.K. Su, Y.J. Eu, Y.S. Song, M. Milescu, K.J. Swartz, and I.K. Jae. 2005. Solution structure and lipid membrane partitioning of VSTx1, an inhibitor of the KvAP potassium channel. *Biochemistry.* 44:6015–6023. doi:10.1021/bi0477034.
- Jiang, D., H. Shi, L. Tonggu, T.M. Gamal El-Din, M.J. Lenaeus, Y. Zhao, C. Yoshioka, N. Zheng, and W.A. Catterall. 2020. Structure of the Cardiac Sodium Channel. *Cell.* 180:122-134.e10. doi:10.1016/j.cell.2019.11.041.
- King, G.F., M.C. Gentz, P. Escoubas, and G.M. Nicholson. 2008. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon.* 52:264–276. doi:10.1016/j.toxicon.2008.05.020.
- King, G.F., H.W. Tedford, and F. Maggio. 2002. STRUCTURE AND FUNCTION OF INSECTICIDAL NEUROTOXINS FROM AUSTRALIAN FUNNEL-WEB SPIDERS. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 21:361–389. doi:10.1081/TXR-120014409.
- Kozlov, S., A. Malyavka, B. McCutchen, A. Lu, E. Schepers, R. Herrmann, and E. Grishin. 2005. A novel strategy for the identification of toxinlike structures in spider venom. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 59:131–140. doi:10.1002/prot.20390.
- Kuhn-Nentwig, L. 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:2651–2668. doi:10.1007/s00018-003-3106-8.
- Kuhn-Nentwig, L., R. Stöcklin, and W. Nentwig. 2011. Venom Composition and Strategies in Spiders. *In Advances in Insect Physiology.* 1–86.

- Kwong, K., and M.J. Carr. 2015. Voltage-gated sodium channels. *Curr. Opin. Pharmacol.* 22:131–139. doi:10.1016/j.coph.2015.04.007.
- Lacroix, J.Ô.J., F. V. Campos, L. Frezza, and F. Bezanilla. 2013. Molecular bases for the asynchronous activation of sodium and potassium channels required for nerve impulse generation. *Neuron.* 79:651–657. doi:10.1016/j.neuron.2013.05.036.
- Langenegger, N., W. Nentwig, and L. Kuhn-Nentwig. 2019. Spider Venom: Components, Modes of Action, and Novel Strategies in Transcriptomic and Proteomic Analyses. *Toxins (Basel).* 11. doi:10.3390/toxins11100611.
- Leão, R.M., J.S. Cruz, C.R. Diniz, M.N. Cordeiro, and P.S. Beirão. 2000. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-phoneutria nigriverter Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology.* 39:1756–67. doi:10.1016/s0028-3908(99)00267-1.
- Lewis, R.J., K.J. Nielsen, D.J. Craik, M.L. Loughnan, D.A. Adams, I.A. Sharpe, T. Luchian, D.J. Adams, T. Bond, L. Thomas, A. Jones, J. Matheson, R. Drinkwater, P.R. Andrews, and P.F. Alewood. 2000. Novel ω -Conotoxins from *Conus catus* Discriminate among Neuronal Calcium Channel Subtypes *. *J. Biol. Chem.* 275:35335–35344. doi:10.1074/jbc.M002252200.
- Liao, Z., C. Yuan, K. Peng, Y. Xiao, and S. Liang. 2007. Solution structure of Jingzhaotoxin-III, a peptide toxin inhibiting both Nav1.5 and Kv2.1 channels. *Toxicon.* 50:135–143. doi:10.1016/j.toxicon.2007.03.006.
- Lima, M.E. de. 2009. Animal Toxins: State of the Art. Perspective in Health and Biotechnology. First. Editora UFMG. 750 pp.
- Lipscombe, D. 2004. L-Type Calcium Channels: The Low Down. *J. Neurophysiol.* 92:2633–2641. doi:10.1152/jn.00486.2004.
- Lipscombe, D., and A. Andrade. 2015. Splice Isoforms - Tissue Specificity and Drug. *Curr. Mol. Pharmacol.* 8:22–31. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0359.Nrf2-dependent.
- Liu, Z., J. Dai, L. Dai, M. Deng, Z. Hu, W. Hu, and S. Liang. 2006. Function and solution structure of huwentoxin-X, a specific blocker of N-type calcium channels, from the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*. *J. Biol. Chem.* 281:8628–8635. doi:10.1074/jbc.M513542200.

- Lucas, S.M., F. dos S. Paula, H.M.O. Gonzalez Filho, and A.D. Brescovit. 2010. Redescription and new distribution records of *Acanthoscurria paulensis* (Araneae: Mygalomorphae: Theraphosidae). *Zool.* 27:563–568. doi:10.1590/S1984-46702010000400008.
- Lukowski, A.L., and A.R.H. Narayan. 2019. Natural Voltage-Gated Sodium Channel Ligands: Biosynthesis and Biology. *Chembiochem.* doi:10.1002/cbic.201800754.
- Malli, H., L. Kuhn-Nentwig, H. Imboden, M.-J. Moon, and T. Wyler. 2000. Immunocytochemical localization and secretion process of the toxin CSTX-1 in the venom gland of the wandering spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Cell Tissue Res.* 299:417–426. doi:10.1007/s004419900141.
- Manzoli-Palma, M.D.F., N. Gobbi, and M.S. Palma. 2006. The chelation of metal ions by the acylpolyamine toxins from the web-spider *Nephilengys cruentata*: Effects in the intoxication/detoxification of preys. *Chemoecology.* 16:203–208. doi:10.1007/s00049-006-0348-6.
- Mcdonough, S., I.M. Mintz, and B.P. Bean. 1997. Alteration of P-Type Calcium Channel Gating by the Spider Toxin Voltage dependence. *Biophys. J.* 72:2117–2128. doi:10.1016/S0006-3495(97)78854-4.
- Mello-Leitão, C.F. 1923. Theraphosoideas do Brasil. *Revisa do Meuseu Paul.* 13:1–438.
- Mellor, I.R., and P.N.R. Usherwood. 2004. Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins. *Toxicon.* 43:493–508. doi:10.1016/j.toxicon.2004.02.003.
- Middleton, R.E., V.A. Warren, R.L. Kraus, J.C. Hwang, C.J. Liu, G. Dai, R.M. Brochu, M.G. Kohler, Y. Gao, V.M. Garsky, M.J. Bogusky, J.T. Mehl, C.J. Cohen, and M.M. Smith. 2002. Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. *Biochemistry.* 41:14734–47. doi:10.1021/bi026546a.
- Monera, O.D., T.J. Sereda, N.E. Zhou, C.M. Kay, and R.S. Hodges. 1995. Relationship of sidechain hydrophobicity and α -helical propensity on the stability of the single-stranded amphipathic α -helix. *J. Pept. Sci.* 1:319–329. doi:10.1002/psc.310010507.
- Mourão, C.B.F., M.D. Heghinian, E.A. Barbosa, F. Marí, C. Bloch, R. Restano-Cassulini, L.D. Possani, and E.F. Schwartz. 2013a. Characterization of a novel peptide toxin from *Acanthoscurria paulensis* spider venom: A distinct cysteine assignment to the HWTX-II family. *Biochemistry.* 52:2440–2452. doi:10.1021/bi4000035.

- Mourão, C.B.F., F.N. Oliveira, A.C. E Carvalho, C.J. Arenas, H.M. Duque, J.C. Gonçalves, J.K.A. Macêdo, P. Galante, C.A. Schwartz, M.R. Mortari, M. de F.M. Almeida Santos, and E.F. Schwartz. 2013b. Venomic and pharmacological activity of *Acanthoscurria paulensis* (Theraphosidae) spider venom. *Toxicon*. 61:129–138. doi:10.1016/j.toxicon.2012.11.008.
- Natural History Museum Bern. 2020. World Spider Catalog Version 21.0. *Nat. Hist. Museum Bern*. doi:10.24436/2.
- Newcomb, R., B. Szoke, A. Palma, G. Wang, X.H. Chen, W. Hopkins, R. Cong, J. Miller, L. Urge, K. Tarczy-Hornoch, J.A. Loo, D.J. Dooley, L. Nadasdi, R.W. Tsien, J. Lemos, and G. Miljanich. 1998. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry*. 37:15353–15362. doi:10.1021/bi981255g.
- Nimmrich, V., and G. Gross. 2012. P/Q-type calcium channel modulators. *Br. J. Pharmacol.* 167:741–759. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02069.x.
- Norton, R.S., and P.K. Pallaghy. 1998. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon*. 36:1573–1583. doi:10.1016/S0041-0101(98)00149-4.
- Omecinsky, D.O., K.E. Holub, M.E. Adams, and M.D. Reily. 1996. Three-dimensional structure analysis of μ -agatoxins: Further evidence for common motifs among neurotoxins with diverse ion channel specificities. *Biochemistry*. 35:2836–2844. doi:10.1021/bi952605r.
- Page, K.M., S.W. Rothwell, and A.C. Dolphin. 2016. The CaV β subunit protects the I-II loop of the voltage-gated calcium channel CaV2.2 from proteasomal degradation but not oligoubiquitination. *J. Biol. Chem.* 291:20402–20416. doi:10.1074/jbc.M116.737270.
- Pallaghy, P.K., R.S. Norton, K.J. Nielsen, and D.J. Craik. 1994. A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded β -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci.* 3:1833–1839. doi:10.1002/pro.5560031022.
- Payandeh, J., T. Scheuer, N. Zheng, and W.A. Catterall. 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*. 475:353–359. doi:10.1038/nature10238.
- Pennington, M.W., A. Czerwinski, and R.S. Norton. 2018. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic Med. Chem.* 26:2738–2758.

doi:10.1016/j.bmc.2017.09.029.

- Piccolino, M. 1998. Animal electricity and the birth of electrophysiology: The legacy of Luigi Galvani. *Brain Res. Bull.* 46:381–407. doi:10.1016/S0361-9230(98)00026-4.
- Piccolino, M., and N.J. Wade. 2012. Carlo Matteucci (1811-1868), the “frogs pile”, and the Risorgimento of electrophysiology. *Cortex.* 48:645–646. doi:10.1016/j.cortex.2011.08.002.
- Poncer, J.C., R.A. McKinney, B.H. Gähwiler, and S.M. Thompson. 1997. Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. *Neuron.* 18:463–472. doi:10.1016/S0896-6273(00)81246-5.
- Raghavan, M., D. Fee, and P.E. Barkhaus. 2019. Generation and propagation of the action potential. *In Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V. 3–22.
- Ramírez, D., W. Gonzalez, R.A. Fissore, and I. Carvacho. 2017. Conotoxins as tools to understand the physiological function of voltage-gated calcium (CaV) channels. *Mar. Drugs.* 15:1–13. doi:10.3390/md15100313.
- Rash, L.D., and W.C. Hodgson. 2002. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon.* 40:225–254. doi:10.1016/S0041-0101(01)00199-4.
- Redaelli, E., R.R. Cassulini, D.F. Silva, H. Clement, E. Schiavon, F.Z. Zamudio, G. Odell, A. Arcangeli, J.J. Clare, A. Alago, R.C. Rodríguez De La Vega, L.D. Possani, and E. Wanke. 2010. Target promiscuity and heterogeneous effects of tarantula venom peptides affecting Na⁺ and K⁺ ion channels. *J. Biol. Chem.* 285:4130–4142. doi:10.1074/jbc.M109.054718.
- Reily, D., and P. Bean. 1993. Structure and Properties of ω -Agatoxin P-Type Calcium Channels IVB , a New Antagonist of. *Mol. Pharmacol.* 44:681–688.
- Revell, J.D., P.E. Lund, J.E. Linley, J. Metcalfe, N. Burmeister, S. Sridharan, C. Jones, L. Jermutus, and M.A. Bednarek. 2013. Potency optimization of Huwentoxin-IV on hNav1.7: A neurotoxin TTX-S sodium-channel antagonist from the venom of the Chinese bird-eating spider *Selenocosmia huwena*. *Peptides.* 44:40–46. doi:10.1016/j.peptides.2013.03.011.
- Richards, K.S., A.M. Swensen, D. Lipscombe, and K. Bommert. 2007. Novel CaV2.1 clone replicates many properties of Purkinje cell CaV2.1 current. *Eur. J. Neurosci.* 26:2950–

2961. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05912.x.
- Ruta, V., and R. MacKinnon. 2004. Localization of the voltage-sensor toxin receptor on KvAP. *Biochemistry*. 43:10071–10079. doi:10.1021/bi049463y.
- Satake, S., and K. Imoto. 2014. Cav2.1 channels control multivesicular release by relying on their distance from exocytotic Ca²⁺ sensors at rat cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 34:1462–1474. doi:10.1523/JNEUROSCI.2388-13.2014.
- Schmalhofer, W.A., K.S. Ratliff, A. Weinglass, J. Gregory, M.L. Garcia, J. Herrington, W.A. Schmalhofer, K.S. Ratliff, A. Weinglass, J. Gregory, M.L. Garcia, J. Herrington, A.K. V, W.A. Schmalhofer, K.S. Ratliff, A.B. Weinglass, and G.J. Kaczorowski. 2009. A Kv 2.1 gating modifier binding assay suitable for high throughput screening. *Channels*. 6950. doi:https://doi.org/10.4161/chan.3.6.10201.
- Schwiening, C.J. 2012. A brief historical perspective: Hodgkin and Huxley. *J. Physiol.* 590:2571–2575. doi:10.1113/jphysiol.2012.230458.
- Shen, H., Q. Zhou, X. Pan, Z. Li, J. Wu, and N. Yan. 2017. Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution. *Science* (80-.). 355. doi:10.1126/science.aal4326.
- Simms, B.A., and G.W. Zamponi. 2014. Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron*. 82:24–45. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.016.
- Springer. 2013. *Ion Channels, Methods and Protocols*. Second Edition. Second. N. Gamper, editor. 430 pp.
- Tang, X., Y. Zhang, W. Hu, D. Xu, H. Tao, X. Yang, Y. Li, L. Jiang, and S. Liang. 2010. Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses. *J. Proteome Res.* 9:2550–2564. doi:10.1021/pr1000016.
- Vassilevski, A.A., S.A. Kozlov, and E. V. Grishin. 2009. Molecular diversity of spider venom. *Biochem.* 74:1505–1534. doi:10.1134/S0006297909130069.
- Wang, R.L., S. Yi, and S.P. Liang. 2010. Mechanism of action of two insect toxins huwentoxin-III and hainantoxin-VI on voltage-gated sodium channels. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 11:451–457. doi:10.1631/jzus.B0900393.

- Wang, X., M. Connor, D. Wilson, H.I. Wilson, G.M. Nicholson, D. Shaw, J.P. Mackay, F. Paul, M.J. Christie, F. Glenn, X. Wang, M. Connor, D. Wilson, H.I. Wilson, G.M. Nicholson, R. Smith, D. Shaw, J.P. Mackay, P.F. Alewood, M.J. Christie, and G.F. King. 2001. Discovery and Structure of a Potent and Highly Specific Blocker of Insect Calcium Channels Discovery and Structure of a Potent and Highly Specific Blocker of Insect Calcium Channels *. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M105206200.
- Wang, X.H., M. Connor, R. Smith, M.W. Maciejewski, M.E.H. Howden, G.M. Nicholson, M.J. Christie, and G.F. King. 2000. Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. *Nat. Struct. Biol.* 7:505–513. doi:10.1038/75921.
- Windley, M.J., V. Herzig, S.A. Dziemborowicz, M.C. Hardy, G.F. King, and G.M. Nicholson. 2012. Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins (Basel)*. 4:191–227. doi:10.3390/toxins4030191.
- Winterfield, J.R., and K.J. Swartz. 2000. A hot spot for the interaction of gating modifier toxins with voltage-dependent ion channels. *J. Gen. Physiol.* 116:637–644. doi:10.1085/jgp.116.5.637.
- Wu, J., Z. Yan, Z. Li, C. Yan, S. Lu, M. Dong, and N. Yan. 2015. Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science*. 350:aad2395. doi:10.1126/science.aad2395.
- Xiao, Y., J.P. Bingham, W. Zhu, E. Moczydlowski, S. Liang, and T.R. Cummins. 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. *J. Biol. Chem.* 283:27300–27313. doi:10.1074/jbc.M708447200.
- Xiao, Y., J. Tang, W. Hu, J. Xie, C. Maertens, J. Tytgat, and S. Liang. 2005. Jingzhaotoxin-I, a novel spider neurotoxin preferentially inhibiting cardiac sodium channel inactivation. *J. Biol. Chem.* 280:12069–12076. doi:10.1074/jbc.M411651200.
- Xiao, Y., J. Tang, Y. Yang, M. Wang, W. Hu, J. Xie, X. Zeng, and S. Liang. 2004. Jingzhaotoxin-III, a novel spider toxin inhibiting activation of voltage-gated sodium channel in rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 279:26220–26226. doi:10.1074/jbc.M401387200.
- Xu, H., T. Li, A. Rohou, D.H. Hackos, C.M. Koth, H. Xu, T. Li, A. Rohou, C.P. Arthur, F.

- Tzakoniati, E. Wong, A. Estevez, C. Kugel, Y. Franke, J. Chen, C. Ciferri, D.H. Hackos, C.M. Koth, and J. Payandeh. 2019. Structural Basis of Nav1 . 7 Inhibition by a Gating-Modifier Spider Toxin. *Cell*. 176:702-715.e14. doi:10.1016/j.cell.2018.12.018.
- Yan, Z., Q. Zhou, L. Wang, J. Wu, Y. Zhao, G. Huang, W. Peng, H. Shen, J. Lei, and N. Yan. 2017. Structure of the Nav1.4- β 1 Complex from Electric Eel. *Cell*. 170:470-482.e11. doi:10.1016/j.cell.2017.06.039.
- Yu, F.H. 2005. Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacol. Rev.* 57:387–395. doi:10.1124/pr.57.4.13.
- Yu, F.H., and W.A. Catterall. 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 4:207. doi:10.1186/gb-2003-4-3-207.
- Yuan, C., S. Yang, Z. Liao, and S. Liang. 2007. Effects and mechanism of Chinese Tarantula Toxins on the Kv2.1 potassium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352:799–804. doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.086.
- Yuan, C.H., Q.Y. He, K. Peng, J.B. Diao, L.P. Jiang, X. Tang, and S.P. Liang. 2008. Discovery of a distinct superfamily of kunitz-type toxin (KTT) from Tarantulas. *PLoS One*. 3. doi:10.1371/journal.pone.0003414.
- Zamponi, G.W., P. Lory, and E. Perez-Reyes. 2010. Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 460:395–403. doi:10.1007/s00424-009-0772-x.
- Zamponi, G.W., and D. Ph. 2005. Voltage-Gated Calcium Channels. Springer US, Boston, MA.
- Zhang, Y.Y., Y. Huang, Q.Z. He, J. Luo, L. Zhu, S.S. Lu, J.Y. Liu, P.F. Huang, X.Z. Zeng, and S.P. Liang. 2015. Structural and functional diversity of peptide toxins from tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom revealed by transcriptomic, peptidomic, and patch clamp approaches. *J. Biol. Chem.* 290:14192–14207. doi:10.1074/jbc.M114.635458.
- Zhao, Y., G. Huang, Q. Wu, K. Wu, R. Li, J. Lei, X. Pan, and N. Yan. 2019. Cryo-EM structures of apo and antagonist-bound human Cav3.1. *Nature*. 576:492–497. doi:10.1038/s41586-019-1801-3.
- Zilberberg, N., O. Froy, E. Loret, S. Cestele, D. Arad, D. Gordon, and M. Gurevitz. 1997. Identification of structural elements of a scorpion alpha-neurotoxin important for receptor

site recognition. *J. Biol. Chem.* 272:14810–6.