



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Avaliação dos efeitos da toxina peptídica Ap6 de *Acanthoscurria paulensis* sobre a
condutância de canais de potássio dependentes de voltagem**

Autor: Rodrigo Barbosa Seraine

Brasília - DF
Março, 2024

Agradecimentos

Gostaria de iniciar os agradecimentos à minha família que me apoiou e me deu condições de me dedicar exclusivamente a pesquisa.

Agradeço os meus amigos que estiveram do meu lado em momentos importantes e me deram apoio emocional para seguir em frente. Em especial, agradeço aos amigos Pedro Luminati, Bruna Neves e Amanda Amaral. Com certeza a presença deles fez minha trajetória mais tranquila.

Agradeço à minha orientadora Dra. Elisabeth Ferroni pela oportunidade de trabalhar nesse laboratório e pelo conhecimento que adquiri ao longo desse processo e pela orientação que recebi para prosseguir com o projeto.

Agradeço aos colegas de laboratório, Diogo Tibery, Jonathan Nascimento, Luis Felipe Menezes, Israel Araújo e Adolfo Carlos Barros por toda ajuda e conhecimento para o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço ao programa de Pós graduação em Biologia Molecular pela oportunidade e pela agência de fomento CAPES pelo apoio financeiro concedido no período desse projeto.

Resumo

Canais iônicos são proteínas transmembranares que possuem propriedades como o movimento de abertura e fechamento mediado por sinais elétricos, químicos ou mecânicos, e a condução de íons através da membrana. Os canais de potássio atuam na regulação da excitabilidade celular e podem sofrer modulações em seus padrões de respostas na presença de toxinas peptídicas provenientes de peçonhas de diversos animais, entre os quais os artrópodes. As peçonhas de aranhas são amplamente estudadas devido à sua complexa mistura de moléculas bioativas capazes de modular ou inibir canais iônicos, possuindo atividade membranolítica, entre outras propriedades de alto interesse farmacológico. Compostos de interesse farmacológico possuem estruturas que indicam atividade biológica, tal qual o motivo estrutural ICK, caracterizado por uma sequência específica de cisteínas e pontes dissulfeto. Ap6 tem 31 resíduos de aminoácidos que foi previamente encontrado na peçonha de *Acanthoscurria paulensis* e que teve o efeito avaliado sobre os canais NaV 1.1, NaV 1.5, NaV 1.7, CaV 1.2, CaV 2.1 e CaV 2.2 na concentração de 1 μ M. Dentre esses canais iônicos, Ap6 apresentou atividade somente nos canais CaV 2.1, levando à sua classificação como uma ômega-toxina. Uma vez que a Ap6 apresenta similaridade de sequência com outros peptídeos de aranhas Theraphosidae que apresentaram atividade em canais de potássio e considerando que é comum para tais peptídeos apresentarem promiscuidade quanto ao alvo molecular, o presente trabalho teve como objetivo aferir sua capacidade de modulação ou bloqueio em canais KV 1.1, KV 1.2, KV 1.3 e KV 3.1. O peptídeo Ap6 foi purificado a partir da peçonha da aranha *Acanthoscurria paulensis* por meio de duas etapas de cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC). Por espectrometria de massa do tipo MALDI-ToF, foi possível confirmar o grau de pureza e a massa molecular monoisotópica experimental de 3717,9 Da. A atividade sobre canais de K⁺ foi avaliada por meio da técnica de *patch-clamp* no modo *whole-cell*. Foram utilizadas células HEK 293T que expressavam canais KV 1.1 e KV 1.2 e células L292 expressando canais KV 1.3 e KV 3.1 e a Ap6 foi usada a uma concentração de 500 nM. Nas condições experimentais, Ap6 não apresentou capacidade de modificar as correntes de potássio nos canais estudados. Apesar da análise de similaridade de sequências e do arranjo estrutural no motivo ICK indicarem possível atuação em canais de potássio e, portanto, uma possível classificação como kappa-toxinas, a Ap6 não foi capaz de modificar a condutância dos canais KV 1.1, KV 1.2, KV 1.3 e KV 3.1. Desta forma, sugere-se que mais testes sejam realizados, principalmente em KV 2.1 e que a Ap6 siga sendo classificada, por hora, como uma ômega-toxina.

Abstract

Ionic channels are transmembrane proteins that exhibit properties such as opening and closing movements mediated by electrical, chemical, or mechanical signals, and the conduction of ions across the membrane. Potassium channels play a role in the regulation of cellular excitability and may undergo modulation in their response patterns in the presence of peptidic toxins from the venom of various animals, including arthropods. Spider venoms are extensively studied due to their complex mixture of bioactive molecules capable of modulating or inhibiting ionic channels, possessing membranolytic activity among other pharmacologically relevant properties. Pharmacologically interesting compounds have structures indicating biological activity, such as the structural motif ICK, characterized by a specific sequence of cysteines and disulfide bridges. Ap6 is a 31-amino acid residue peptide previously found in the venom of *Acanthoscurria paulensis* and had its effect evaluated on NaV 1.1, NaV 1.5, NaV 1.7, CaV 1.2, CaV 2.1, and CaV 2.2 channels at a concentration of 1 μ M. Among these ionic channels, Ap6 showed activity only on CaV 2.1 channels, leading to its classification as an omega-toxin. Since Ap6 exhibits sequence similarity with other peptides from Theraphosidae spiders that have shown activity on potassium channels, and considering that it is common for such peptides to exhibit molecular target promiscuity, this study aimed to assess its modulation or blocking capability on KV 1.1, KV 1.2, KV 1.3, and KV 3.1 channels. The Ap6 peptide was purified from the venom of *Acanthoscurria paulensis* through two stages of reverse-phase liquid chromatography (RP-HPLC). MALDI-ToF mass spectrometry confirmed the degree of purity and the experimental monoisotopic molecular mass of 3717.9 Da. The activity on K⁺ channels was evaluated using the patch-clamp technique in whole-cell mode. HEK 293T cells expressing KV 1.1 and KV 1.2 channels and L292 cells expressing KV 1.3 and KV 3.1 channels were used, and Ap6 was applied at a concentration of 500 nM. Under experimental conditions, Ap6 did not show the ability to modify potassium currents in the studied channels. Despite the sequence similarity analysis and structural arrangement in the ICK motif indicating possible activity on potassium channels and, therefore, a possible classification as kappa-toxins, Ap6 was not able to modify the conductance of KV 1.1, KV 1.2, KV 1.3, and KV 3.1 channels. Thus, it is suggested that further tests be conducted, primarily on KV 2.1, and that Ap6 continues to be classified, for now, as an omega-toxin.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Espécime de <i>Acanthoscurria paulensis</i>	10
Figura 2 - Estrutura de uma acilpoliamina.....	11
Figura 3 - Representação esquemática do motivo estrutural ICK.....	12
Figura 4 - Árvore filogenética dos canais de K ⁺	17
Figura 5 - Representação esquemática da subunidade α do canal KV.....	18
Figura 6 - Alinhamento de peptídeos da peçonha com atividade em canais KV de diversas espécies de aranhas.....	20
Figura 7 - Representação dos protocolos de <i>patch clamp</i>	30
Figura 8 - Cromatograma da peçonha bruta <i>A. paulensis</i> por RP-HPLC.....	32
Figura 9 - Cromatograma da purificação do peptídeo Ap6.....	33
Figura 10 - Espectro de massas do peptídeo Ap6.....	34
Figura 11 - Alinhamento dos peptídeos JxTx3 (P62520), GxTx-1E (P84835), Ap6 e VsTx1 (P60980).....	35
Figura 12 - Alinhamento dos peptídeos Ap6 e VSTX1.....	35
Figura 13 - Alinhamento dos peptídeos GxTx-1E e Ap6.....	36
Figura 14 - Alinhamento dos peptídeos JzTx3 e Ap6.....	36
Figura 15 - Modelos em 3D das toxinas Ap6, VSTX1, GXTX-1E e JZTX3.....	37
Figura 16 - Caracterização eletrofisiológica em canais KV 1.1 com o Peptídeo Ap6.....	38
Figura 17 - Caracterização eletrofisiológica em canais KV 1.2 com o Peptídeo Ap6.....	39
Figura 18 - Caracterização eletrofisiológica em canais KV 1.3 com o Peptídeo Ap6.....	40
Figura 19 - Caracterização eletrofisiológica em canais KV 3.1 com o Peptídeo Ap6.....	41
Figura 20 - Alinhamento do VSD dos canais KVAP e dos canais da família <i>Shaker</i> (KV 1).....	42

Lista de tabelas

Tabela 1 – Nomenclatura de toxinas baseada na função farmacológica.....	14
Tabela 2 - Comparativo das toxinas isoladas de <i>Acanthoscurria paulensis</i> entre os canais testados e os canais que apresentaram atividade.....	23
Tabela 3 - Relação entre o tempo e o gradiente de acetonitrila na primeira etapa de cromatografia.....	27
Tabela 4 - Relação entre o tempo e o gradiente de acetonitrila na segunda etapa de cromatografia.....	27
Tabela 5 - Relação das porcentagens de cada componente para produção de meio para crescimento de células HEK e L929.....	29
Tabela 6 - Composição das soluções intracelular e extracelular em mM.....	30
Tabela 7 - Valores das médias da porcentagem de inibição (%) em canais KV.....	40

Lista de siglas e abreviações

ABS: Absorbância

ACN: Acetonitrila

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

Da: Daltons

DDH: *Disulfide-directed β -hairpin*

HEK: Células embrionárias de rim humano

ICK: *Inhibitory Cystine Knot*

TFA: Ácido trifluoroacético

NaV: Canal de sódio dependente de voltagem

CaV: Canal de cálcio dependente de voltagem

KV: Canal de potássio dependente de voltagem

VSD: *Voltage sensor domain*

Sumário

Introdução.....	9
Aranhas Caranguejeiras.....	9
<i>Acanthoscurria paulensis</i>	9
Composição bioquímica das peçonhas.....	10
Acilpoliaminas.....	10
Peptídeos citolíticos.....	11
Peptídeos neuroativos.....	12
Nomenclatura para toxinas peptídicas.....	14
Canais iônicos e potencial de ação.....	15
Canais de K ⁺	16
Canais KV.....	17
Toxinas peptídicas para canais de KV.....	19
Potencial farmacológico da peçonha.....	21
Estudos da caracterização da peçonha de <i>Acanthoscurria paulensis</i>	22
Justificativa.....	24
Objetivos.....	25
Metodologia.....	26
Extração da peçonha por eletroestimulação.....	26
Cromatografia Líquida de Alta eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC).....	26
Fracionamento da Peçonha Bruta.....	26
Purificação do peptídeo Ap6.....	27
Espectrometria de massa (MALDI TOF/TOF).....	27
Busca por similaridades e modelagem 3D.....	28
Quantificação da Ap6 (Colorimetria BCA-Cobre).....	28
Cultura de células.....	28
Ensaio Eletrofisiológicos em canais de potássio dependentes de voltagem.....	29
Eletrofisiologia – Análise de dados.....	31
Resultados.....	32
Purificação.....	32
Similaridades e modelagem 3D.....	34
Eletrofisiologia.....	36
Discussão.....	41
Perspectivas futuras.....	45
Referências Bibliográficas.....	46

Introdução

Aranhas caranguejeiras

Pertencentes à infraordem Mygalomorphae e à família Theraphosidae, as caranguejeiras são aranhas cujo comprimento podendo chegar até 25 cm (Haupt, 2005). Apresentam glândulas produtoras de peçonha abaixo de seu prossoma e quelíceras capazes de introduzir peçonha para predação ou como mecanismo de defesa (Escoubas e Rash, 2004). A presença dessas quelíceras capazes de injetar peçonha é, provavelmente, um dos motivos que fizeram com que a ordem Aranea se tornasse um dos grupos sucesso evolutivo (Coddington e Levi, 1991).

Apesar de, em geral, não apresentarem periculosidade aos humanos, sua peçonha possui capacidade de afetar processos fisiológicos em vertebrados e invertebrados em maior ou menor grau (Abreu et al., 2017). Relatados na literatura, os efeitos da picada desse tipo de aranha apontam dor local, edema, eritema e inchaço, sendo inofensiva aos humanos, com exceção do gênero *Atrax* que pode causar sintomas de envenenamento grave (Lucas et al., 1994; Estrada et al., 2007).

Segundo o World Spider Catalog, 51.982 espécies de aranhas foram catalogadas (<https://wsc.nmbe.ch/> acesso: 2024, Março 09), com apenas 1.334 toxinas descritas, sendo 607 de caranguejeiras ([https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=\(database:ArachnoServer\)](https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=(database:ArachnoServer)) acesso: 2024, Março 09). Essa discrepância entre as espécies catalogadas e toxinas descritas mostra ainda um amplo espaço de crescimento devido ao seu potencial biotecnológico, principalmente por parte das áreas da toxicologia e farmacologia.

Acanthoscurria paulensis

Descritas no Brasil por Mello-Leitão em 1923 a partir de um macho encontrado em Pirassununga, SP, a *A. paulensis* é uma aranha de cor marrom escuro, de grande porte e amplamente distribuída nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil. Não aparenta possuir inimigos naturais e apresenta comportamento bem agressivo, predando a maioria de espécies inquilinas de cupinzeiros como baratas do cerrado, grilos e outras aranhas, bem como outras caranguejeiras de menor porte.

Fisicamente, as fêmeas apresentam maior comprimento da carapaça e dos pedipalpos em relação aos machos, enquanto estes possuem pernas mais longas com esporões tibiais que se prendem às quelíceras das fêmeas a fim de evitar ataques delas durante a cópula. Os ovos ficam alojados em uma ooteca que fica protegida pela fêmea e a eclosão ocorre após 90 dias dando origem de 800 a 2000 filhotes.



Figura 1 - Espécime de *Acanthoscurria paulensis*. Fotos: Rodrigo Barbosa. Esquerda: Vista Dorsal. Direita: Vista ventral.

Composição bioquímica das peçonhas

A peçonha de aranhas é considerada uma mistura complexa (Vassilevski et al., 2009) e uma fonte de componentes farmacologicamente ativos (Nicholson, 2006), sendo que em algumas espécies, pode apresentar mais de 1000 peptídeos diferentes (Escoubas et al., 2006) e mais de 100 componentes de natureza química distinta (Vassilevski et al., 2009).

As diversas atividades biológicas são resultado de milhares de anos de evolução e seleção de compostos (Windley et al., 2012), em que, de forma geral essas peçonhas são constituídas por moléculas de baixa massa como aminoácidos livres, íons, acilpoliaminas, ácidos orgânicos, nucleotídeos, nucleosídeos (Kuhn Nentwig et al., 2011) e peptídeos, proteínas, enzimas e várias neurotoxinas contendo cisteína (Langenegger et al., 2019).

Acilpoliaminas

Caracterizam-se por ser componentes hidrofílicos que provocam paralisia rápida em suas presas (Adams et al., 1989). São amplamente estudadas por apresentar atividade biológica modulando dores crônicas e neuropáticas (Medeiros et al., 2023) e ação antimicrobiana (Espinoza-Culupú et al., 2020). Estruturalmente falando, é um grupo de baixa massa molecular, possui grupos aromáticos acil, um esqueleto de poliaminas (Kuhn-Nentwig

moléculas possuem, como por exemplo, atuar como agentes espalhadores que facilitariam a passagem de neurotoxinas através de barreiras celulares (Fernandes, 2010).

Peptídeos neuroativos

Outro grupo de compostos encontrados nas peçonhas são os peptídeos ricos em pontes dissulfeto. Caracterizam-se por possuírem massa molecular entre 2650 e 14800 Da e pela composição de resíduos de cisteínas ao longo de sua cadeia de aminoácidos (Norton e Pallaghy, 1998). Até o momento, foram caracterizados três motivos estruturais em peptídeos neuroativos, sendo eles o motivo ICK (*Inhitor cystine-knot*), o motivo DDH (*disulfide direct β -hairpin*) ou o motivo Kunitz-like (Vassilevski et al., 2009).

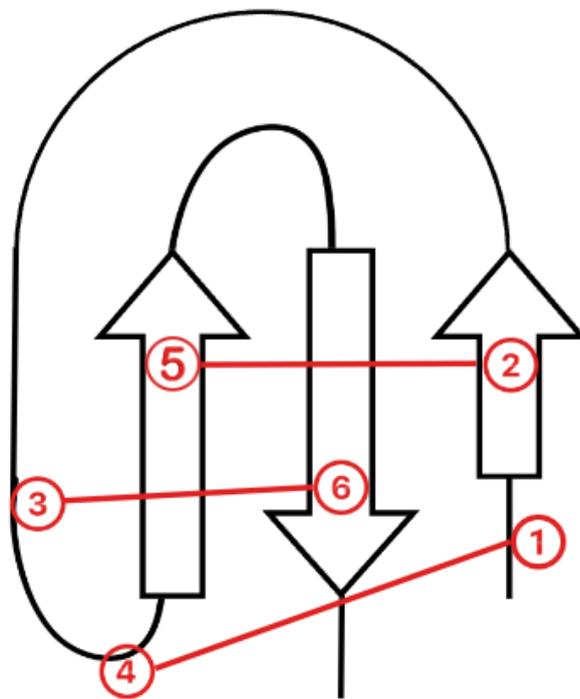


Figura 3 - Representação esquemática do motivo estrutural ICK mostrando em vermelho as cisteínas e as pontes dissulfeto estabelecidas entre elas.

O primeiro motivo, ICK, consiste em uma estrutura de 3 folhas β estabilizada por 3 pontes dissulfeto entre as cisteínas C1-C4, C2-C5 e C3-C6, cuja disposição ao longo da cadeia é C_IX₂₋₇-C_{II}X₃₋₁₁-C_{III}X₀₋₇-C_{IV}X₁₋₁₇-C_VX₁₋₁₉-C_V, onde C_n é a cisteína na estrutura primária

e Xn são os resíduos de aminoácidos (Craik et al., 2001; Norton e Pallaghy, 1998; Vassilevski et al., 2009). Quanto à estrutura espacial, forma-se um nó de cisteínas entre C1 - C4 e C2 - C5, sendo transpassado pela C3 - C6. Dentro da estrutura ICK, a presença de três fragmentos principais indicam fortemente a possibilidade de haver função neuroativa, chamado de PSM (*principal structural motif*). Essa região é compreendida entre as cisteínas C1-C2-C3-C4, a região que estaria ligada a atividade neurotóxica da molécula (Kozlov et al., 2005).

Seguindo para o próximo motivo, o DDH (*disulfide direct β -hairpin*) apresenta uma sequência consensual CX₅₋₁₉-CX₂-[G ou P]-X₂-CX₆₋₁₉-C. Diferentemente do ICK, esse motivo não apresenta um nó de cisteína e é caracterizado por um β -hairpin antiparalelo estabilizado por duas pontes dissulfeto (C₁ - C₄ e C₂ - C₅) (Wang et al., 2000).

O último motivo, Kunitz, é caracterizado por um padrão na distribuição de cisteínas, seguindo a formação C₁ - C₆, C₂ - C₄ e C₃ - C₅. Esse tipo de formação permite a presença de uma folha- β antiparalela (Langenegger et al., 2019).

Esses peptídeos neuroativos possuem atividade mesmo que em concentrações nanomolares, atuando em proteínas de membrana tanto de neurônios como de músculos por meio da modulação dos canais iônicos de cálcio, sódio e potássio e também com receptores químicos, mecânicos e térmicos. Sua modulação consiste em alterar, inibir ou ativar esses canais e receptores de forma que perturbe o fluxo de íons, prejudicando assim, a passagem dos impulsos ao longo do corpo celular (Herzig e King, 2013; Nentwig e Kuhn-Nentwig, 2013).

Nomenclatura para toxinas peptídicas

A fim de trazer maior padronização da toxinas peptídicas que eram descritas e evitar confusões devido a uma nomenclatura genérica, King e colaboradores (2008) propuseram uma nomenclatura padronizada para ser utilizada em toxinas peptídicas de todo grupo de animais. A forma proposta para nomear toxinas ficou definida em três partes, a primeira seria uma letra grega para descrever a atividade (o alvo molecular) da toxina, a segunda se trataria da fonte biológica do peptídeo e a terceira a relação com as outras toxinas, utilizada para distinguir toxinas semelhantes.

Tabela 1 – Proposta de nomenclatura de toxinas de aranha baseadas na função farmacológica. Adaptado de King et al., 2008

α (alfa)	Receptor de acetilcolina
β (beta)	Muda a dependência da voltagem da ativação do canal Na V
γ (gama)	Tem como alvo canais de cátions não específicos de HCN
δ (delta)	Atrasa a inativação de canais Na V ativados por voltagem
ϵ (épsilon)	Tem como alvo os canais de cloreto Cl^-
ζ (zeta)	Tem como alvo canais cíclicos ativados por nucleotídeos
η (eta)	Tem como alvo os canais de potássio retificadores internos (KIR)
θ (teta)	Tem como alvo canais de potássio (K2P) de domínio de dois poros
ι (iota)	Agonista do canal de sódio ativado por voltagem (NaV)
κ (kappa)	Inibe os canais de potássio ativados por voltagem (KV)
λ (lambda)	Inibe os canais de potássio ativados por cálcio (KCa)
μ (mu)	Inibe os canais de sódio ativados por voltagem (NaV)
ν (nu)	Tem como alvo o receptor de acetilcolina
ξ (xi)	Tem como alvo o receptor de endotelina
\omicron (mícron)	Tem como alvo o receptor de octopamina
π (pi)	Tem como alvo canais iônicos com detecção de ácido (ASICs)
ρ (ró)	Tem como alvo adrenoceptores
σ (sigma)	Tem como alvo o receptor 5-HT
τ (tau)	Tem como alvo o canal de potencial receptor transitório (TRP)
υ (upsilon)	Tem como alvo o receptor de vasopressina/ocitocina
ϕ (fi)	Tem como alvo o receptor de rianodina
χ (chi)	Tem como alvo o transportador de noradrenalina
ψ (psi)	Antagonista não competitivo do receptor de acetilcolina
ω (ômega)	Inibe os canais de cálcio dependentes de voltagem (CaV)
Γ (gama)	Tem como alvo o receptor de glutamato
Λ (Lambda)	Tem como alvo o receptor GABA

Ξ (Ômicron)	Tem como alvo o receptor P2X
Σ (Sigma)	Visa o canal CFTR
Ω (Ômega)	Tem como alvo o receptor do fator de crescimento epidérmico
Δ (Delta)	Atividade citolítica
U (Desconhecido)	Atividade desconhecida

Canais iônicos e potencial de ação

Canais iônicos são proteínas transmembrânicas presentes em todas as células e são responsáveis pela excitabilidade elétrica na membrana propiciando a passagem dos impulsos nervosos em nervos, músculos e outros tecidos (Hille, 2001; Yu e Catterall, 2003; Yu, 2005). Canais iônicos dependentes de voltagem apresentam seletividade para um tipo de íon, contudo, não é exclusiva visto que íons menores conseguem passar pelo canal. Estruturalmente, esses canais são tetrâmeros que formam um poro seletivo responsável pela passagem do íon e apresentam uma região ao redor do poro que capta as variações de voltagem na membrana, para gerar as mudanças conformacionais necessárias para sua abertura permitindo o influxo ou efluxo de íons.

A movimentação desses íons dentro e fora da célula gera despolarizações e repolarizações na membrana, essas inversões do potencial de membrana são conhecidas como potencial de ação. A propagação dos sinais elétricos ao longo da membrana ocorre devido a essa alternância de íons Na^+ , Ca^{2+} e K^+ . A variação de voltagem da membrana ativa canais Nav forçando um fluxo de íons Na^+ para dentro da célula gerando, assim, sua despolarização. Logo após o processo de despolarização da membrana, canais de cálcio são ativados e geram um influxo de de íons Ca^{2+} , funcionando como um segundo mensageiro de resposta celulares. Com o influxo desses íons, os canais de KV são ativados gerando uma saída de íons da célula para repolarizar a membrana, contudo com carga negativa. O conjunto desses processos é denominado potencial de ação e permite a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, para que assim ocorra a modulação de canais iônicos dependentes de ligantes na membrana pós sináptica, altere o potencial de membrana, ocasionando uma nova passagem do impulso elétrico pelo neurônios.

Canais de K⁺

O subgrupo de canais iônicos mais diversos é o de potássio, presente em todos os organismos tais como eucariotos, archaea e eubacteria (Miller, 2000). Atua em papéis essenciais como processos de sinalização celular na regulação de neurotransmissores, frequência cardíaca, secreção de insulina, excitabilidade neuronal, transporte de eletrólitos epiteliais, contração do músculo liso e regulação do volume central (Wickenden, 2002). De forma conjunta aos canais de NaV, atuam na manutenção do potencial de membrana sendo a base fisiológica da transmissão do sinal nervoso (Guyton e Hall, 2006).

A superfamília de canais de K⁺ conta com 5 grupos estruturais e funcionais. (1) Os canais de K⁺ retificadores internos (K_{ir}), têm sua função regulada por nucleotídeos, por ATP e ADP, por fosforilação, por proteínas G e por fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. (2) Os canais de K⁺ com domínio de dois poros (K_{2p}), possuem quatro segmentos transmembrana sendo regulados por fatores como pH, temperatura e tensão da membrana celular. (3) Os canais de K⁺ de condutância intermediária e pequena (I_{KCa} e S_{KCa}) ativados por cálcio são formados por seis segmentos transmembrana e regulados pela presença de Ca²⁺ mediados pela calmodulina. (4) Os canais de grande condutância ativados por Ca²⁺ (B_{KCa}) são formados por sete segmentos e ativados por mudança de potencial e por vários íons como cálcio, sódio ou cloro. E (5) o último do grupo, os canais de K⁺ dependentes de voltagem (KV) (Kuzmenkov et al., 2015).

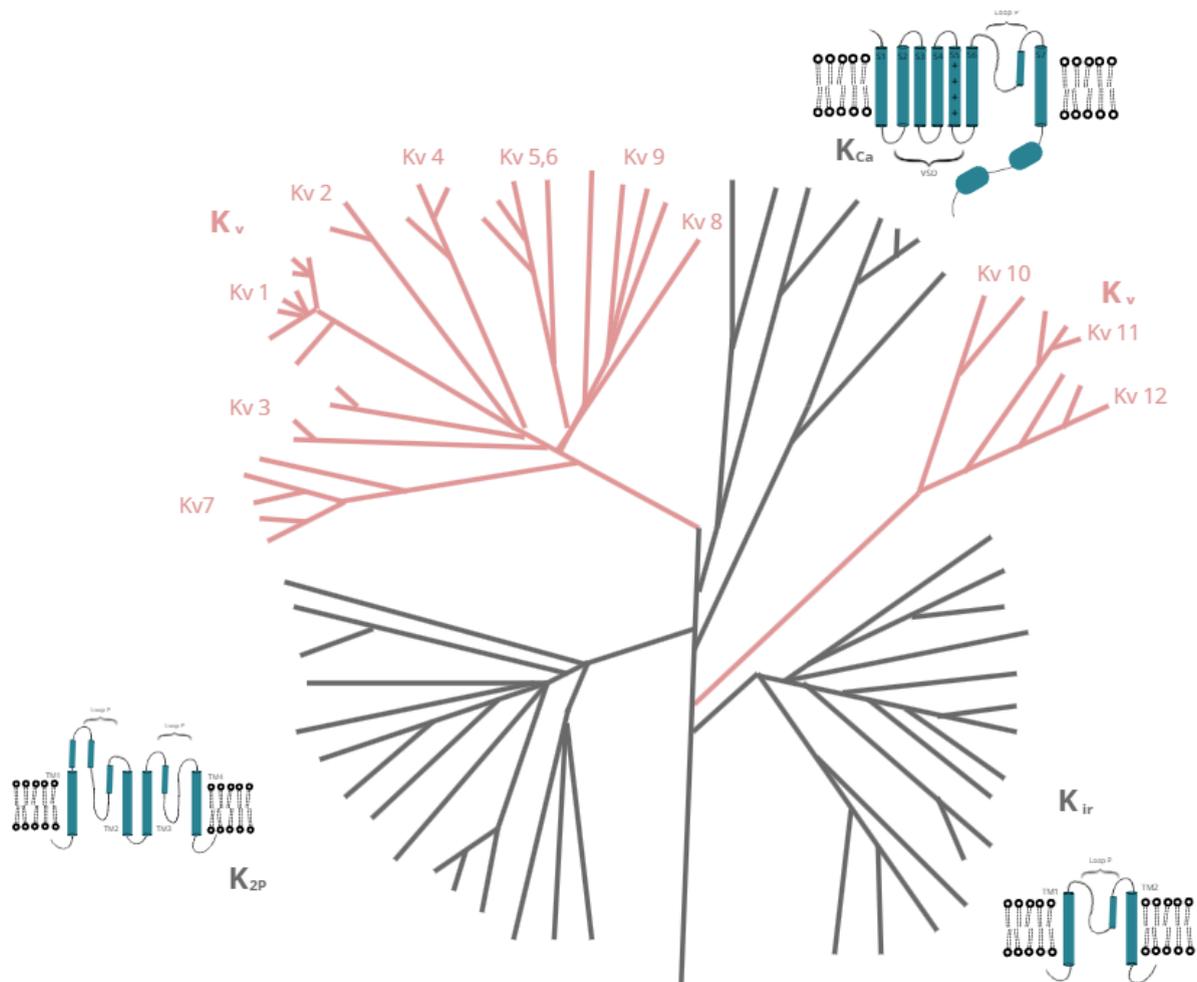


Figura 4 - Árvore filogenética dos canais de K⁺. Destacado em vermelho os canais KV. Em preto apresenta-se os demais canais de K⁺ juntamente com as estruturas da subunidade alfa. Imagem adaptada de Nikita Gamper e KeWei Wang - *Pharmacology of Potassium Channels*, editora Springer, 2021

Canais KV

Os canais KV são proteínas transmembrânicas que permitem a passagem de íons K⁺ durante a despolarização do campo elétrico membranar (Hille B., 2001). Estruturalmente, apresentam quatro subunidades α compostas por seis segmentos transmembrânicos (TM), S1 a S6, onde os segmentos S1-S4 formam o domínio sensor de voltagem (VSD). Os segmentos S4-S5 formam um *loop* intracelular responsável pelo controle da abertura do domínio do poro (PD), sendo este formado pelos segmentos S5-S6. Essa região abriga o filtro de seletividade do canal, onde possui uma sequência de aminoácidos altamente conservada compreendida pelos resíduos TVGYG (Long et al., 2005; Yellen, 2002).

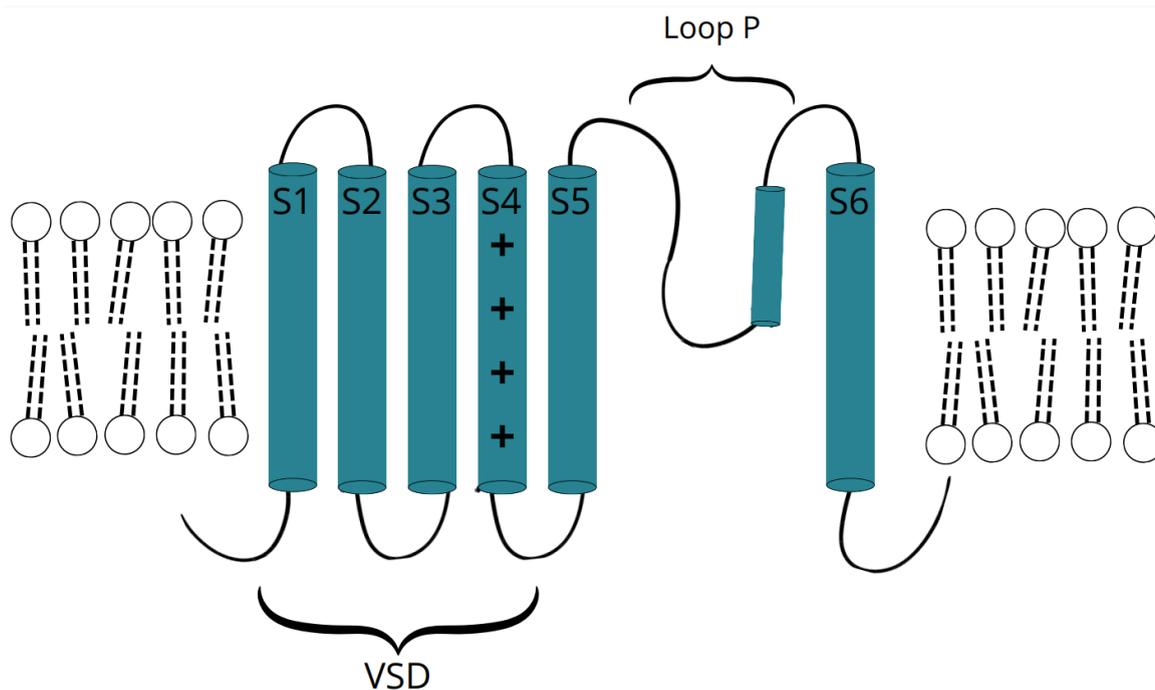


Figura 5 - Representação esquemática da subunidade α do canal KV. Domínios S1-S4 formadores do VSD, sendo o segmento S4 responsável pela detecção das variações de potencial na membrana. Os “+” representam a densidade de cargas presente no segmento S4 caracterizado pela maior presença de aminoácidos carregados positivamente. Segmentos S5-S6 formando o domínio do poro destacando no *loop P* em azul a região do filtro de seletividade. Adaptada de Yu e Catterall, 2004.

O funcionamento do canal se inicia quando uma despolarização do campo elétrico na membrana gera uma mudança conformacional no VSD. O VSD é uma região rica em aminoácidos carregados positivamente e apresenta um motivo estrutural caracterizado pela presença desses aminoácidos carregados separados por dois resíduos hidrofóbicos que permitem a detecção das mudanças de polaridade (Long et al. 2005; Zhou et al. 2001a). Essa mudança conformacional induz a abertura do canal gerando um gradiente eletroquímico de íons K^+ que é cessado logo após o início da repolarização quando o VSD retorna ao seu estado de repouso e fecha o canal novamente. Após esse processo, o canal passa por um estado hiperpolarizado onde só é possível ativá-lo novamente quando o canal retorna ao seu estado polarizado (Kurata e Fedida, 2006).

A família de canais KV possui 40 membros distribuídos entre 12 subfamílias: KV 1 (*Shaker*); KV 2 (*Shab*); KV 3 (*Shaw*); KV 4 (*Shal*); KV 7 (KvLQT); KV 10 (EAG); KV 11 (hERG); KV 12 (ELK), e as subfamílias modulatórias “elétricamente silenciosas” KV 5, KV

6, KV 8 e KV 9 (Finol-Urdaneta et al. 2020). A subfamília KV 1 *Shaker*, possui 8 membros e são encontrados principalmente no sistema nervoso central (van der Wijst et al., 2010; Adelman et al., 1995) contribuindo para a regulação do potencial de membrana (Imbrici et al., 2006). Desempenham também papéis na homeostase e reabsorção de íons Mg^{2+} nos rins (Glaudemans et al., 2009; San-Cristobal et al., 2014), e na resposta neuromuscular uma vez que, foi observado que mutações nos canais KV 1.1 apresentaram casos de ataxia episódica tipo 1 (Eunson et al., 2000).

Outra subfamília é o KV 2 *Shab* (Finol-Urdaneta et al. 2020), que possui dois membros sendo expressos principalmente no cérebro, no pâncreas e no sistema cardiovascular e tem como função já descrita a regulação do potencial de ação induzido pela glicose nas células β pancreáticas modulando a secreção de insulina (Nina Li et al., 2013).

Canais de KV não são exclusivos de eucariotos, há casos de canais KV encontrados em arqueias, mais especificamente da hipertermófila encontrada em uma fonte termal oceânica no Japão, a *Aeropyrum pernix*. Esse canal, possui semelhanças no VSD comparadas a família Kv 1, apontado por Ruta e colaboradores (2003) como intimamente relacionados. Outra subfamília de canais KV são os canais hERG, os quais possuem três membros e podem ser encontrados em células cardíacas mediando a ativação rápida da corrente retificadora de potássio (Sanguinetti et al., 1995).

Toxinas peptídicas para canais KV

Vários compostos de distintas naturezas químicas são capazes de se ligar aos canais de K^+ , como íons metálicos, compostos de baixa massa molecular, peptídeos da peçonha de animais e anticorpos. Esses ligantes podem ser bloqueadores, obstruindo fisicamente a entrada do canal, ou moduladores, em que ocorrem modificações na ativação do canal (Li-Smerin e Swartz, 1998; Kuzmenkov et al., 2015). Até o momento, já foram descritas 1599 toxinas para canais de potássio, sendo 183 provenientes de aranhas (<https://kaliumdb.org/>. acesso em: 11 de Março de 2024) que apresentaram atividade biológica para os canais KV.

Peptídeos da peçonha de animais como cobras, anêmonas, escorpiões, caramujos e aranhas possuem capacidade de modulação da atividade de canais de KV (Boldrini-França et al., 2020; Abdel-Mottaleb et al., 2008; Herrington et al., 2006; Ciccone et al., 2019; S. Imperial et al., 2006). No caso de toxinas de aranhas, é possível apontar algumas características comuns na estrutura das moléculas, como a disposição das cisteínas C3-C4 em que normalmente não há resíduos entre esses dois aminoácidos (**Fig. 4**).

Kappa-theraphotoxin-Tb1c	DDCLGMFSSCDPNNDK CC PNRVCRVRDQWCKYKLW-----	35
Lambda-hexatoxin-Hv1c	AICTGADRPCAAC-CP CC PGTSCK---AESNGVSYCRKDEP-	37
Beta/Kappa-theraphotoxin-Gr1a	-YCQKWMWTCDSK-RK CC EDMVCQ---LWCKKRL-----	29
Kappa-theraphotoxin-Ps1a	-YCQKWMWTCDSA-RK CC EGLVCR---LWCKKII-----	29
Kappa-theraphotoxin-Pg2a	-ECRKMFGGCSVD-SD CC AHLGCK---PTLKYCAW---DGT-	33
Kappa-sparatoxin-Hv1c	-ECGTLFSGCSTH-AD CC EGFICK---LWCRY-----ERTW	31
	* * ** *;	.

Figura 6 - Alinhamento de peptídeos da peçonha com atividade em canais KV de diversas espécies de aranhas - Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) semi-conservativas. A direita o número de aminoácidos. Destaca-se em vermelho os resíduos de cisteína C3-C4 aparecendo juntos.

Mais especificamente em toxinas para canais KV, regiões na sequência primária indicaram alguns pontos em comum como o motivo estrutural chamado de *patch* hidrofóbico, caracterizado pela presença de dois ou três resíduos de aminoácidos hidrofóbicos consecutivos e por uma sequência de aminoácidos carregados, sendo esses responsáveis pela ligação às membranas fosfolipídicas presentes na estrutura do canal (Yuan et al., 2007; Zeng et al., 2007; Zhang et al., 2019;).

Entre as neurotoxinas peptídicas descritas com atividade para canais KV está a hanatoxina da aranha *Grammostola spatulata* (Swartz e Mackinnon, 1995). Possui 35 resíduos de aminoácidos estabilizados por 3 pontes dissulfeto. Além de inibir canais de KV 2.1, ela também apresentou atividade em canais KV 4.2 e em canais de CaV 2.1 (Yingying e Swartz, 1998).

Outra toxina para canais Kv é a SGTx1 da aranha *Scodra griseipes*, a qual possui 34 resíduos de aminoácidos (Marvin et al., 1999) e atua inibindo de forma reversível canais Kv 2.1. Essa toxina se liga às hélices do VSD mudando a ativação do canal para voltagens mais despolarizadas. É também capaz de inibir canais NaV 1.1, NaV 1.4, NaV 1.5, NaV 1.6 e NaV 1.7 (Agwa et al., 2018).

As frixotoxinas (PaTx 1 e 2), isoladas da peçonha da aranha caranguejeira *Phrixotrichus auratus*, bloqueiam correntes de KV 4.3 e KV 4.2 especificamente, as quais alteram as propriedades de *gating* por meio de sua interação com o sensor de voltagem. Além dessa interação, foi observado também o bloqueio de correntes cardíacas de potássio, demonstrando sua importância no estudo das correntes cardíacas (Diochot et al., 1999).

Estruturalmente falando, essas toxinas apresentam um motivo estrutural ICK e interagem preferencialmente quando o canal se encontra fechado (Chagot et al., 2004).

A toxina ScTx1, isolada da aranha *Stromatopelma calceata*, por sua vez, apresentou alta afinidade com os canais KV 2.1, KV 4.2 e com o heterodímero formado pelos canais KV 2.1/9.3. Além disso, a toxina aparenta estar envolvida na sensibilidade ao oxigênio nos miócitos das artérias pulmonares (Escoubas et al., 2002a). Em um segundo momento, descreveu-se também a atividade da HmTx 1 e 2, da aranha *Heteroscodra maculata*, como um inibidor de corrente de potássio associado aos subtipos de canais KV 2, onde a toxina 1 também possui efeitos inibidores dos canais de KV 4, sendo que para o canal KV 4.1 foi o primeiro peptídeo efetivo descrito para esse subtipo (Escoubas et al., 2002b).

Potencial farmacológico da peçonha

A estimativa quanto à diversidade molecular presente na peçonha de aranhas é de até 12 milhões de compostos (Escoubas e Rash, 2004). Essas moléculas, tanto da peçonha quanto da hemolinfa, apresentam alto potencial terapêutico e biotecnológico devido aos seus alvos receptores, membranas celulares e enzimas (Pimenta e de Lima, 2005).

Além da prospecção de novos candidatos a medicamentos, as toxinas da peçonha também foram utilizadas para elucidar a estrutura, função e farmacologia de receptores celulares (Adams, 2004; Ushkaryov et al., 2004), receptores metabotrópicos (Guharay e Sachs, 1984), canais iônicos (Doyle et al., 1998; Mackinnon et al., 1998), bem como no desenvolvimento de bioinseticidas (Corzo e Escoubas, 2003; Fitches et al., 2004; Khan et al., 2008; Tedford et al., 2004), drogas utilizadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Estrada et al., 2007; Mazzuca et al., 2007), disfunção erétil (Nunes et al., 2008), doenças infecciosas (Budnik et al., 2004; Chung et al., 2002; Haeberli et al., 2000; Kozlov et al., 2006; Silva Júnior et al., 2000; Yan e Adams, 1998) e arritmia cardíaca (Bode et al., 2001).

Outra utilização das toxinas de aranha são os biopesticidas, uma vez que insetos são a maioria das presas de aranhas e sua ação insetotóxica é uma proposta biotecnológica de alto valor agregado no mercado de controle de pragas. A predação efetiva das aranhas se dá pelas toxinas que possuem como alvo molecular canais iônicos de insetos em que observa-se a ocorrência de proteínas ricas em cisteína, sendo o motivo estrutural mais comumente formado o ICK (Windley et al., 2012).

Também já observado, as propriedades antimicrobianas das peçonhas possuem características catiônicas e anfífilas, conseguindo se associar à bicamada lipídica das

células, podendo resultar em um desequilíbrio das cargas ou na própria lise celular (Villegas e Corzo, 2005), em que tal efeito, pode ser observado em diversas bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas (Kozlov et al., 2006; Jung et al., 2006; Budnik et al., 2003; Haeberli et al., 2000). A diferença da composição dos fosfolipídios entre procariotos e eucariotos gera uma composição de cargas e hidrofobicidade fazendo com que a membrana de procariotos seja a mais suscetível à ação dos peptídeos, uma vez que nos procariotos há uma densidade de cargas negativas maior (Yeman e Yount, 2003).

Observa-se que a peçonha de aranha, independente da espécie, apresenta diversos efeitos bioquímicos e neurológicos em vários animais tanto vertebrados ou invertebrados (Beleboni et al., 2004; Gimenez, 2013) bem como uma vasta aplicação biotecnológica para o desenvolvimento de fármacos ou agrotóxicos.

Estudos da caracterização da peçonha de *Acanthoscurria paulensis*

Os estudos relacionados à peçonha de *A. paulensis* do Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília se iniciaram em 2012, utilizando de análise proteômica que identificou a presença de 97 componentes distintos da peçonha com componentes de massa molecular que variam entre 601,4 Da e 21.932,3 Da, em que, a maior parte dos compostos possui entre 700 e 8.000 Da (Mourão et al., 2013b).

O primeiro peptídeo isolado foi denominado de Ap1a, que demonstrou atividade de paralisia quando testado em lagartas *Spodoptera frugiperda* cuja dose efetiva foi de $13.0 \pm 4.2 \mu\text{g/g}$ (Mourão et al., 2013a). Testada também em camundongos, por meio de injeções intracranianas com dose de 30 μg em cada animal, a toxina Ap1a demonstrou atividade tóxica onde foi possível observar o surgimento de mioclonias, hipermotilidade, saltos e convulsões generalizadas. Já nas *Drosophila melanogaster*, mostrou uma redução na frequência e amplitude das vias da fibra gigante (GF) até o músculo tergotrocâter (TTM) (GF-TTM) e da fibra gigante (GF) até o músculo dorsal longitudinal (DLM) (GF-DLM), sendo sugerida a Ap1a possuindo atividade na junção neuromuscular mediada pelos receptores glutamatérgicos (Mourão, 2012), foi testada também em NaV 1.2, NaV 1.4, NaV 1.5, NaV 1.6 e no receptor de acetilcolina nACh, não apresentando resultado para nenhum desses canais. Posteriormente deu-se prosseguimento com a caracterização da toxina Ap1a testando em canais NaV 1.1, NaV 1.3 e NaV 1.7, onde apresentou uma atividade fraca com inibição máxima de 30 % no canal NaV 1.7 (Garcia, 2018).

Dando seguimento à caracterização dessa peçonha, foram então purificados mais 5 peptídeos, denominados como Ap2, Ap3, Ap4, Ap5 e Ap6, que foram testados em canais de Na⁺ e Ca²⁺. As toxinas Ap2, Ap3 e Ap5 possuem alta identidade entre suas sequências primárias e apresentaram atividade para o canal de CaV 2.1 a concentração de 1 µM. No caso do peptídeo Ap3, foi observada uma fraca inibição dos canais de NaV 1.1, NaV 1.5 e NaV 1.7 com concentração a 1 µM. A toxina Ap6, foi caracterizada com uma omega-toxina, apresentando atividade somente em canais de CaV 2.1 (Tibery, 2021), já a toxina Ap4, não apresentou atividade em nenhum canal testado sugerindo então uma possível atividade em canais de KV e canais de sódio de insetos (Tibery, 2020).

Tabela 2 - Comparativo das toxinas isoladas de *Acanthoscurria paulensis* entre os canais testados e os canais que apresentaram atividade.

Toxina Isolada	Testada em	Atividade em
Ap1a	NaV 1.1, NaV 1.2, NaV 1.3, NaV 1.4, NaV 1.5, NaV 1.6, NaV 1.7 e nAch	-
Ap2	NaV 1.1, NaV 1.5, NaV 1.7, CaV 1.2, CaV 2.1 e CaV 2.2	CaV 2.1
Ap3	NaV 1.1, NaV 1.5, NaV 1.7, CaV 1.2, CaV 2.1 e CaV 2.2	NaV 1.1, NaV 1.5, NaV 1.7 e CaV 2.1
Ap4	NaV 1.1, NaV 1.5, NaV 1.7, CaV 1.2, CaV 2.1 e CaV 2.2	-
Ap5	NaV 1.1, NaV 1.5, NaV 1.7, CaV 1.2, CaV 2.1 e CaV 2.2	CaV 2.1
Ap6	NaV 1.1, NaV 1.5, NaV 1.7, CaV 1.2, CaV 2.1 e CaV 2.2	CaV 2.1

Justificativa

Considerando o potencial biotecnológico das peçonhas de aranhas caranguejeiras vale ressaltar a importância no estudo e caracterização dessas toxinas principalmente para a produção de novos componentes farmacológicos. Uma vez que a maior parte das aranhas tem sua peçonha pouco estudada, esse potencial farmacológico fica pouco explorado. Algumas doenças são ocasionadas pelo mau funcionamento dos canais iônicos, como alguns tipos de epilepsia, dores crônicas e paralisia periódica. Com o uso de toxinas capazes de modular esses canais, pode-se encontrar novos tipos de tratamentos para essas condições.

Considerando os estudos anteriores de caracterização da peçonha de *Acanthoscurria paulensis*, tem-se a Ap1a como o primeiro peptídeo estudado onde foi averiguado sua atividade biológica em canais iônicos, atividade em camundongos e potencial bioinseticida. Seguindo de uma purificação de outros cinco peptídeos denominados Ap2, Ap3, Ap4, Ap5 e Ap6 que também foram submetidos a testes eletrofisiológicos em canais NaV e CaV.

Este projeto visa dar continuidade ao trabalho anteriormente iniciado, a fim de buscar por outros possíveis alvos farmacológicos do peptídeo Ap6, que até o momento só apresentou atividade em canais de CaV 2.1. Com o sequenciamento realizado anteriormente por Tibery (2020), foi identificadas sequências de aminoácidos que sugerem o motivo estrutural ICK, sendo esse motivo indicador de atividade biológica.

Alinhamentos realizados pelo Blastp indicaram outros 88 peptídeos, dos quais foram restringidos àqueles com E value até e^{-05} e posteriormente selecionou-se 3 sequências que apresentaram atividade moduladora ou inibitória nos canais do KV. Devido às similaridades encontradas com o peptídeo Ap6 demonstrando atividade biológica e levando em consideração a promiscuidade característica desses peptídeos de aranha, o projeto focou em testar a capacidade moduladora do peptídeo em células expressando canais de KV.

Objetivos

Objetivo geral

Caracterização da atividade da toxina Ap6 isolada da peçonha de *Acanthoscurria paulensis* em canais de potássio voltagem dependentes.

Objetivos específicos

- Purificação do peptídeo Ap6 presente na peçonha da aranha
- Avaliação da ação do peptídeo Ap6 por meio de ensaios eletrofisiológicos nos canais KV 1.1, KV 1.2, KV 1.3 e KV 3.1.
- Análise estrutura-função da Ap6 e dos peptídeos similares que apresentaram atividade em canal KV.

Metodologia

Extração da peçonha por eletroestimulação

A partir de espécimes de machos e fêmeas de *Acanthoscurria paulensis* acondicionadas no Biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília sob licença do IBAMA n° 19138-1 foi realizada a extração da peçonha por meio de um eletroestimulador caseiro, ocorrendo extração a cada 30 dias. O aparelho foi posicionado na região basal das quelíceras, estimulando os músculos para a expulsão da peçonha das glândulas e a acondicionando em um tubo *ependorf* de 1,5 mL. As amostras foram solubilizadas em água Mili-Q e centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos para que as substâncias sedimentadas pudessem ser removidas. Após esse processo, quantificou-se por espectrofotômetro com luz UV a 280 nm (*NanoVue® GE Healthcare*) para proteínas totais, secou-se à vácuo (*SpeedVac*) e armazenou-se a -20° C.

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

Fracionamento da Peçonha Bruta

Alíquotas contendo a peçonha bruta foram ressuspensas em 0,12% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) em água. A amostra foi, então, submetida à cromatografia líquida de alta eficiência LC10A Shimadzu Co. (Kyoto, Japão), utilizando uma coluna semi-preparativa C18 Phenomenex. O gradiente utilizado para eluição foi de uma solução aquosa de TFA 0,1% (A) e uma solução de acetonitrila de TFA 0,1% (B) cujo fluxo era de 1,5 mL/min e detecção a 216 e 280 nm de absorbância. O gradiente se iniciou com 0% de B durante 10 minutos, após esse tempo o gradiente aumentou à concentração de 0 a 60% em 1 hora, seguido de 60 a 100% em 10 minutos, sendo mantido a 100% em mais 10 minutos e finalizou-se equilibrando a coluna novamente em solução A.

Tabela 3 - Relação entre o tempo e o gradiente de acetonitrila na primeira etapa de cromatografia

Tempo	% de ACN
0 - 10 min	0%
10 - 60 min	0% - 60%
60 - 70 min	60% - 100%
70 - 80 min	100%

Purificação do peptídeo Ap6

O peptídeo Ap6 passou por mais uma etapa de cromatografia, onde foi utilizado uma Coluna Phenomenex Kinetex C18 Core-shell cujo método se inicia com a concentração de acetonitrila atingindo 20% aos 10 minutos. Após os 10 minutos, foi estabelecido um platô do gradiente durante mais 10 minutos, e após essa etapa, o gradiente de 0,5% de acetonitrila se iniciou atingindo 40% aos 60 minutos.

Tabela 4 - Relação entre o tempo e o gradiente de acetonitrila na segunda etapa de cromatografia

Tempo	% de ACN
0 - 20 min	0% - 20%
20 - 30 min	20%
30 min - 60 min	20% - 40%

Espectrometria de massa (MALDI TOF/TOF)

A fim de avaliar o grau de pureza da amostra bem como aferir a massa molecular experimental, foi utilizado o espectrômetro de massas MALDI TOF/TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha). Solubilizou-se a amostra contendo o peptídeo Ap6 em água Milli-Q e dissolveu-se em matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (acetonitrila/água/TFA 3%; 5:4:1) na razão de 2 μ L da amostra para 2 μ L de matriz, depositadas em uma placa de aço inox Anchorchip (600 mm) e secada à temperatura

ambiente. Com isso, realizou-se a análise em modo refletido para a avaliação da massa monoisotópica utilizando o *software* FlexAnalysis 3.3 (*Bruker Daltonics*, Alemanha).

Busca por similaridades e modelagem 3D

A sequência primária da Ap6 foi submetida a uma busca por similaridade usando o programa BlastP, disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Os alinhamentos foram feitos utilizando o programa Clustal Omega disponível em <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> e os modelos 3D das toxinas foram gerados pelo programa Swiss model disponível em <https://swissmodel.expasy.org/>.

Quantificação da Ap6 (Colorimetria BCA-Cobre)

A amostra pura foi quantificada por colorimetria, utilizando o *kit* para proteína BCA Protein Assay Kit® (ThermoFischer) utilizando o protocolo *enhanced*. A amostra foi diluída em água Milli-Q e misturada aos reagentes do kit na razão 1:1 e incubados a 60°C por 30 minutos. A leitura foi feita a uma absorbância de 562 nm e quantificada por cálculo em curva padrão calibrada com albumina bovina.

Cultura de células

Células L292 expresando canais iônicos KV 1.3 e KV 3.1 humanos e células HEK 293T (*Human Embryonic Kidney SV-40 T-antigen*) foram descongeladas do banho de nitrogênio líquido, transferidos para um falcon de 15 mL sendo adicionado 3 mL de meio DMEM. Após a transferência para o falcon, foi centrifugado por 8 min a 500G, o sobrenadante aspirado e as células ressuspensas com 6 mL de meio enriquecido, em que para as células L292 (Fibroblasto de camundongo) foi utilizado meio contendo DMEM + 10% de soro fetal bovino + 1% de penicilina/estreptomicina e para as células HEK, foi utilizado meio contendo DMEM + 10% de soro fetal bovino + 1% de Antibiotic-Antimycotic® (Gibco), sendo então transferidas para as placas de cultura de célula e incubadas em estufa com atmosfera umedecida com 5% de CO₂ a 37°C.

Tabela 5 - Relação das porcentagens de cada componente para produção de meio para crescimento de células HEK e L929

HEK 293T	L929
DMEM	DMEM
10% de SFB	10% de SFB
1% de Antibiotic-Antimycotic® (Gibco)	1% Penicilina/estreptomicina

Células HEK 293T foram incubadas em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ a 37 °C. Essas células foram cultivadas em placas de petri de 40x10 mm com confluência de 70- 90% foram transfectadas utilizando Lipofectamine3000® (*ThermoFischer scientific*) em meio Opti-MEM® (Gibco) com os plasmídeos de KV 1.1, KV 1.2 humano e pEGFP-c1 (GFP).

Ensaio Eletrofisiológicos em canais de potássio dependentes de voltagem

As macrocorrentes dos canais de KV foram estimuladas e registradas por meio da técnica de *Patch Clamp*, utilizando o amplificador HEKA EPC 10 na configuração *Whole Cell* e o *software* PATCHMASTER (*HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Germany*). Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente (21 a 25°C) cujas pipetas de vidro borossilicato foram preparadas antes do uso por meio do equipamento *Puller* horizontal da *Sutter Instruments*; EUA. Após o preenchimento com a solução interna, as resistências das pipetas foram medidas e variaram entre 1,5 e 3,5 MΩ. Compensação da resistência em série e cancelamento de correntes capacitivas foi mantida em aproximadamente 10 MΩ para todos os experimentos, sendo compensada em pelo menos 60%. As correntes capacitivas foram canceladas por meio de um protocolo online de estímulos p/4. Os parâmetros utilizados foram: número de vazamentos = 4, atraso de vazamento = 10,0 ms e tamanho do vazamento = 0,250. Um potencial de repouso de -100 mV foi aplicado para cancelar as correntes capacitivas e de vazamento. A composição das soluções: Solução intracelular em mM: 50 KCl, 60 KF, 10 NaCl, 20 EGTA e 10 HEPES, pH 7,2. Solução extracelular em mM: 140 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 glicose e 10 HEPES.

Tabela 6 - Composição das soluções intracelular e extracelular em mM.

Intracelular (mM)	Extracelular (mM)
50 KCl	140 NaCl
60 KF	4 KCl
10 NaCl	2 CaCl ₂
20 EGTA	1 MgCl ₂
10 HEPES	5 glicose
	10 HEPES

Para aquisição dos dados foram utilizados dois protocolos: Protocolo de voltagem padrão: utilizado para evocar correntes de potássio mediadas pelos canais KV. Consiste em uma série de despolarizações de 40 ms, variando de um potencial de manutenção de -80 mV a +40 mV, a fim de maximizar a probabilidade de abertura do canal. No segundo protocolo, as correntes de potássio dependentes de voltagem foram evocadas pela aplicação de pulsos de despolarização a cada 25 segundos. O potencial inicial era de -80 mV, e em cada sweep, o potencial era incrementado em 10 mV até atingir um potencial de +70 mV. Em seguida, pulsos de repolarização foram aplicados até atingir -80 mV.

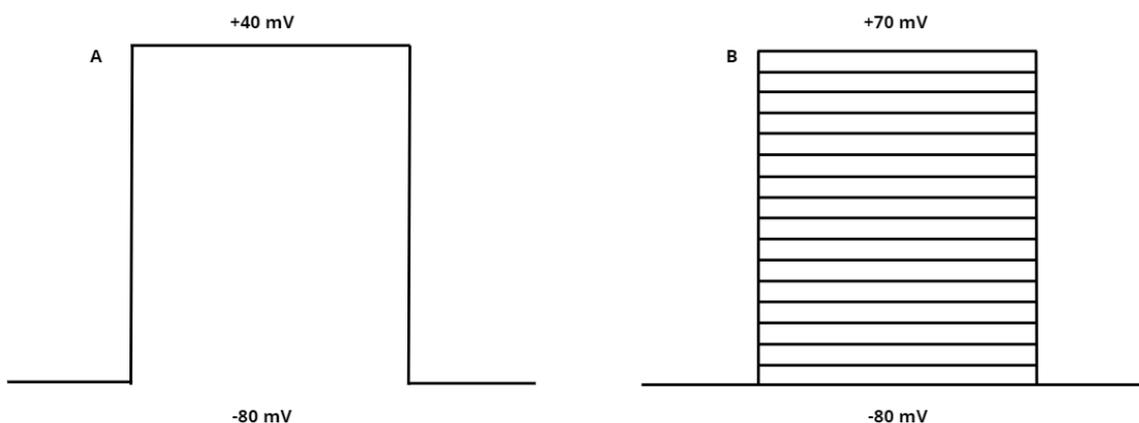


Figura 7 - Representação dos protocolos de *patch clamp* - (A) protocolo de condicionamento de canais de potássio. (B) protocolo de estímulo de canais de potássio com variação de voltagem.

Eletrofisiologia – Análise de dados

Análise de dados – Ensaio em canais de potássio dependentes de voltagem

A condutância ao potássio (g_K) foi calculada a partir das correntes obtidas na primeira parte do protocolo utilizando a lei de Ohm,

$$g_K = \frac{IK}{V - V_{rev}}$$

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

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

onde R é a constante dos gases ideais, T a temperatura em Kelvin, F é a constante de Faraday, $[K]_{Externa}$ é a concentração do íon potássio no meio externo e $[K]_{Interna}$ é a concentração do íon potássio 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 $\Delta V_{1/2}$ serão 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 serão 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 potássio será estipulada pela a seguinte fórmula,

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

Os dados estatísticos foram feitos a partir dos *software* OriginPro 8 e GraphPad Prism 8 utilizando o Teste T não pareado para avaliar as diferenças entre as médias em que se considerou significativas aquelas em que o valor de $p < 0,05$.

Resultados

Purificação

A purificação do peptídeo Ap6 ocorreu em duas etapas de cromatografia resultando em 48,22 μg do peptídeo. A primeira etapa que a peçonha bruta foi submetida foi um fracionamento realizado com uma coluna semi preparativa C18 (*Phenomenex*) onde a fração com o peptídeo de interesse eluiu com 43% de acetonitrila aos 53 minutos. Na segunda etapa foi utilizado uma coluna analítica Phenomenex Kinetex C18 Core-shell, e o composto de interesse eluiu aos 37 minutos a 26% de acetonitrila

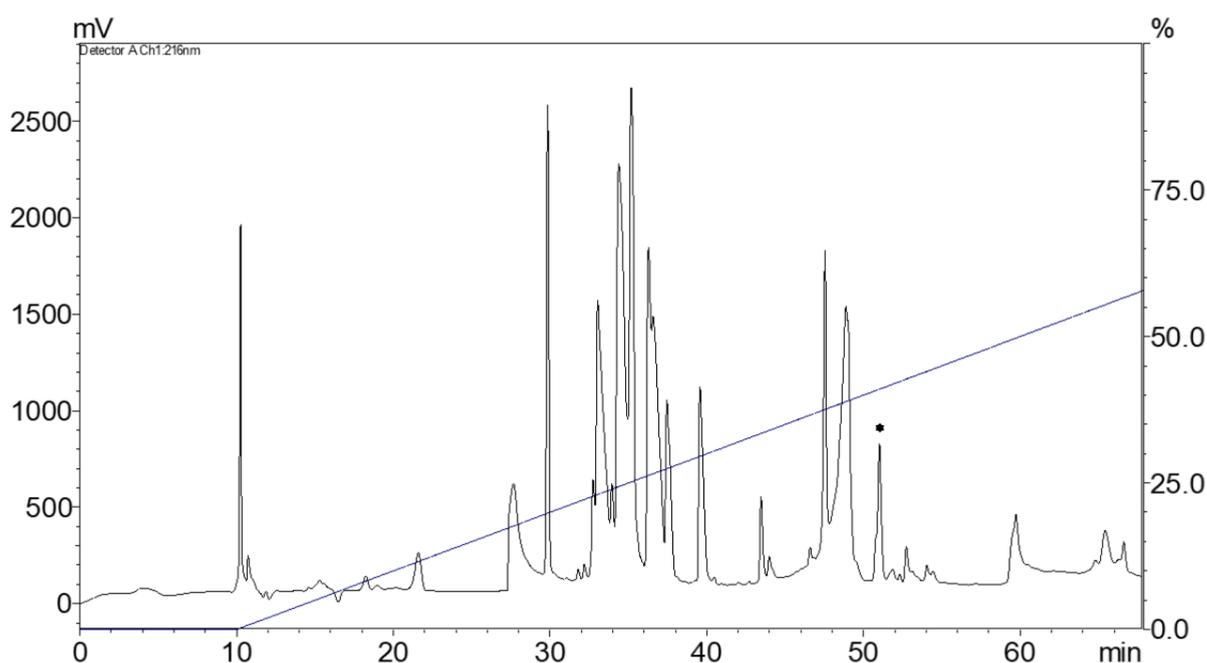


Figura 8 - Cromatograma da peçonha bruta *A. paulensis* por RP-HPLC. O fracionamento foi realizado por meio de uma coluna C18 semipreparativa C18 (*Phenomenex*) com gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha azul com um fluxo de 1,5mL/min e absorvância monitorada a 216 nm. É indicado com * a fração contendo a Ap6.

Após a segunda etapa, uma avaliação para aferir a pureza e a massa monoisotópica experimental foi feita por MALDI TOF/TOF no modo refletido, onde foi constatada uma massa monoisotópica experimental de 3717,9 Da que confere com a massa esperada a partir da sequência encontrada por Tibery (2020).

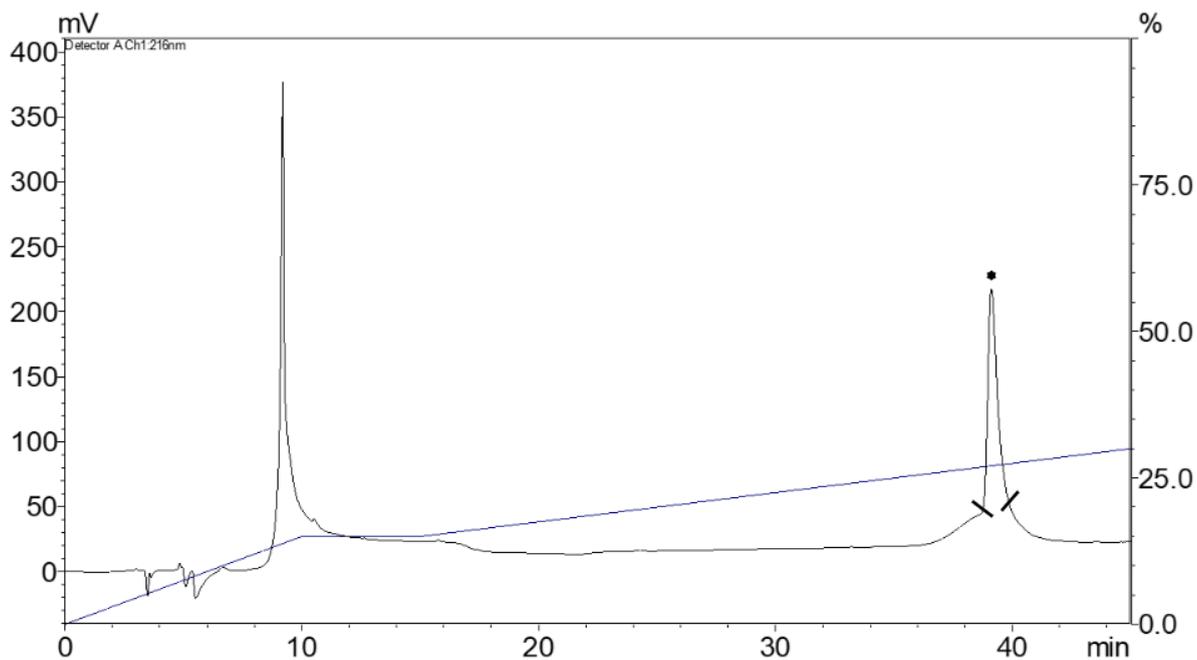


Figura 9 - Cromatograma da purificação do peptídeo Ap6. A purificação ocorreu utilizando uma coluna Phenomenex Kinetex C18 Core-shell com gradiente de acetonitrila conforme representado pela linha azul com um fluxo de 1,0mL/min e absorbância monitorada a 216 nm. É indicado com * o pico do peptídeo Ap6. As barras // indicam a porção coletada.

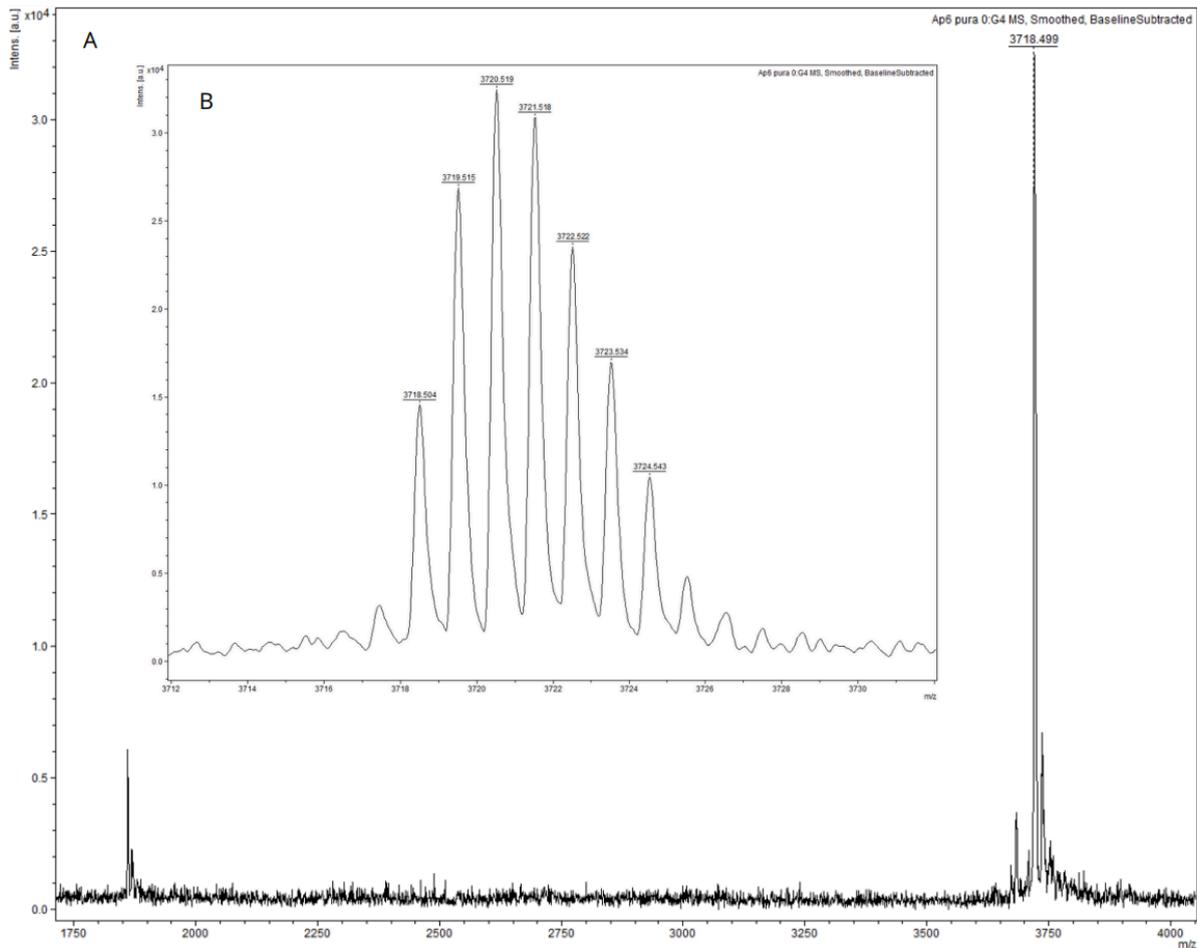


Figura 10 - Espectro de massas do peptídeo Ap6. A: Massa molecular média $[M+H]^{2+}$ de 3718,49 Da do peptídeo Ap6 utilizando a técnica de espectrometria de massa (MS) no modo refletido. B: Massa molecular monoisotópica de $[M+2H]^+$ de 1859,2 Da utilizando a espectrometria de massas no modo refletido, totalizando massa experimental de 3718,4 Da

Similaridades e modelagem 3D

A busca por similaridades utilizando o Blastp resultou em 3 toxinas provenientes de aranhas caranguejeiras que possuíam atividade descrita em canais KV. Dentre as similaridades encontradas destaca-se duas estruturas críticas que indicam atividade biológica sendo elas o motivo estrutural ICK e um conjunto de aminoácidos hidrofóbicos chamado de *patch* hidrofóbico. As toxinas selecionadas são, VsTx1, GxTx-1E e JzTx3.

JzTx3-P62520	DGECGGFWWKCGRGKPPCCKGYACSKTWGCAVEAP-	36
GxTX-1E-P84835	EGECGGFWWKC GSGKPACCPKYVCSPKWGLCNFPMP-	36
Ap6	--ACGNFMWKCSE-RLPCCQEYVCSPQWKWCQNP---	31
Vstx1-P60980	--ECGKFMWCKKN-SNDCCCKDLVCSSRWKWCVLASPF	34
	* * * * * * * . * * * *	

Figura 11 - Alinhamento dos peptídeos JxTx3 (P62520), GxTx-1E (P84835), Ap6 e VsTx1 (P60980) - Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) semi-conservativas. À direita, o número de aminoácidos. Códigos dos peptídeos retirado do UniProtKB

Ap6	ACGNFMWKC SERLPCCQEYVCSPQWKWCQNP---	31
Vstx1	ECGKFMWCKKNSNDCCCKDLVCSSRWKWCVLASPF	34
	* * : * * * * * . : * * : : * * * : * * * * *	

Figura 12 - Alinhamento dos peptídeos Ap6 e VSTX1 - Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) semi-conservativas. À direita, o número de aminoácidos. Destacam-se comparativamente as estruturas similares entre a Ap6 e a VSTX1. Em vermelho, o *patch* hidrofóbico responsável pela interação do peptídeo com as estruturas lipídicas dos canais. A barra em preto, mostra os resíduos de Arg e Trp relacionados com a ligação da toxina ao VDS, sendo que na Ap6 há uma Gln no lugar da Arg.

Ap6	--ACGNFMWKC SER-LPCCQEYVCSPQWKWCQNP--	31
GxTX-1E	EGECGGFWWKC GSGKPACCPKYVCSPKWGLCNFPMP	36
	* * . * * * * . . * * : * * * * * : * * : *	

Figura 13 - Alinhamento dos peptídeos GxTx-1E e Ap6 - Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) semi-conservativas. À direita, o número de aminoácidos. Destacam-se comparativamente as estruturas similares entre a Ap6 e a GxTx-1E. Em vermelho, o *patch* hidrofóbico responsável pela interação do peptídeo com as estruturas lipídicas dos canais.

JzTx3	DGECGGFWWKCGRGKPPCCKGYACSKTWGWCAVEAP	36
Ap6	--ACGNFMWKCSE-RLPCCQEYVCSPQWKWCQNP--	31
	.**..:***:*.*** **	

Figura 14 - Alinhamento dos peptídeos JzTx3 e Ap6 - Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) semi-conservativas. À direita, o número de aminoácidos. Destacam-se comparativamente as estruturas similares entre a Ap6 e a JzTx3. Em vermelho, o *patch* hidrofóbico responsável pela interação do peptídeo com as estruturas lipídicas dos canais.

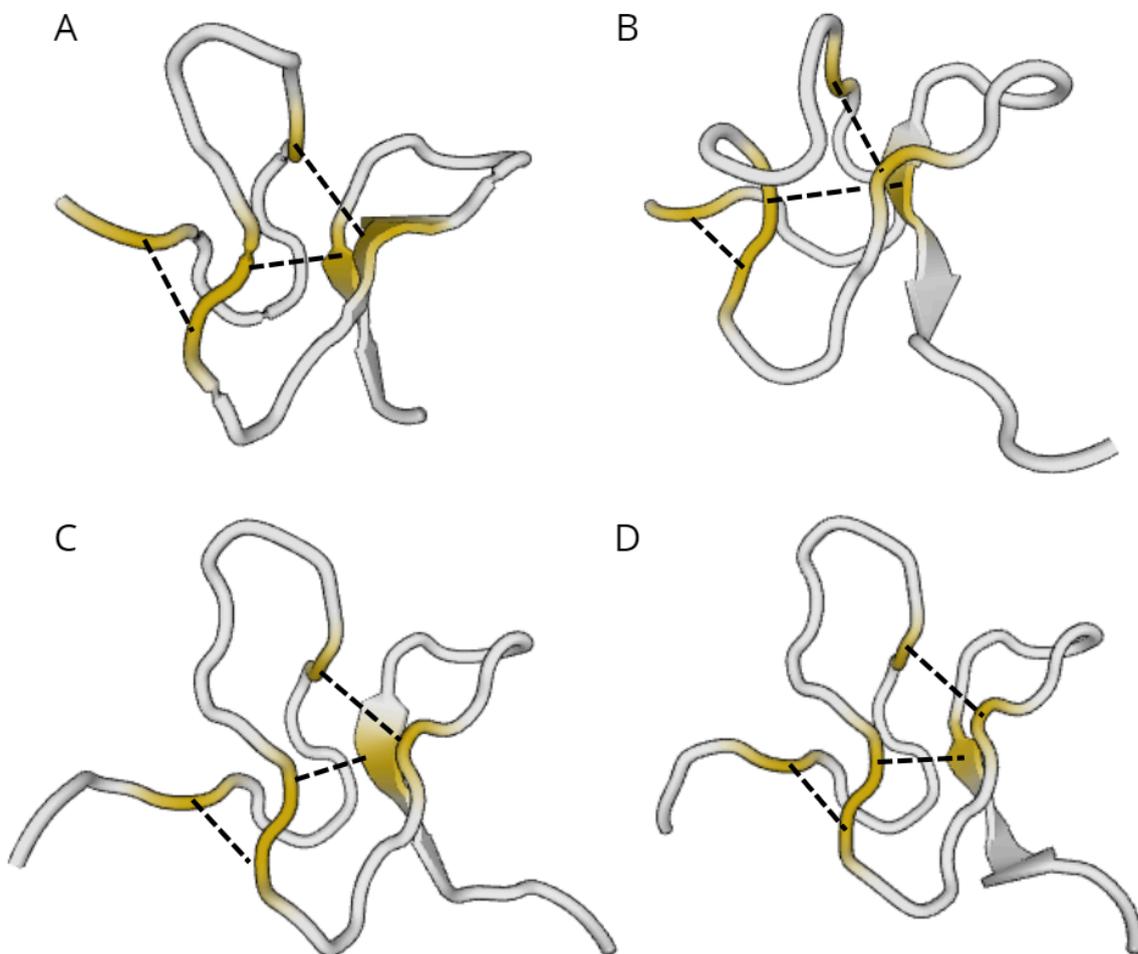


Figura 15 - Modelos em 3D das toxinas Ap6, VSTX1, GXTX-1E e JZTX3. (A) Modelo 3D da Ap6. (B) Modelo 3D da VSTX1. (C) Modelo 3D da GXTX-1E. (D) Modelo 3D da JZTX3. Modelagem realizadas pelo Swiss model destacando em amarelo os resíduos de cisteína. Em pontilhado é mostrado as pontes dissulfeto entre as cisteínas.

Eletrofisiologia

Ensaio eletrofisiológicos foram realizados nos canais de KV 1.1, KV 1.2, KV 1.3 e KV 3.1 para avaliar a capacidade do peptídeo Ap6 de alterar a amplitude da corrente pelo parâmetro de porcentagem de inibição, a probabilidade de abertura durante a ativação ($\Delta I_{1/2\text{ativação}}$). A quantidade de toxina purificada não era suficiente para utilizar concentrações maiores, dessa forma definiu-se 500 nM para realização dos testes.

A Ap6 em concentração de 500 nM não apresentou atividade nos canais KV 1.1 sendo incapaz de promover sua inibição ou a alterar a cinética de ativação. A inibição observada pelo peptídeo Ap6, foi de $-4,200 \pm 2,755\%$ não sendo estatisticamente significativa ($P < 0.05$) sendo o n amostral de 7 células (**Fig. 16**).

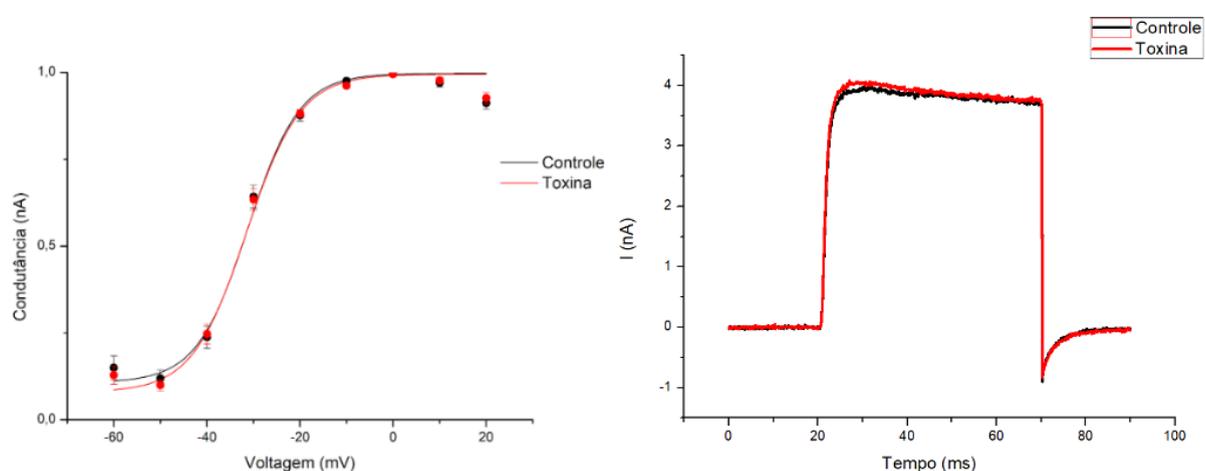


Figura 16 – Caracterização eletrofisiológica em canais KV 1.1 com o Peptídeo Ap6. Efeito de 500 nM do peptídeo Ap6 sobre o canal KV 1.1. À esquerda, está representado o registro normalizado da condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento (vermelho) com Ap6. À direita, o traço controle (em preto) na maior amplitude registrada e a mesma condição (em vermelho) na presença da toxina Ap6.

Em canais KV 1.2, a toxina Ap6 a concentração de 500nM também não apresentou atividade, sendo incapaz de promover sua inibição ou a alterar a cinética de ativação. A inibição observada da Ap6 foi de $-2,011 \pm 4,618\%$ também não sendo estatisticamente significativa ($P < 0.05$) com um n amostral de 3 células (**Fig. 17**).

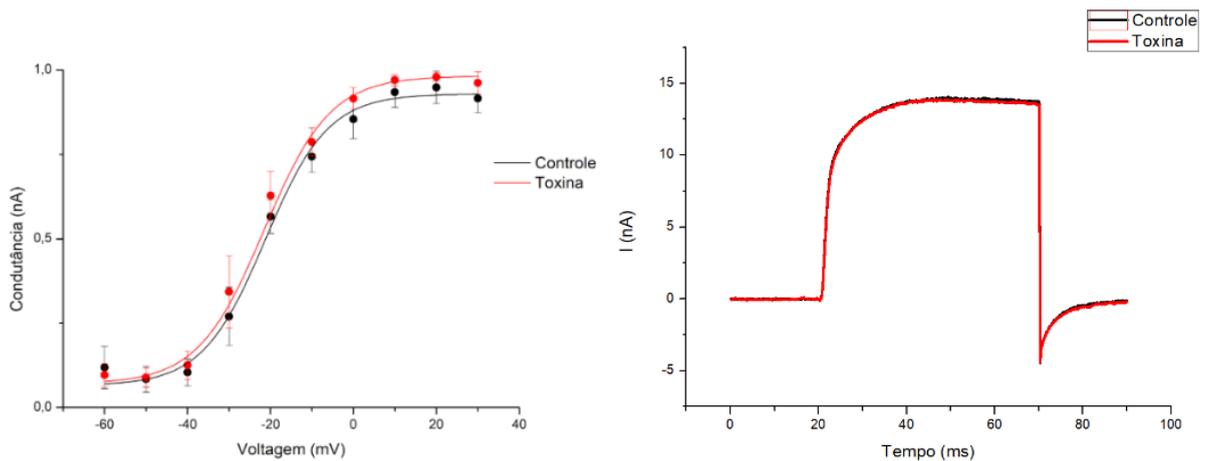


Figura 17 – Caracterização eletrofisiológica em canais KV 1.2 com o Peptídeo Ap6. Efeito de 500 nM do peptídeo Ap6 sobre o canal KV 1.2. À esquerda, está representado o registro normalizado da condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento (vermelho) com Ap6. À direita, o traço controle (em preto) na maior amplitude registrada e a mesma condição (em vermelho) na presença da toxina Ap6.

Testada também em canais de KV 1.3, a toxina Ap6 também não apresentou atividade a uma concentração de 500nM, sendo incapaz de promover sua inibição ou a alterar a cinética de ativação. A inibição apresentada pela Ap6 foi de $-0,2339 \pm 1,147\%$ não sendo estatisticamente significativa ($P < 0.05$) com n amostral de 5 células (**Fig. 18**).

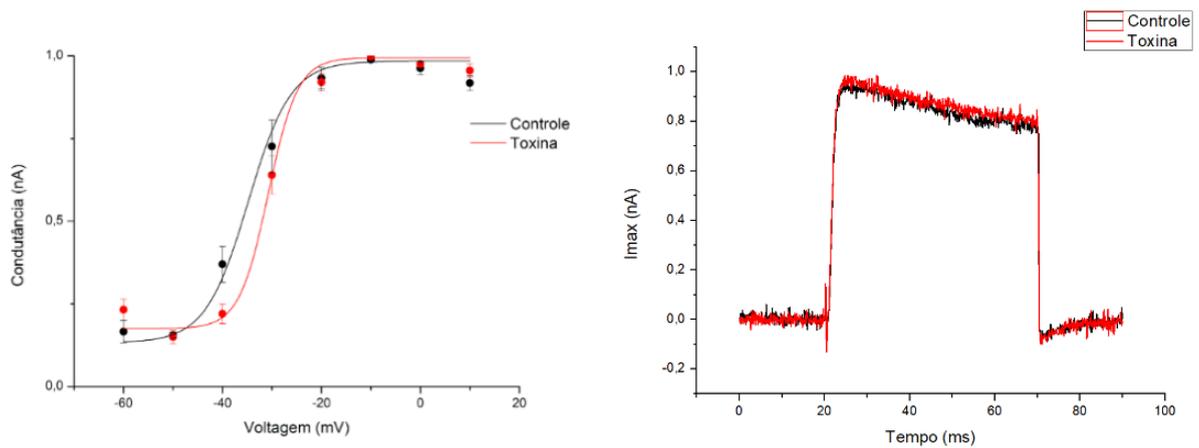


Figura 18 – Caracterização eletrofisiológica em canais KV 1.3 com o Peptídeo Ap6. Efeito de 500 nM do peptídeo Ap6 sobre o canal KV 1.3. À esquerda, está representado o registro normalizado da condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento (vermelho) com Ap6. À direita, o traço controle (em preto) na maior amplitude registrada e a mesma condição (em vermelho) na presença da toxina Ap6.

Da mesma forma, a toxina Ap6 a uma concentração de 500nM não apresentou atividade nos canais KV 3.1, sendo incapaz de promover sua inibição ou a alterar a cinética de ativação. A inibição apresentada pela Ap6 foi de $-3,461 \pm 3,474\%$ não sendo estatisticamente significativa ($P < 0.05$) com n amostral de 6 células (**Fig. 19**).

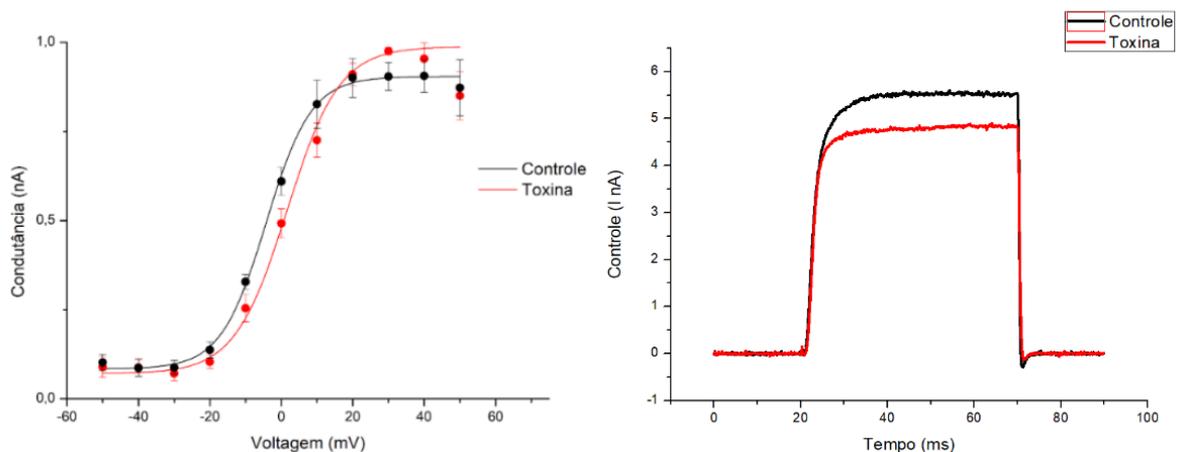


Figura 19 – Caracterização eletrofisiológica em canais KV 3.1 com o Peptídeo Ap6. Efeito de 500 nM do peptídeo Ap6 sobre o canal KV 3.1. À esquerda, está representado o registro normalizado da condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento (vermelho) com Ap6. À direita, o traço controle (em preto) na maior amplitude registrada e a mesma condição (em vermelho) na presença da toxina Ap6.

Tabela 7 - Valores das médias da porcentagem de inibição (%) em canais KV.

Canal	% inibição
KV 1.1	-4,200 ± 2,755
KV 1.2	-2,011 ± 4,618
KV 1.3	-0,2339 ± 1,147
KV 3.1	-3,461 ± 3,474

Discussão

O foco dessa dissertação foi testar a capacidade do peptídeo Ap6 de modificar a atividade de canais de K⁺ e dar continuidade ao trabalho iniciado de caracterização dos peptídeos isolados de *Acanthoscurria paulensis* (Tibery, 2020). Realizado anteriormente, estudos do peptídeo Ap6 determinaram sua massa experimental monoisotópica de 3.717,9 Da e a sequência primária ACGNFMWKCSERLPCCQEYVCSPQWKWCQNP. Foi possível então identificar em sua sequência, resíduos que caracterizam o motivo estrutural ICK, um indicador de atividade biológica, sendo ele composto por uma distribuição específicas de cisteínas ao longo da sequência primária bem como também as ligações dissulfeto estabelecidas por essas cisteínas (Vassilevski et al., 2009; Norton e Pallaghy, 1998). Os testes realizados previamente com a Ap6 em canais NaV e CaV, apresentaram atividade biológica somente em CaV 2.1 na concentração de 1 µM.

No presente trabalho, os ensaios eletrofisiológicos realizados em KV 1.1, KV 1.2, KV 1.3 e KV 3.1 não demonstraram atividade da Ap6. Assim sendo, procurou-se explicar a falta de atividade nesses canais por meio da comparação com sequências de outros peptídeos que apresentavam algum grau de identidade com a Ap6. Uma busca por similaridades pelo Blastp apontou 88 sequências das quais selecionou-se 56 cujo e-Value apresentava um valor até e-05 e, dessas sequências, apenas três possuíam atividade descrita em canais KV.

O primeiro peptídeo com maior grau de identidade com a Ap6 que possui atividade em canais de KV foi a VSTX1 com 59,26% de identidade (**Fig. 12**). Esse peptídeo foi extraído da aranha chilena *Grammostola rosea*, possui 34 resíduos de aminoácidos e massa molecular teórica de 3.997 Da. Sua atividade foi caracterizada inicialmente por inibir canais KV de uma arquea hipertermófila *Aeropyrum pernix* (KVAP) (Ruta et al., 2003), sendo esse um canal estruturalmente semelhante aos canais da família *Shaker*. Posteriormente, também foi observada capacidade de modulação em canais KV 11.1 e NaV 1.7 (Redaelli et al., 2010). A VSTX1 inibe os canais devido a uma interação com resíduos pertencentes a uma cavidade aquosa entre as alças S1-S2 e S3-S4 do VSD, em que uma região contendo resíduos hidrofóbicos se liga a estruturas lipídicas formadas entre as hélices S2-S3 e S1-S4 (Lau et al., 2016). Apesar da VsTx1 inibir um canal procariótico intimamente relacionado a família *Shaker*, outros testes realizados mostraram que ela não apresentou atividade em canais KV 1.1 e KV 1.4. Além disso, também não apresentaram atividade em canais KV 11.2, KV 11.3, NaV 1.1, NaV 1.2, NaV 1.3, Nav 1.4, NaV 1.5 e NaV 1.6.

A partir de um estudo de ressonância magnética nuclear, Jung e colaboradores (2005), puderam identificar as regiões mais críticas para gerar a modificação do canal KvAP. Uma das regiões destacadas foi o chamado *patch* hidrofóbico, caracterizado por uma porção de resíduos majoritariamente hidrofóbicos e, por resíduos de triptofano responsáveis pela ligação do peptídeo as estruturas lipídicas. Lau e colaboradores (2016), também utilizando de testes de ressonância magnética nuclear, apontaram que os resíduos de Arg24 e Trp25 se ligam fortemente ao VSD. Nesse mesmo trabalho, mutações nos resíduos W7A, K8A e R24A demonstraram ser essas as regiões responsáveis pela ligação uma vez que reduziram significativamente a ligação ao VSD.

Assim como VSTX1, a Ap6 também apresenta em sua sequência os resíduos de triptofano nas mesmas posições bem como a presença dos aminoácidos Trp7 e Lis8 o que poderia indicar uma semelhança quanto ao tipo de ligação realizada sendo parte dela na membrana lipídica e outra ligada no VSD. A Ap6 apresentou uma estrutura similar ao *patch* hidrofóbico e no lugar do resíduo de Arg24, uma Gln24. Esses resíduos possuem propriedades físico-químicas diferentes, enquanto a arginina pertence ao grupo dos aminoácidos polares carregados positivamente, a glutamina é pertencente ao grupo dos aminoácidos polares não carregados. Apesar de possuírem polaridade e consequentemente serem ambos hidrofóbicos, talvez seja possível que a carga presente na arginina tenha um fator de impacto quanto a afinidade de ligação ao VSD. Acredita-se que a arginina parece ser crítica para a ligação com o VSD uma vez que sua mutação foi capaz de reduzir a afinidade com a proteína. A análise realizada demonstrando as diferenças estruturais sobre as toxinas levantam fatores que poderiam hipotetizar as razões de não apresentar comportamento semelhante quando testadas em canais de potássio (Jung et al., 2005).

KvAP	LFRLVRLLRFLRILLIISRGSK	22
Shaker	ILRVIRLVRFRIIFKL-SRHSK	21
	: : * : : * * : * . : * * : : * * * *	

Figura 20 - Alinhamento do VSD dos canais KvAP e dos canais da família Shaker (Kv1) - Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) semi-conservativas. À direita, o número de aminoácidos. Destaca-se em vermelho as similaridades entre os VSDs.

A segunda kappa-toxina de maior identidade com a Ap6 foi a GxTx-1E extraída da aranha chinesa *Chilobrachys guangxiensis* possui 54,84% de identidade com a Ap6 (**Fig. 13**). Caracteriza-se por apresentar 36 aminoácidos com massa teórica de 3.948 Da determinada por MALDI ToF (Herrington et al., 2006). Essa toxina já foi previamente testada em diversos canais sendo eles a maioria de potássio, não apresentando atividade nos canais KV 1.2, KV 1.3, KV 1.5, KV 3.2, CaV 1.2, CaV 2.2, NaV 1.5, NaV 1.7 e NaV 1.8.

Sua atividade, no entanto, foi observada primeiramente em canais KV 2.1 de células β pancreáticas (Herrington et al., 2006). Até então, era hipotetizado que as correntes responsáveis pelo prolongamento do potencial de ação regulador da secreção de insulina, também chamada de correntes de K^+ retificadoras retardadas (IDR), eram majoritariamente formadas pela ação de canais KV 2.1 devido à suas propriedades biofísicas semelhantes (Herrington et al., 2006). Ao aplicar a toxina, houve uma inibição de $98\% \pm 1\%$ do canal KV 2.1, juntamente com a inibição de 90% da corrente IDR. Nesse estudo realizado por Herrington e colaboradores (2006) foi sugerido a GxTx-1E como um possível tratamento para diabetes do tipo 2 e sugeriu também os canais KV 2.1 sendo um componente da IDR nas células β . Nesse mesmo estudo, a toxina também apresentou inibição dos canais KV 2.2 e KV 4.3. Destaca-se que esses canais ainda não foram testados com a Ap6, se tornando uma perspectiva futura de continuidade da caracterização da toxina.

Em 2011, Lee e colaboradores utilizaram RMN para melhor elucidar a estrutura da toxina bem como apontar diferenças estruturais da GxTx-1E com outras toxinas com atividade para canais K^+ . As regiões iniciais compreendendo os resíduos de Glu1 e Glu3, foram sugeridas como áreas críticas para a ligação da toxina, uma vez que uma substituição principalmente no resíduo Glu1 apresentou diferença quanto à afinidade da ligação ao canal. Comparativamente, a Ap6 não apresenta esses resíduos ácidos na porção N terminal, o que poderia apontar também como um possível motivo para a falta de interação da toxina com o canal.

O terceiro peptídeo descrito como modulador de canal KV dessas sequências foi a JzTx3. Também é um peptídeo isolado *Chilobrachys guangxiensis*, possui 53,57% de identidade com a Ap6 e possui 3.919,4 Da, determinada por MALDI ToF (**Fig. 14**). Já apresentou atividade de inibição em canais NaV 1.5 (Xiao et al., 2004) e KV 2.1 (Yuan et al. 2007), contudo, em KV 2.1 apresentou menor afinidade do que o peptídeo GxTx-1E (Lee et al., 2010).

Análises estruturais realizadas por Yuan e colaboradores (2007), apontaram novamente a estrutura de adesivo hidrofóbico onde sugeriram essa característica como típica para toxinas modificadoras de *gating* devido a essa estrutura se mostrar bem conservada entre as toxinas peptídicas de potássio já descritas e, assim como a GXTX-1E, possui dois aminoácidos de caráter ácido na sua porção N Terminal com a diferença da substituição de um Asp1 no lugar do Glu1. Um ponto crítico apontado como um motivo para a baixa afinidade da JzTx3 em comparação a uma outra toxina da mesma família, a JzTx1, foi a ausência da Ala1 e da Asn19 que se mostram como aminoácidos altamente conservados entre as toxinas para canal de KV 2.1. A toxina Ap6, no entanto, apresenta uma Ala1 e um Glu18 nas posições correspondentes e, apesar de possuir uma sequência de resíduos hidrofóbicos na região do adesivo, ainda possui um quantidade menor de resíduos hidrofóbicos do que as demais toxinas, podendo caracterizar uma menor afinidade para se ligar ao canal KV 2.1.

Um novo estudo (Liao et al., 2007) para avaliar a interação da JzTx3 utilizou de ressonância magnética nuclear para melhor esclarecer os possíveis pontos críticos relacionados à interação do peptídeo com o canal. Novamente, se destaca o adesivo hidrofóbico como parte chave para a interação principalmente em canais de KV 2. Além desse ponto, o resíduo K20 foi apontado como uma região conservada na maioria das moléculas que atuam em canais KV 2, que na Ap6 não é encontrada, tendo uma Gln17 na posição correspondente.

As quatro toxinas apresentadas possuem semelhanças entre si, como por exemplo, todas possuem o motivo estrutural ICK e o *patch* hidrofóbico. Na comparação entre as sequências pode-se observar algumas substituições. Uma primeira diferença a ser observada entre as toxinas, é resíduo de Glu3 em JzTx3 e GxTx-1E e Glu1 na posição correspondente da VsTx1 que, na Ap6 é substituído por uma Ala1, uma substituição crítica uma vez que mutações nesse resíduo indicaram diferenças de afinidade no canal (Lee et al., 2011). Os resíduos de Arg24 na VsTx1, que foram relacionados à ligação da toxina ao VSD, na toxina GxTx-1E houve uma substituição por uma Lys, um aminoácido positivamente carregado assim como o Arg, além do resíduo de Trp que aparece logo em sequência. Tanto a Ap6 e a JzTx3 apresentam resíduos de Trp correspondente, contudo a Arg foi substituída por aminoácidos polares tais como a Gln e a Tre. Como a JzTx3 apresentou menor afinidade com o canal KV 2.1 se comparada à GxTx-1E, talvez essa substituição possa ter sido uma das razões que levaram à redução da afinidade da toxina Ap6.

Algumas outras diferenças podem ser apontadas, por exemplo, a presença de uma Tyr22 em JzTx3 e GxTx-1E e Tyr21 na posição correspondente na Ap6 enquanto na VsTx1

se encontra uma Leu21, essa substituição provavelmente não traz muita diferença para a atividade da toxina uma vez que as propriedades hidrofóbicas se mantêm, e nenhum dos estudos realizados apontou essa região como crítica para a interação toxina-canal.

Comparando a estrutura 3D das toxinas (**Fig. 15**), pode-se perceber algumas similaridades quanto às estruturas. Essa similaridade é provavelmente explicada pelo motivo estrutural comum a todas as toxinas, o motivo ICK. Contudo, pode-se também notar diferenças quanto ao tamanho das alças formadas entre os resíduos de cisteína, principalmente da VsTx1. Contudo, levando em consideração sua afinidade com um canal de K⁺ de procarioto, é compreensível que estruturalmente apresente a maior divergência entre as outras três. Já a GxTx-1E e a JzTx3 são toxinas extraídas da mesma espécie de aranha, a *Chilobrachys guangxiensis*, que inclusive possuem atividade em canais KV 2.1 divergindo quanto a afinidade de ligação do canal.

Considerando não somente as sequências primárias das toxinas discutidas, a estrutura das moléculas mostram possibilidades de atividade da Ap6 em canais de potássio, principalmente do canal KV 2.1. Sendo esse um canal ainda não testado, pode-se incluí-lo em perspectivas futuras para dar continuidade a caracterização da Ap6.

Um grupo de toxinas que tiveram atividade em canais KV 1 tinham o motivo estrutural Kunitz. Uma superfamília de toxinas do tipo Kunitz das aranhas caranguejeiras *Ornithoctonus huwena* e *Ornithoctonus hainana* passaram por testes eletrofisiológicos em canais KV 1.1, KV 1.2 e KV 1.3, que apontaram atividade de bloqueio nos canais KV 1.1 de 78±7% (Yuan et al., 2008). Essas toxinas não apresentam similaridade com a Ap6, principalmente por apresentarem um motivo estrutural diferente daquele proposto para a toxina Ap6.

Perspectivas futuras

A análise de estrutura-função realizada entre as toxinas similares a Ap6 indica uma possível atividade biológica em canais KV 2.1. Dessa forma, sugere-se que futuramente a Ap6 seja testada nesses canais também. Além dos canais KV 2, sugere-se também a continuidade em canais KV 4.

Referências Bibliográficas

Abdel-Mottaleb, Yousra; Corzo, Gerardo; Marie-France Martin-Eauclaire; *et al.* A common “hot spot” confers hERG blockade activity to α -scorpion toxins affecting K⁺ channels. *Biochemical Pharmacology*, v. 76, n. 6, p. 805–815, 2008

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., Herold, E.E., Venema, V.J. (1989). Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. *Journal of Comparative Physiology A*, 164: 333-342.

Adams M.E. Agatoxins: ion channel specific toxins from the american funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Toxicon*. 2004;43(5):509-25

Aramaki, Y., Yashuhara, T., Higashijima, T., Yoshioka, M., Miwa, A., Kawai, N., Nakajima, T. (1986). Chemical characterization of spider toxin, JSTX and NSTX. *Proceedings of the Japan Academy, Ser.B.*, 62: 359-362.

Beleboni RO, Pizzo AB, Fontana ACK, Carolino ROG, Coutinho-Netto J, Santos WF. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *Eur J Pharmacol*. 2004;493(1-3):1-17

Bode F, Sachs F, Franz MR. Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature*. 2001;409(6816):35-6.

Boldrini-França J, Pinheiro-Junior EL, Peigneur S, Pucca MB, Cerni FA, Borges RJ, Costa TR, Carone SEI, Fontes MRM, Sampaio SV, Arantes EC, Tytgat J. Beyond hemostasis: a snake venom serine protease with potassium channel blocking and potential antitumor activities. *Sci Rep*. 2020 Mar 11;10(1):4476. doi: 10.1038/s41598-020-61258-x. PMID: 32161292; PMCID: PMC7066243..

Brogden K.A., Bates A.M., Fischer C.L. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases. Springer; Cham, Switzerland: 2016. Antimicrobial Peptides in Host Defense: Functions Beyond Antimicrobial Activity; pp. 129–146.

Budnik, B A; Olsen, J V; Egorov, T A; *et al.* De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. Journal of Mass Spectrometry, v. 39, n. 2, p. 193–201, 2004.

Budnik, B. A., Olsen, J. V., Egorov, T. A., Anisimova, V. E., Galkina, T. G., Musolyamov, A. K., Grishin, E. V. Zubarev, R. A. 2003. De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. Journal of Mass Spectrometry, 39(2): 193 – 201.

Chagot, B., Escoubas, P., Villegas, E., Bernard, C., Ferrat, G., Corzo, G., Lazdunski, M., Darbon, H. (2004). Solution structure of Phrixotoxin 1, a specific peptide inhibitor of Kv4 potassium channels from the theraphosid spider *Phrixotrichus auratus*. Protein Science, 13(5): 1197-1208.

Chung EH, et al. Molecular cloning of two cDNAs encoding an insecticidal toxin from the spider, *Araneus ventricosus*, and construction of a recombinant baculovirus expressing a spider toxin. Int J Indust Entomol. 2002;4(1):43-9.

Ciccone R, Piccialli I, Grieco P, Merlino F, Annunziato L, Pannaccione A. Synthesis and Pharmacological Evaluation of a Novel Peptide Based on *Anemonia sulcata* BDS-I Toxin as a New KV3.4 Inhibitor Exerting a Neuroprotective Effect Against Amyloid- β Peptide. Front Chem. 2019 Jul 9;7:479. doi: 10.3389/fchem.2019.00479. PMID: 31338361; PMCID: PMC6629785.

Coddington JA, Levi HW. Systematics and evolution of spiders (Araneae). Annu Rev Ecol Syst. 1991;22:565-92.

Corzo, G., Escoubas, P. (2003). Pharmacologically active spider peptide toxins. Cellular and Molecular Life Sciences, 60: 2409-2426.

Craik D.J. , Daly N.L., Waine C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon*. 2001 ;39(1):43-60.

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.

Doyle DA, et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 1998;280(5360):69-77.

Escoubas, P., Corzo, G., Whiteley, B.J., Célérier, M.L., Nakajima, T. (2002a). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation of tarantula spider venoms. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16: 403-413.

Escoubas, P., Diochot, S., Célérier, M.L., Nakajima, T., Lazdunski, M. (2002b). Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Molecular Pharmacology*, 62(1): 48-57.

Escoubas, P., L. Rash. 2004. Tarantulas: Eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*. 43:555–574. doi:10.1016/j.toxicon.2004.02.007.

Escoubas, P., Sollod, B., King, G. F. 2006. Venom landscapes: Mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*, 47: 650 – 663.

Espinoza-Culupú A, Mendes E, Vitorino HA, da Silva PI Jr, Borges MM. Mygalin: An Acylpolyamine With Bactericidal Activity. *Front Microbiol.* 2020 Jan 10;10:2928. doi: 10.3389/fmicb.2019.02928. PMID: 31998255; PMCID: PMC6965172.

Estrada, G., Villegas, E., Corzo, G. (2007). Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Natural Product Reports*, 24: 145-161.

Fernandes, S. **Caracterização química e biológica de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira *Nhandu coloratovillosus* (Schmidt, 1998)**. Dissertação (Mestrado em toxicologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Biologia Animal, Universidade de Brasília. Brasília, p. 103. 2010.

Finol-Urdaneta RK, Belovanovic A, Micic-Vicovac M, Kinsella GK, McArthur JR, Al-Sabi A. Marine Toxins Targeting Kv1 Channels: Pharmacological Tools and Therapeutic Scaffolds. *Mar Drugs*. 2020 Mar 20;18(3):173. doi: 10.3390/md18030173. PMID: 32245015; PMCID: PMC7143316.

Fitches E, et al. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *J Insect Physiol*. 2004;50(1):61-71.

Gamper, N.; Wang, K.. **Pharmacology of Potassium Channels**. [s.l.]: Springer Nature, 2021.

GARCIA, Alessa Bembom. Busca pelo alvo molecular do peptídeo Ap1a isolado da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*. 2018. 95 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Gilquin B, Racapé J, Wrisch A, Visan V, Lecoq A, Grissmer S, Ménez A, Gasparini S. Structure of the BgK-Kv1.1 complex based on distance restraints identified by double mutant cycles. Molecular basis for convergent evolution of Kv1 channel blockers. *J Biol Chem*. 2002 Oct 4;277(40):37406-13. doi: 10.1074/jbc.M206205200. Epub 2002 Jul 19. PMID: 12133841.

Gimenez GS. Caracterização bioquímica e toxicológica do veneno da aranha *Parawixia bistriata*: Isolamento de uma enzima proteolítica. Porto Velho: Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia; 2013.

Guharay F, Sachs F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol*. 1984;352:685-701.

Guyton, Arthur Clifton. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier., 2006

Haerberli S, Kuhn-Nentwig L, Schaller J, Nentwig W. Characterization of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Toxicon*. 2000;38(3):373-80.

Haupt, J. (2005). Taxonomy of spiders. *Toxin reviews*, 24: 249-256.

Herrington J, Zhou YP, Bugianesi RM, Dulski PM, Feng Y, Warren VA, Smith MM, Kohler MG, Garsky VM, Sanchez M, Wagner M, Raphaelli K, Banerjee P, Ahaghotu C, Wunderler D, Priest BT, Mehl JT, Garcia ML, McManus OB, Kaczorowski GJ, Slaughter RS. Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic beta-cells enhance glucose-dependent insulin secretion. *Diabetes*. 2006 Apr;55(4):1034-42. doi: 10.2337/diabetes.55.04.06.db05-0788.

Herzig V, King GF. The neurotoxic mode of action of venoms from the spider family Theraphosidae. In: Nentwig W, editor. *Spider Ecophysiology*. 1st ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2013. part. V, p. 203-15.

Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3ª Edição. Universidade de Washington Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2001.

Jonathan A. Coddington Herbert W. Levi Systematics and Evolution of Spiders (Araneae), *Annual Review of Ecology and Systematics* 1991 22:1, 565-592

Jung HJ, et al. Lipid membrane interaction and antimicrobial activity of GsMTx-4, an inhibitor of mechanosensitive channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(2):633-8.

Jung HJ, Lee JY, Kim SH, Eu YJ, Shin SY, Milescu M, Swartz KJ, Kim JI. Solution structure and lipid membrane partitioning of VSTx1, an inhibitor of the KvAP potassium channel. *Biochemistry*. 2005 Apr 26;44(16):6015-23. doi: 10.1021/bi0477034. PMID: 15835890.

Khan ZU, Ahmad S, Al-Obaid I, Al-Sweih NA, Joseph L, Farhat D. Emergence of resistance to amphotericin B and triazoles in *Candida glabrata* vaginal isolates in a case of recurrent vaginitis. *J Chemother.* 2008;20(4):488-91.

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.

Kozlov SA, Vassilevski AA, Feofanov AV, Surovoy AY, Karpunin DV, Grishin EV. Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaei* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *J Biol Chem.* 2006;281(30):20983-92.

Kuhn-Nentwig L, Lischer HEL, Pekár S, Langenegger N, Albo MJ, Isaia M, Nentwig W. Linear Peptides-A Combinatorial Innovation in the Venom of Some Modern Spiders. *Front Mol Biosci.* 2021 Jul 6;8:705141. doi: 10.3389/fmolb.2021.705141. PMID: 34295924; PMCID: PMC8290080.

Kuhn-Nentwig, L., R. Stöcklin, and W. Nentwig. 2011. Venom Composition and Strategies in Spiders. In *Advances in Insect Physiology.* 1–86.

Kuzmenkov AI, Grishin EV, Vassilevski AA. Diversity of Potassium Channel Ligands: Focus on Scorpion Toxins. *Biochemistry (Mosc).* 2015 Dec;80(13):1764-99. doi: 10.1134/S0006297915130118. PMID: 26878580.

Langenegger N, Nentwig W, Kuhn-Nentwig L. Spider Venom: Components, Modes of Action, and Novel Strategies in Transcriptomic and Proteomic Analyses. *Toxins (Basel).* 2019 Oct 22;11(10):611. doi: 10.3390/toxins11100611. PMID: 31652611; PMCID: PMC6832493.

Lau CHY, King GF, Mobli M. Molecular basis of the interaction between gating modifier spider toxins and the voltage sensor of voltage-gated ion channels. *Sci Rep.* 2016 Sep 28;6:34333. doi: 10.1038/srep34333. PMID: 27677715; PMCID: PMC5039624.

Lee S, Milesescu M, Jung HH, Lee JY, Bae CH, Lee CW, Kim HH, Swartz KJ, Kim JI. Solution structure of GxTX-1E, a high-affinity tarantula toxin interacting with voltage sensors in Kv2.1 potassium channels . *Biochemistry*. 2010 Jun 29;49(25):5134-42. doi: 10.1021/bi100246u. PMID: 20509680; PMCID: PMC2918519.

Li-Smerin Y, Swartz KJ. Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca²⁺ and K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8585-9. doi: 10.1073/pnas.95.15.8585. PMID: 9671721; PMCID: PMC21119.

Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*. 2005 Aug 5;309(5736):897-903. doi: 10.1126/science.1116269. Epub 2005 Jul 7. PMID: 16002581.

Lucas SM, Da Silva Júnior PI, Bertani R, Cardoso JL. Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of São Paulo, Brazil. *Toxicon*. 1994 Oct;32(10):1211-5. doi: 10.1016/0041-0101(94)90350-6. PMID: 7846691..

Lüddecke T, Dersch L, Schulte L, Hurka S, Paas A, Oberpaul M, Eichberg J, Harges K, Klimpel S, Vilcinskis A. Functional Profiling of the A-Family of Venom Peptides from the Wolf Spider *Lycosa shansia*. *Toxins (Basel)*. 2023 Apr 22;15(5):303. doi: 10.3390/toxins15050303. PMID: 37235338; PMCID: PMC10221074.

Dauplais M, Lecoq A, Song J, Cotton J, Jamin N, Gilquin B, Roumestand C, Vita C, de Medeiros CL, Rowan EG, Harvey AL, Ménez A. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *J Biol Chem*. 1997 Feb 14;272(7):4302-9. doi: 10.1074/jbc.272.7.4302. PMID: 9020148.

MacKinnon R, Cohen SL, Kuo A, Lee A, Chait BT. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science*. 1998;280(5360):106-9

Mats A.L. Eriksson ; Roux, Benoit. Modeling the Structure of Agitoxin in Complex with the Shaker K⁺ Channel: A Computational Approach Based on Experimental Distance Restraints

Extracted from Thermodynamic Mutant Cycles. *Biophysical Journal*, v. 83, n. 5, p. 2595–2609, 2002.

Mazucca M, et al. A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat Neurosci*. 2007;10(8):943-5.

Mccormick, K. D. And Meinwald, J. 1993. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. *Journal of Chemical Ecology*, 19(10): 2411 – 1451.

Medeiros AC, Medeiros P, Ruggiero RN, De Gregorio D, Gobbi G, Silva Júnior PI, Dos Santos WF, Coimbra NC, de Freitas RL. *Acanthoscurria gomesiana* spider-derived Mygalin in the prelimbic prefrontal cortex modulates neuropathic pain and depression comorbid. *J Biochem Mol Toxicol*. 2023 Jul;37(7):e23353. doi: 10.1002/jbt.23353. Epub 2023 Apr 17. PMID: 37069807.

Mello-Leitão, C. F. (1923). Theraphosidae do Brasil. *Revista Do Museu Paulista* 13: 1-, 438.

Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol*. 2000;1(4):REVIEWS0004. doi: 10.1186/gb-2000-1-4-reviews0004. Epub 2000 Oct 13. PMID: 11178249; PMCID: PMC138870.

Miller, C. The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides. *Neuron*, v. 15, n. 1, p. 5–10, 1995.

Mouhat S, Andreotti N, Jouirou B, Sabatier JM. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr Pharm Des*. 2008;14(24):2503-18. doi: 10.2174/138161208785777441. PMID: 18781998.

Mourão, C. B. F. 2012. **Prospecção de peptídeos neuroativos da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis***. Dissertação (Mestrado em toxicologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Biologia Animal, Universidade de Brasília. Brasília, p. 153 2012

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.

Nentwig W, Kuhn-Nentwig L. Main components of spiders venoms. In: Nentwig W, editor. *Spider Ecophysiology*. 1st ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2013. part. V, p. 191-202

Nicholson, G. M. 2006. Spider venoms peptides. In: Kastin, A. J. (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides*. Academic Press, San Diego CA, pp. 389 – 399.

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

Nunes KP, et al. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. *Toxicon*. 2008;51(7):1197-206.

Pimenta AM, de Lima M. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *J Pept Sci*. 2005;11(11):670-6.

Rash, L.D., Hodgson, W.C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, 40: 225-254.

Ruta V, Jiang Y, Lee A, Chen J, MacKinnon R. Functional analysis of an archaeobacterial voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):180-5. doi: 10.1038/nature01473. Epub 2003 Mar 2. PMID: 12629550.

Imperial JS, Bansal PS, Alewood PF, Daly NL, Craik DJ, Sporning A, Terlau H, López-Vera E, Bandyopadhyay PK, Olivera BM. A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and

nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry*. 2006 Jul 11;45(27):8331-40. doi: 10.1021/bi060263r. PMID: 16819832.

Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell*. 1995 Apr 21;81(2):299-307. doi: 10.1016/0092-8674(95)90340-2. PMID: 7736582.

Sanguinetti, M.C., Johnson, J.H., Hammerland, L.G., Kelbaugh, P.R., Volkmann, R.A., Saccomano, N.A., Mueller, A.L. (1997). Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Molecular Pharmacology*, 51(3): 491-498

Santos GX, Dos SantosTeodoro JE, Fonseca MG, Acunha RM, da Silva Júnior PI, Reis LMD, de Freitas RL, Medeiros P. Mygalin, an *Acanthoscurria gomesiana* spider-derived synthetic, modulates haloperidol-induced cataleptic state in mice. *Neurosci Lett*. 2024 Jan 18;820:137572. doi: 10.1016/j.neulet.2023.137572. Epub 2023 Dec 9. PMID: 38072029.

Savarin P, Guenneugues M, Gilquin B, Lamthanh H, Gasparini S, Zinn-Justin S, Ménez A. Three-dimensional structure of kappa-conotoxin PVIIA, a novel potassium channel-blocking toxin from cone snails. *Biochemistry*. 1998 Apr 21;37(16):5407-16. doi: 10.1021/bi9730341. PMID: 9548922.

Schmidt D, MacKinnon R. Voltage-dependent K⁺ channel gating and voltage sensor toxin sensitivity depend on the mechanical state of the lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 9;105(49):19276-81. doi: 10.1073/pnas.0810187105. Epub 2008 Dec 2. PMID: 19050073; PMCID: PMC2614752.

Silva Junior PI, Daffre S, Bulet P. Isolation and full characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33464-70.

Srinivasan, Kellathur & Sivaraja, Vaithiyalingam & Huys, Isabelle & Sasaki, Toru & Cheng, Betty & Kumar, Thallampuranam & Sato, Kazuki & Tytgat, Jan & Yu, Chin & Chia, Brian &

Ranganathan, Shoba & Bowie, H & Kini, Ramachandra & Gopalakrishnakone, Ponnampalam. (2002). Kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *The Journal of biological chemistry*. 277. 30040-7. 10.1074/jbc.M111258200.

Strømgaard, K., Jensen, L.S., Vogensen, S.B. (2005). Polyamine toxins: development of selective ligands for ionotropic receptors. *Toxicon*, 45: 249-254.

Swartz, K.J., Mackinnon, R. (1995). An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron*, 15(4): 941-949.

Tedford HW, Sollod BL, Maggio F, King GF. Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. *Toxicon*. 2004;43(5):601-18.

Tibery, Diogo V. **Peptídeos isolados da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*: caracterização da atividade eletrofisiológica em canais iônicos dependentes de voltagem.** Dissertação (Mestrado em neurofarmacologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Biologia Animal, Universidade de Brasília. Brasília,p. 89 2020

Tibery, Diogo; Barro, Adolfo Carlos; Mourão, Caroline; *et al.* Purification and characterization of peptides Ap2, Ap3 and Ap5 (ω -toxins) from the venom of the Brazilian tarantula *Acanthoscurria paulensis*. *ScienceDirect*, v. 145, p. 170622–170622, 2021.

Ushkaryov YA, Volynski KE, Ashton AC. The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon*. 2004;43(5):527-42.

Vassilevski, A.A., Kozlov, S.A., Grishin, E.V. (2009). Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry (Moscow)*, 74(13): 1505-1534.

Villegas, E.; Corzo, G. 2005. Pore forming peptides from Spiders. *Toxin Reviews*, 24: 347 – 359.

Wang, X., Connor, M., Smith, R., Maciejewski, M.W., Howden, M.E., Nicholson, G.M., Christie, M.J., King, G.F. (2000). Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. *Nature Structural Biology*, 7(6): 505-513.

Wickenden, Alan D. K⁺ channels as therapeutic drug targets. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 94, n. 1-2, p. 157–182, 2002.

Windley MJ, Herzig V, Dziemborowicz SA, Hardy MC, King GF, Nicholson GM. Spidervenom peptides as bioinsecticides. *Toxins*. 2012;4(3):191-227.

Xiao Y, Tang J, Yang Y, Wang M, Hu W, Xie J, Zeng X, Liang S. Jingzhaotoxin-III, a novel spider toxin inhibiting activation of voltage-gated sodium channel in rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2004 Jun 18;279(25):26220-6. doi: 10.1074/jbc.M401387200. Epub 2004 Apr 14. PMID: 15084603.

Yan L, Adams ME. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J Biol Chem*. 1998;273(4):2059-66.

Yeaman, M. R., Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptides action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55: 27-55.

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, Chun-Hua; HE, Quan-Yuan; PENG, Kuan; *et al.* Discovery of a Distinct Superfamily of Kunitz-Type Toxin (KTT) from Tarantulas. *PLOS ONE*, v. 3, n. 10, p. e3414–e3414, 2008.

Yuan C, Liao Z, Zeng X, Dai L, Kuang F, Liang S. Jingzhaotoxin-XII, a gating modifier specific for Kv4.1 channels. *Toxicon*. 2007 Oct;50(5):646-52. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.05.009. Epub 2007 Jun 3. PMID: 17631373.

Yuan C, Yang S, Liao Z, Liang S. Effects and mechanism of Chinese tarantula toxins on the Kv2.1 potassium channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jan 19;352(3):799-804. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.086. Epub 2006 Nov 27. PMID: 17150181.

Zeng X, Deng M, Lin Y, Yuan C, Pi J, Liang S. Isolation and characterization of Jingzhaotoxin-V, a novel neurotoxin from the venom of the spider *Chilobrachys jingzhao*. *Toxicon*. 2007 Mar 1;49(3):388-99. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.10.012. Epub 2006 Nov 6. PMID: 17157888.

Zhang Y, Luo J, He J, Rong M, Zeng X. JZTX-V Targets the Voltage Sensor in Kv4.2 to Inhibit Ito Potassium Channels in Cardiomyocytes. *Front Pharmacol*. 2019 Apr 16;10:357. doi: 10.3389/fphar.2019.00357. PMID: 31040778; PMCID: PMC6476928.

Zhou, Ming & Morais-Cabral, Joao & Mann, S. & MacKinnon, Roderick. (2001). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature*. 411. 657-61. 10.1038/35079500.