



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Laboratório de Toxinologia



CAROLINE BARBOSA FARIAS MOURÃO

**Prospecção de peptídeos neuroativos da
peçonha da aranha caranguejeira
*Acanthoscurria paulensis***

Brasília

2012

CAROLINE BARBOSA FARIAS MOURÃO

**Prospecção de peptídeos neuroativos da
peçonha da aranha caranguejeira
*Acanthoscurria paulensis***

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

Orientadora: Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz

Brasília

2012



Dissertação de Mestrado

Caroline Barbosa Farias Mourão

Título:

**“Prospecção de peptídeos neuroativos da peçonha da aranha
caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*”**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Elisabeth Ferroni Schwartz
Presidente / Orientadora
UnB

Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
UFMG

Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
UFMG

Prof. Dr. Márcia Renata Mortari
Membro Suplente
Interno Vinculado ao Programa
UnB

Brasília, 14 de fevereiro de 2012.

À minha mãe, Jaqueline Barbosa, pelo apoio incondicional.

À minha família, meu exemplo e suporte.

Ao Lucas Caridade, por todo o carinho.

À Dra. Elisabeth Schwartz, que proporcionou a realização deste projeto.

*À Toxinologia, que por envolver áreas tão diversas e complementares, nos permite
enjoar temporariamente de uma enquanto nos divertimos com outra.*

Agradecimentos

Primeiramente à minha querida mãe, pelo amor, suporte, incentivo e por ter sempre apoiado minhas escolhas acadêmicas.

A toda minha família, pelo exemplo de união, suporte e por estarem sempre presentes. Ao meu primo Pedro Henrique pela ajuda em campo.

Ao Lucas Caridade, pelo amor, companheirismo e motivação. Obrigada por fazer tudo parecer mais simples e por ser tão paciente.

À Dra. Elisabeth Schwartz, pela orientação, incentivo, sugestões, e pela confiança depositada em mim. Obrigada pela oportunidade.

Ao Dr. Carlos Bloch Jr., do Laboratório de Espectrometria de Massas – EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, por permitir acesso ao laboratório e pelos ensinamentos e sugestões ao longo desses anos. Ao Eder Barbosa, pela amizade e por me auxiliar em todos os sequenciamentos *de novo* realizados neste trabalho. Ao Dr. Luciano P. Silva pelas conversas e aprendizados. À Dra. Maura Prates pela disponibilidade e ajuda com cromatografias, e aos demais colegas do laboratório.

Ao Dr. Frank Marí, do Departamento de Química e Bioquímica da *Florida Atlantic University* (FAU), EUA, pela oportunidade de aprender um novo ensaio eletrofisiológico e por todo o auxílio, proporcionando um ótimo período de intercâmbio cultural e científico. À sua aluna Mari Heghinian, por me auxiliar diariamente com os ensaios e pelos momentos de diversão, e aos demais integrantes do laboratório. À Lynn Kay e sua família, por me receberem em sua casa e por todo o carinho.

Ao Dr. Lourival Possani e à Dra. Rita Restano-Cassulini, do Instituto de Biotecnologia da *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM), México, pela colaboração e realização de ensaios eletrofisiológicos e sequenciamento N-terminal. Ao Dr. Ernesto Ortiz, pela amizade, pela grande ajuda com a biblioteca de cDNA e por todos os ensinamentos em Biologia Molecular.

À Dra. Andréa Maranhão e à Dra. Ildinete Pereira, do Laboratório de Biologia Molecular da UnB, pelas sugestões durante a construção da biblioteca de cDNA. Ao Dr. Marciano Rubini e às alunas Natália Bittencourt e Tatiane Costa, pelo auxílio com as células competentes e eletroforese. Ao Thompson Tomatieli, pela amizade e auxílio técnico.

Ao Dr. Paulo Motta, do Laboratório de Aracnídeos da UnB, pelo auxílio da identificação das aranhas.

Ao Dr. Antonio Sebben, do Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados (LACV) da UnB, pela convivência, empréstimo de materiais e auxílio no ensaio em coração de rã. Ao Dr. Leandro Ambrósio e Pedro Ivo Pellicano pela amizade, conversas e auxílio em campo.

Aos professores do Laboratório de Toxinologia (LTx) da UnB. Ao Dr. Carlos Schwartz, pela convivência e pela ajuda em diversas fases do Mestrado, em especial no ensaio em coração de rã. Ao Dr. Osmino Pires Jr., pelas conversas e pelo auxílio com cromatografias. À Dra. Márcia Mortari pelo auxílio com ensaios farmacológicos e análises estatísticas, e por toda colaboração e sugestões durante o desenvolvimento deste projeto.

À Thalita Soares, por ter me ensinado minhas primeiras práticas de laboratório e por me acompanhar nas novas descobertas da Biologia Molecular, pelo auxílio nas saídas de campo e no ensaio inseticida, pelas conversas, momentos de descontração e pela amizade.

Ao Jimmy Guerrero Vargas e Fagner Oliveira, pela amizade e auxílio em diversos momentos. Ao Harry Morales e Claudia Jimena pela companhia, auxílio e pela produção de células competentes. Às queridas toxólogas Pollyanna Campos, Natiela Oliveira, Solange Rego, Janaína Starling, Édelyn Cristina e Carla Vizzotto, pela amizade e colaborações. Ao Rafael Melani, pelo auxílio na extração de peçonha e ensaio em coração de rã. Às meninas da Farmacologia: Lucianna Couto, Lilian dos Anjos, Jacqueline Gonçalves, Priscilla Galante, Cecília Mourão, Flávia Medeiros, Juliana de Castro e Dr. Karla Moreira, pelo auxílio com ensaios farmacológicos e por animarem o ambiente. Aos colegas Christiano Gati, Flávio Dourado e a todos que passaram pelo LTx e que, de alguma forma, permanecem presentes.

Aos colegas e alunos da disciplina “Farmacologia de Princípios Ativos de Origem Animal”: Jéssica Macêdo, Andréa Carvalho, Harry Morales, Claudia Jimena, Jacqueline Gonçalves e Priscilla Galante, pelo auxílio com os ensaios de atividade com a peçonha bruta.

Ao Washington Oliveira e Valter César, pelo apoio técnico. Ao Luiz Rios, pela incrível ajuda com a coleta de aranhas.

A todos os meus amigos, biólogos e não biólogos, que fazem a minha vida mais feliz e que estiveram sempre na torcida. Vocês são essenciais!

À CAPES, pela concessão da bolsa. Ao DPP pelo auxílio à pesquisa de campo (Edital 06/2010). À RECOR-IBGE pela autorização para coleta. À Rede Pró-Centro-Oeste Inovatoxin (CNPq), com a qual esta pesquisa esteve vinculada.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, por possibilitarem a execução deste projeto.

Resumo

Aranhas produzem em sua peçonha uma complexa mistura de moléculas, as quais, devido a seus potenciais neurotóxicos, têm despertado o interesse para a prospecção de novos fármacos e pesticidas. No entanto, poucos estudos são realizados com a peçonha de aranhas caranguejeiras, em especial de espécies encontradas no Brasil. O presente estudo teve como objetivo a caracterização da peçonha bruta da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis* em busca de peptídeos neuroativos, sendo este o primeiro estudo completo realizado com essa peçonha. A peçonha de *A. paulensis* apresentou um total de 58 frações cromatográficas e 97 massas moleculares distintas, variando de m/z 601,4 a 21.932,3. A dose letal média em camundongos foi de $25,45 \pm 2,42 \mu\text{g/g}$. Nos ensaios em coração de rã (coração *in situ* e fatias isoladas de ventrículo), a peçonha bruta e a “fração de baixa massa molecular” (FBMM) promoveram efeitos semelhantes ao do estímulo vagal, os quais foram bloqueados na presença de atropina, um antagonista muscarínico. A fração protéica (FP) da peçonha não apresentou atividade similar nessas preparações. Um peptídeo denominado Ap1a, eluído aos 41% de acetonitrila no fracionamento da peçonha bruta, foi isolado e caracterizado. A sequência precursora da Ap1a apresentou um peptídeo sinal e pró-peptídeo contendo 23 e 27 resíduos de aminoácidos, respectivamente, e 48 resíduos de aminoácidos, com seis cisteínas, referentes ao peptídeo maduro. Esse peptídeo, com massa molecular monoisotópica ($[M+H]^+$) de 5.457,79, apresentou de 60 a 84% de identidade com toxinas da família da HWTX-II. Diferentemente do padrão estrutural proposto para essas toxinas, a Ap1a apresentou um arranjo das pontes dissulfeto típico do motivo ICK. A Ap1a induziu um efeito paralítico dependente da dose em lagartas *Spodoptera frugiperda*, com DE_{50} de $13,01 \pm 4,21 \mu\text{g/g}$. No circuito da Fibra Gigante de *Drosophila melanogaster*, a Ap1a causou a redução de frequência e amplitude nas respostas das vias GF-TTM e GF-DLM, indicando uma ação na junção neuromuscular de *Drosophila*, a qual é mediada por receptores glutamatérgicos. A Ap1a foi também letal a camundongos ($30 \mu\text{g/animal}$ via intracranial), causando hipermotilidade com movimentos circulares e saltos e crises tônicas generalizadas com *status epilepticus* e morte entre 25 e 35 min, sendo esses efeitos semelhantes aos reportados com a administração via i.c.v. de NMDA, um agonista glutamatérgico. A Ap1a ($1 \mu\text{M}$) não alterou a resposta induzida por acetilcolina na preparação com células de rhabdomiossarcoma, e seus efeitos foram mínimos nos canais $hNa_v1.2$, $hNa_v1.4$, $hNa_v1.5$ e $hNa_v1.6$. Dessa forma, o presente estudo proporcionou a caracterização química e biológica de uma nova molécula neuroativa da peçonha da aranha *A. paulensis*, com possível ação na neurotransmissão glutamatérgica, e também a caracterização da peçonha bruta, mostrando uma grande variedade de compostos que podem ser futuramente estudados visando a melhor compreensão de canais iônicos ou receptores celulares e o desenvolvimento de novos fármacos e pesticidas.

Abstract

Spiders produce in their venoms a complex mixture of molecules which, due to their neurotoxic potential, have raised interest in prospecting new drugs and pesticides. Nevertheless, few studies are carried out with tarantula venoms, especially with species found in Brazil. The present study aimed to characterize the crude venom from *Acanthoscurria paulensis* tarantula venom in search of neuroactive peptides, being this the first complete study performed with this venom. The venom of *A. paulensis* presented a total of 58 chromatographic fractions and 97 different molecular masses ranging from m/z 601.4 to 21,932.3. The median lethal dose in mice was $25.45 \pm 2.42 \mu\text{g/g}$. On the frog heart assays (*in situ* and isolated ventricle slices), the crude venom and the “low molecular mass fraction” (LMMF) promoted effects similar to vagal stimulation, which were blocked in the presence of atropine, a muscarinic antagonist. The proteic fraction did not show similar effects on frog heart tissue. A peptide named Ap1a, eluted with 41% acetonitrile in the crude venom fractionation was isolated and characterized. The Ap1a showed 48 amino acid residues, with six cysteines, and a precursor sequence showing a signal peptide and pro-peptide containing 23 and 27 residues, respectively. This peptide, with a monoisotopic molecular mass ($[M+H]^+$) of 5457.79, presented 60 to 84% identity with toxins from the HWTX-II family. Unlike the structural pattern proposed for these toxins, Ap1a presented an arrangement of disulfide bonds typical of the ICK motif. The Ap1a induced a dose-dependent paralytic effect in *Spodoptera frugiperda* caterpillars, with an ED_{50} of $13.01 \pm 4.21 \mu\text{g/g}$. In the *Drosophila melanogaster* Giant Fiber circuit, Ap1a has reduced both the amplitude and frequency of responses from GF-TTM and GF-DLM pathways, indicating an action at the *Drosophila* neuromuscular junction, which is mediated by glutamatergic receptors. The Ap1a was also lethal to mice ($30 \mu\text{g}/\text{animal}$ by intracranial route), causing hypermotility with circular and jump movements and generalized tonic seizures with *status epilepticus* and death between 25 and 35 min. These effects were similar to those reported with the administration by i.c.v. route of NMDA, a glutamatergic agonist. The Ap1a ($1 \mu\text{M}$) did not alter the response induced by acetylcholine on the rhabdomyosarcoma cells preparation, and it presented minimal effects on hNav1.2, hNav1.4, hNav1.5 and hNav1.6 channels. Thus, this study provided chemical and biological characterization of a new neuroactive molecule from *A. paulensis* spider venom, with possible action on glutamatergic neurotransmission, and also the crude venom characterization, showing a wide variety of compounds that can be further studied in order to better understanding ion channels or cell receptors and to the design of new drugs and pesticides.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Orientação e plano de movimento das quelíceras de aranhas: (A) ortognata e (B) labidognata.	18
Figura 2. Estruturas de acilpoliaminas caracterizadas da peçonha de aranhas.....	21
Figura 3. Comparação dos motivos estruturais de toxinas de aranhas caranguejeiras.	28
Figura 4. Alinhamento por ClustalW de toxinas peptídicas conhecidas de aranhas caranguejeiras em conformidade com os motivos ICK (A) ou DDH (B).....	29
Figura 5. Representação esquemática das subunidades de um canal Na _v	30
Figura 6. Alinhamento de sequências de toxinas peptídicas de aranhas que atuam em canais iônicos dependentes de voltagem.	46
Figura 7. Fêmea de <i>Acanthoscurria paulensis</i> (Theraphosidae).....	48
Figura 8. Distribuição geográfica descrita para <i>A. paulensis</i>	49
Figura 9. Mapa do vetor linearizado pSMART2IF e sítio de clonagem In-Fusion.....	61
Figura 10. Sistema da Fibra Gigante (GFS) de <i>Drosophila melanogaster</i>	69
Figura 11. Perfil cromatográfico de 5,0 mg da peçonha bruta da aranha <i>A. paulensis</i>	73
Figura 12. Perfil cromatográfico de 1,0 mg da peçonha bruta da aranha <i>A. paulensis</i>	74
Figura 13. Distribuição das massas moleculares dos compostos presentes na peçonha de <i>A. paulensis</i> em função das frações cromatográficas obtidas em RP-HPLC em coluna Phenomenex C18 semipreparativa.	75
Figura 14. Frequência das massas moleculares obtidas das frações cromatográficas da peçonha de <i>A. paulensis</i>	75
Figura 15. Curva dose-resposta obtida a partir de injeções i.p. em camundongos da peçonha de <i>A. paulensis</i>	77
Figura 16. Efeitos do estímulo vagal e da peçonha bruta de <i>A. paulensis</i> em coração de rã <i>in situ</i>	78
Figura 17. Registro da contração cardíaca ventricular após tratamentos com acetilcolina (ACh, 0,25 µg), peçonha bruta de <i>A. paulensis</i> (50 µg), fração protéica (FP – 50 µg), fração de baixa massa molecular (FBMM – 12,5 µg) e peçonha bruta (50 µg) na presença de atropina (2 µg).....	79
Figura 18. Purificação do peptídeo Ap1a e sua massa molecular.	80
Figura 19. Estrutura primária do peptídeo Ap1a e diferentes estratégias utilizadas para sua elucidação.....	81
Figura 20. Sequenciamento MS/MS do íon <i>m/z</i> 2.104,97 obtido após redução, alquilação e digestão parcial por Glu-C do peptídeo Ap1a.....	82

Figura 21. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 3.548,48 obtido após redução, alquilação e digestão parcial por Glu-C do peptídeo Ap1a.....	83
Figura 22. Sequência de nucleotídeos e predição da sequência de aminoácidos de Ap1a.	85
Figura 23. Alinhamento da sequência putativa do peptídeo Ap1a com sequências putativas que codificam toxinas de outras aranhas da família Theraphosidae.....	86
Figura 24. Alinhamento da sequência peptídica de Ap1a com toxinas isoladas da peçonha de aranhas caranguejeiras.	87
Figura 25. Cromatografia por RP-HPLC da fração Ap1a digerida com pepsina (A) e análise de massa da fração P1 em micrOTOF-Q II (B).	88
Figura 26. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 1.286,52, referente à ligação C _I -C _{IV} , obtido após digestão com pepsina e tripsina.	90
Figura 27. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 624,29, o qual contém a cisteína C _I , obtido após redução do fragmento $[M+H]^+ = 1.286,52$	91
Figura 28. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 665,27, o qual contém a cisteína C _{IV} , obtido após redução do fragmento $[M+H]^+ = 1.286,52$	91
Figura 29. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 1.102,52, referente à ligação C _{II} -C _V , obtido após digestão com pepsina e tripsina.	92
Figura 30. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 855,37, o qual contém a cisteína C _{II} , obtido após redução do fragmento $[M+H]^+ = 1.102,49$	93
Figura 31. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 1.377,70, referente à ligação C _{III} -C _{VI} , obtido após digestão com pepsina e tripsina.	94
Figura 32. Ligação das cisteínas do peptídeo Ap1a.	95
Figura 33. Predição da estrutura secundária da Ap1a realizada por meio da ferramenta disponível no servidor PSIPRED.	96
Figura 34. Curva dose-resposta obtida a partir de injeções i.p. do peptídeo Ap1a de <i>A. paulensis</i> em lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i>	97
Figura 35. Traços eletrofisiológicos representativos dos registros das vias GF-DLM (superior) e GF-TTM (inferior) após estímulo cerebral em uma mosca tipo “selvagem”.	98
Figura 36. Resposta das vias GF-DLM (superior) e GF-TTM (inferior) durante a injeção dos compostos.....	99
Figura 37. Efeitos da administração do peptídeo Ap1a na amplitude das respostas das vias GF-DLM (A) e GF-TTM (B) com doses crescentes de peptídeo.	100
Figura 38. Efeitos da administração do peptídeo Ap1a na frequência das respostas das vias GF-DLM (A) e GF-TTM (B) com doses crescentes de peptídeo.	101
Figura 39. Registro “whole-cell” em modo contínuo da corrente gerada pela ativação dos receptores nicotínicos expressos em células de rbdomiossarcoma da linhagem TE671.....	102

Figura 40. Relação corrente-voltagem para correntes de pico de sódio nos canais hNa_v1.5, hNa_v1.6, hNa_v1.2 e hNa_v1.4 nas condições controle (preto) ou com a aplicação de 1 μM de Ap1a (vermelho)..	103
Figura 41. Estrutura parcial proposta para as acilpoliaminas Apc₆₀₀ e Apc₇₂₈.	105
Figura 42. Possível estrutura secundária da Ap1a.	114

Lista de Tabelas

Tabela 1. Canais de cálcio dependentes de voltagem de vertebrados: classificação e características fisiológicas e farmacológicas..	37
Tabela 2. Exemplos de peptídeos inseticidas isolados da peçonha de aranhas com ação em diferentes canais iônicos.....	42
Tabela 3. Mistura de peptídeos e proteínas para calibração externa no MALDI-TOF/TOF MS.....	54
Tabela 4. Prováveis sítios de clivagem do peptídeo Ap1a com as enzimas pepsina e tripsina.....	64
Tabela 5. Alterações comportamentais e fisiológicas observadas no ensaio de toxicidade.	76
Tabela 6. Determinação das pontes dissulfeto do peptídeo Ap1a.....	89

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abs	absorbância
ACh	acetilcolina
ACN	acetonitrila
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Ca_v	canal de Ca ²⁺ dependente de voltagem
DDH	<i>disulfide-directed β-hairpin</i>
DLM	<i>Dorso Longitudinal Muscle</i> / músculo dorso longitudinal
DTT	ditioltreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> / ácido etilenodiamino tetra-acético
DE₅₀	dose efetiva média
DL₅₀	dose letal média
FP	fração protéica
FBMM	fração de baixa massa molecular
GABA	ácido gama-aminobutírico
GF	<i>Giant Fiber</i> / Fibra Gigante
GFC	<i>Giant Fiber Circuit</i> / Circuito da Fibra Gigante
GFS	<i>Giant Fiber System</i> / Sistema da fibra gigante
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> / cromatografia líquida de alta eficiência
ICK	<i>Inhibitory Cystine Knot</i>
JNM	junção neuromuscular
KA	<i>kainic acid</i> / ácido caínico
K_d	constante de dissociação
K_v	canal de K ⁺ dependente de voltagem
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> / dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz
MM	massa molecular
MS	<i>Mass Spectrometry</i> / espectrometria de massa
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> / espectrometria de massas sequencial
m/z	relação massa/carga
Na_v	canal de Na ⁺ dependente de voltagem
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPV	nucleopoliedrovírus
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PSI	<i>Peripheral Synapsing Interneuron</i> / interneurônio sináptico periférico

RP	<i>Reversed-phase / fase reversa</i>
R_T	tempo de retenção
SE	<i>status epilepticus / estado epiléptico</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TFA	ácido trifluoroacético
TOF	<i>Time of flight / tempo de voo</i>
TTM	<i>Tergo Trochanteral Muscle / músculo do tergotrocâter</i>
TTX	tetrodotoxina
UFLC	<i>Ultra Fast Liquid Chromatograph / cromatógrafo líquido ultra rápido</i>

Tabela de Aminoácidos

Aminoácido	Símbolo de uma letra	Símbolo de três letras	Massa monoisotópica
Ácido aspártico	D	Asp	115.026
Ácido glutâmico	E	Glu	129.042
Alanina	A	Ala	71.0371
Arginina	R	Arg	156.101
Asparagina	N	Asp	114.042
Cisteína	C	Cys	103.009
Fenilalanina	F	Phe	147.068
Glicina	G	Gli	57.0214
Glutamina	Q	Gln	128.058
Histidina	H	His	137.058
Isoleucina	I	Iso	113.084
Leucina	L	Leu	113.084
Lisina	K	Lys	128.094
Metionina	M	Met	131.040
Prolina	P	Pro	97.052
Serina	S	Ser	87.032
Tirosina	Y	Tyr	163.063
Treonina	T	Thr	101.047
Triptofano	W	Trp	186.079
Valina	V	Val	99.0684

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 ARANHAS	17
1.2. COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA DE ARANHAS	19
1.3. COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR	19
1.3.1. <i>Acilpoliaminas</i>	20
1.4. COMPOSTOS PEPTÍDICOS	23
1.4.1. <i>Peptídeos citolíticos lineares</i>	23
1.4.2. <i>Peptídeos neuroativos</i>	24
1.4.2.1. Motivos estruturais de toxinas peptídicas de aranhas	25
1.4.2.2. Peptídeos com ação em canais Na _v	29
1.4.2.3. Peptídeos com ação em canais K _v	33
1.4.2.4. Peptídeos com ação em canais Ca _v	35
1.4.2.5. Peptídeos com ação inseticida	39
1.4.3. <i>Seletividade e promiscuidade de toxinas de aranhas</i>	44
1.5. <i>ACANTHOSCURRIA PAULENSIS</i> MELLO-LEITÃO, 1923	47
1.6. ESTUDOS PRÉVIOS COM A PEÇONHA DE <i>A. PAULENSIS</i>	49
2. JUSTIFICATIVA	51
3. OBJETIVOS	52
3.1. OBJETIVO GERAL	52
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4. MATERIAL	53
4.1. SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	53
4.2. COLUNAS CROMATOGRÁFICAS	53
4.3. SOLUÇÕES PARA ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI TOF/TOF MS)	53
4.4. KITS COMERCIAIS UTILIZADOS	54
4.5. ENZIMAS	54
4.6. OLIGONUCLEOTÍDEOS	55
4.7. SOLUÇÕES PARA ENSAIOS ELETROFISIOLÓGICOS	55
5. MÉTODOS	56
5.1. LICENÇAS E AUTORIZAÇÕES	56
5.2. ANIMAIS E COLETA	56
5.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PEÇONHA	57
5.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA (RP-HPLC)	57
5.4.1. <i>Fracionamento da Peçonha Bruta</i>	57
5.4.2. <i>Purificação de Peptídeos</i>	58
5.5. ESPECTROMETRIA DE MASSA E SEQUENCIAMENTO MS/MS	58
5.6. SEQUENCIAMENTO N-TERMINAL DO PEPTÍDEO AP1A	59
5.7. REDUÇÃO, ALQUILAÇÃO E DIGESTÃO DA AP1A COM GLU-C	59
5.8. BUSCA POR SIMILARIDADE	60
5.9. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE CDNA E ELUCIDAÇÃO DO PRECURSOR DA AP1A	60
5.10. DETERMINAÇÃO DAS PONTES DISSULFETO DO PEPTÍDEO AP1A	62

5.11. PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA AP1A.....	64
5.12. ENSAIOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS COM A PEÇONHA BRUTA	64
5.12.1. <i>Ensaio de Toxicidade em Camundongos</i>	64
5.12.2. <i>Ensaio de Atividade em Coração</i>	65
5.12.2.1. <i>Coração in situ</i>	65
5.12.2.2. <i>Fatias Isoladas de Ventrículo</i>	66
5.13. ENSAIOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS COM O PEPTÍDEO AP1A.....	66
5.13.1. <i>Atividade Inseticida em Lagartas</i>	66
5.13.2. <i>Circuito da Fibra Gigante de Drosophila melanogaster</i>	67
5.13.3. <i>Ensaio em Receptor de Acetilcolina tipo Nicotínico (nAChR)</i>	70
5.13.4. <i>Ensaio de Toxicidade em Camundongos</i>	71
5.13.5. <i>Ação em Canais de Na⁺</i>	71
6. RESULTADOS	73
6.1. ANÁLISES COM A PEÇONHA BRUTA	73
6.1.1. <i>Fracionamento Cromatográfico e Espectrometria de Massa</i>	73
6.1.2. <i>Ensaio de Toxicidade em Camundongos</i>	76
6.1.3. <i>Ensaio de Atividade em Coração</i>	77
6.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DO PEPTÍDEO AP1A	79
6.2.1. <i>Fracionamento Cromatográfico e Espectrometria de Massa</i>	79
6.2.2. <i>Sequenciamento e Similaridades</i>	80
6.2.3. <i>Determinação das Pontes Dissulfeto</i>	87
6.2.4. <i>Predição da Estrutura Secundária da Ap1a</i>	95
6.2.5. <i>Ensaio de Atividade Biológica</i>	96
6.2.5.1. <i>Atividade Inseticida em Lagartas</i>	96
6.2.5.2. <i>Circuito da Fibra Gigante de Drosophila melanogaster</i>	97
6.2.5.3. <i>Receptor de Acetilcolina tipo Nicotínico (nAChR)</i>	101
6.2.5.4. <i>Toxicidade em Camundongos</i>	102
6.2.5.5. <i>Ação em Canais de Na⁺</i>	102
7. DISCUSSÃO	104
7.1. COMPONENTES DA PEÇONHA BRUTA	104
7.2. ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA COM A PEÇONHA BRUTA	106
7.2.1. <i>Toxicidade em Camundongos</i>	106
7.2.2. <i>Atividade em Coração</i>	108
7.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO PEPTÍDEO AP1A	111
7.4. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DO PEPTÍDEO AP1A.....	115
7.4.1. <i>Atividade Inseticida</i>	115
7.4.2. <i>Circuito da Fibra Gigante de Drosophila melanogaster</i>	119
7.4.3. <i>Toxicidade em Camundongos</i>	122
8. CONCLUSÃO	127
9. PERSPECTIVAS	129
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

1. INTRODUÇÃO

1.1 ARANHAS

As aranhas, pertencentes à ordem Araneae (Arthropoda, Arachnida), são um dos mais diversos grupos de animais terrestres, inferior apenas aos insetos, com seu fóssil mais antigo datando de 300 milhões de anos, do período Carbonífero (Rash e Hodgson, 2002). Exploram com sucesso diversos nichos ecológicos em quase todo o ambiente terrestre, além de muitos habitats de água doce e entremarés. Como os demais Cheliceriformes, seu corpo é composto por dois tagmas: o prossoma – cujos apêndices incluem as quelíceras, os pedipalpos e quatro pares de pernas locomotoras, além de conter os olhos – e o opistossoma. Esse abriga a maior parte dos órgãos internos e também as fiandeiras, responsáveis por expelir a seda (Foelix, 1996).

Atualmente são descritas cerca de 42.000 espécies de aranhas, agrupadas em 110 famílias e 3.849 gêneros (Platnick, 2011). A ordem Araneae pode ser dividida em dois grandes grupos. O Mesothelae corresponde ao mais “primitivo”, por reter vários caracteres plesiomórficos, como a persistência da segmentação do opistossoma, e não possui interesse toxicológico, visto que seus integrantes são desprovidos de glândulas de peçonha (Haupt, 2003). O outro grupo, Opisthothelae, possui glândulas de peçonha como característica apomórfica e pode ser dividido em dois outros grupos: Mygalomorphae e Araneomorphae. O primeiro inclui espécies de médio a grande porte, cuja imagem é geralmente representada por espécies da família Theraphosidae, também denominadas de aranhas caranguejeiras, embora haja também representantes de outras famílias, como Dipluridae e Hexathelidae. A denominação “tarântulas”, geralmente utilizada para essas aranhas, é inadequada, visto que tarântulas representam integrantes da família Lycosidae, pertencentes ao grupo das Araneomorphae (Haupt, 2005). Todavia, nos artigos científicos publicados em língua inglesa, essa denominação é bem difundida para membros da família Theraphosidae (Escoubas e Rash, 2004). O segundo grupo – Araneomorphae – abrange mais de 70% do total de aranhas descritas, incluindo as dos gêneros *Latrodectus*, *Loxosceles* e *Phoneutria*, que são aranhas causadoras de acidentes de maior importância clínica no Brasil. Além desses três gêneros, apenas *Atrax* e *Hadronyche* (Hexathelidae), com espécies encontradas na Austrália, são também potencialmente letais a humanos (Isbister e White, 2004).

Migalomorfas e araneomorfas podem ser diferenciadas quanto às quelíceras, as quais correspondem ao primeiro par de apêndices do prossoma (Fig. 1). Cada quelícera consiste de um segmento basal curto e cônico e de um segmento distal duro e curvo, em forma de garra, usualmente com um poro na extremidade para a abertura do duto que segue da glândula de peçonha (Foelix, 1996). Todas as migalomorfas são caracterizadas por quelíceras que se articulam por movimentos paralelos ao eixo do corpo das aranhas (quelíceras ortognatas), enquanto as araneomorfas possuem quelíceras com movimento perpendicular ao eixo do corpo (quelíceras labidognatas).

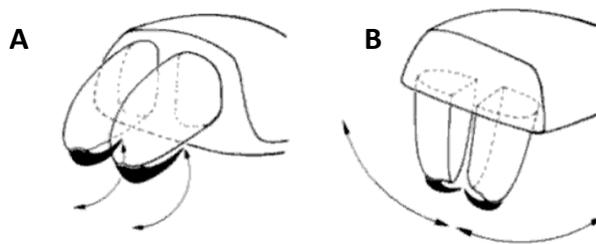


Figura 1. Orientação e plano de movimento das quelíceras de aranhas: (A) ortognata e (B) labidognata. Retirado de Foelix (1996).

As aranhas caranguejeiras (famílias Theraphosidae, subordem Mygalomorphae), apesar do tamanho avantajado, são, em sua maioria, não nocivas à espécie humana. Embora a tendência de serem mais representadas em áreas tropicais ou semi-tropicais, elas apresentam uma diversidade extensa de nichos ecológicos, e, assim como as demais aranhas, alimentam-se de inúmeros invertebrados, incluindo outras aranhas, e pequenos vertebrados. Essa habilidade em capturar grandes presas sem o auxílio de teias implica não apenas em certa força física por parte das caranguejeiras, mas também em uma peçonha com ação rápida e eficiente no sistema nervoso da presa (Escoubas e Rash, 2004). Com aproximadamente 900 espécies catalogadas, as caranguejeiras representam uma pequena parcela do total de espécies de aranhas (Platnick, 2011), entretanto, com o advento de novas técnicas para separação e caracterização da peçonha, elas têm sido reconhecidas como uma importante fonte para o desenvolvimento de novas drogas e pesticidas, tornando-se de grande interesse tanto para a comunidade científica como para as indústrias farmacêuticas e agrônômicas (Escoubas e Rash, 2004).

1.2. COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA DE ARANHAS

As aranhas possuem em sua peçonha uma complexa mistura de sais inorgânicos, nucleotídeos, aminoácidos livres, poliaminas, neurotransmissores, peptídeos e proteínas, entre as quais as enzimas (Jackson e Parks, 1989). A composição da peçonha é espécie-específica, podendo haver variações quanto à origem geográfica, tamanho, idade, estado fisiológico e sexo da aranha (Binford, 2001; Escoubas *et al.*, 2002a; Herzig e Hodgson, 2009). Mais de cem compostos distintos podem ser encontrados em uma única peçonha, e alguns deles podem agir sinergicamente, promovendo maior eficiência de ação da mistura (Vassilevski *et al.*, 2009).

Como a peçonha é utilizada fundamentalmente para paralisar presas e também para a defesa, as aranhas produzem inúmeras toxinas cujos alvos encontram-se no sistema nervoso central ou periférico. Essas neurotoxinas foram identificadas, em sua maioria, como acilpoliaminas e peptídeos modificadores de canais iônicos ou formadores de poro (Estrada *et al.*, 2007), sendo que essas categorias de moléculas representam cerca de dois terços do peso seco da peçonha de aranhas (Corzo *et al.*, 2002). Por se alimentarem predominantemente de insetos, esses são os principais alvos da peçonha de aranhas, o que, juntamente com a alta especificidade e toxicidade dos compostos, tem promovido um interesse da comunidade científica para a geração de novos inseticidas (Nicholson, 2007; King, 2007).

Convencionalmente, os diversos componentes da peçonha de aranhas podem ser divididos em três grupos, de acordo com a sua massa molecular: (i) compostos de baixa massa molecular (< 1 kDa), incluindo acilpoliaminas; (ii) compostos peptídicos (1 – 10 kDa), incluindo peptídeos citolíticos lineares e neurotoxinas com pontes dissulfeto; e (iii) compostos de alta massa molecular (> 10 kDa), incluindo enzimas e neurotoxinas protéicas (Vassilevski *et al.*, 2009). Apenas os dois primeiros grupos serão abordados nesse trabalho.

1.3. COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR

Compostos de baixa massa molecular (< 1 kDa) de diferentes classes de substâncias orgânicas e inorgânicas são encontrados na peçonha de aranhas (Jackson e Parks, 1989).

Várias aminas biogênicas, como serotonina, histamina e noradrenalina, e aminoácidos, dentre os quais taurina e glutamato, além de seu derivado ácido γ -aminobutírico (GABA), são identificados nessas peçonhas (Schroeder *et al.*, 2008; Wullschleger *et al.*, 2005; Kuhn-Nentwig *et al.*, 2002). Muitos desses compostos agem como neurotransmissores ou neuromoduladores no sistema nervoso de insetos, evidenciando, assim, sua importância na peçonha de aranhas, cujo principal alimento são invertebrados da classe Insecta. Além disso, juntamente com a lesão mecânica causada pelas quelíceras no ato da picada e o baixo pH, típico de peçonhas (em torno de pH 5), o efeito dessas aminas biogênicas, adenosina e ATP é responsável pela sensação de dor após a picada (Escoubas e Rash, 2004). Essas aminas também podem aumentar a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo local, contribuindo, dessa forma, para a distribuição dos diferentes compostos da peçonha (Vassilevski *et al.*, 2009).

Adenosina, guanosina, inosina e 2,4,6-trihidroxipurina também são encontradas, como na peçonha de *Latrodectus menavodi* (Horni *et al.*, 2001). Isoladamente, o íon K^+ , presente em alta concentração na peçonha, mostrou-se capaz de causar paralisia na vítima devido à despolarização da membrana de células excitáveis. Agindo em sinergismo com outros compostos, em *Cupiennius salei*, o alto conteúdo desse íon na peçonha aumentou em 20% a atividade inseticida de três neurotoxinas (Wullschleger *et al.*, 2005). Em escorpiões, relatou-se a presença de uma “pré-peçonha”, um líquido transparente secretado antes da liberação da peçonha propriamente dita. Devido à alta concentração de K^+ e de peptídeos, incluindo alguns bloqueadores de canais retificadores de K^+ , essa “pré-peçonha” causa dor e toxicidade, e seria utilizada em certas condições de maneira que o escorpião economizaria peçonha, cuja produção exige maior custo metabólico (Inceoglu *et al.*, 2003).

1.3.1. Acilpoliaminas

Acilpoliaminas são caracterizadas como compostos de baixa massa molecular (< 1 kDa) e caráter hidrofílico que parecem ter evoluído especificamente para a rápida paralisia da presa (Estrada *et al.*, 2007). Sua estrutura comum compreende uma cadeia poliamina central com um grupamento de ácido carboxílico em uma extremidade e um grupamento amino primário ou guanidina na outra (Fig. 2-A). Comumente há um ou dois resíduos de

aminoácidos que conectam o anel aromático à cadeia poliamina, mas este pode estar ausente (McCormick e Meinwald, 1993).

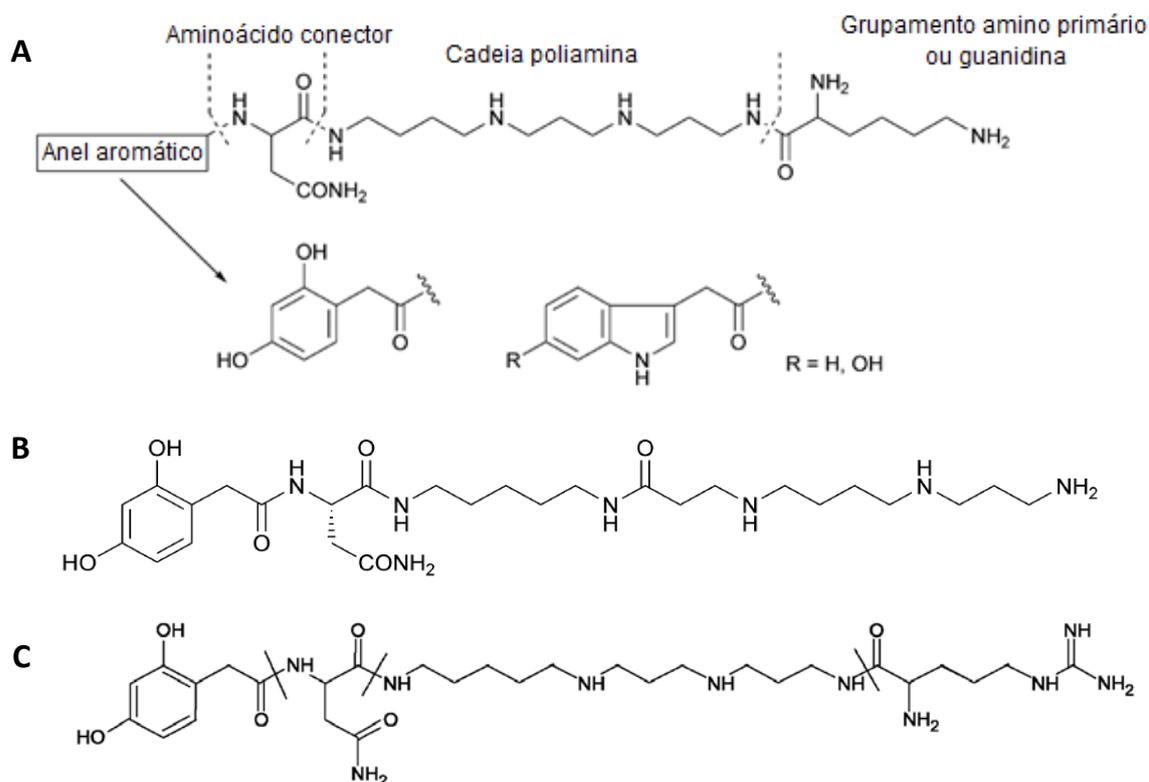


Figura 2. Estruturas de acilpoliaminas caracterizadas da peçonha de aranhas. **(A)** Estrutura básica; **(B)** JSTX-3; e **(C)** argiopina ou Arg-636. Adaptado de Estrada *et al.* (2007) e Vassilevski *et al.* (2009).

Estudos têm demonstrado que esses compostos interagem com vários alvos no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) de insetos e também no SNC de mamíferos, tendo como alvo principal receptores ionotrópicos de glutamato. No SNC de mamíferos, o L-glutamato, ou ácido glutâmico, é o principal neurotransmissor excitatório. Seus receptores podem ser classificados em ionotrópicos, que medeiam potenciais pós-sinápticos rápidos pela ativação direta de canais iônicos seletivos a cátions (K^+ , Na^+ e Ca^{2+}), e receptores metabotrópicos, acoplados a proteínas G. Por sua vez, os receptores ionotrópicos podem ser subdivididos segundo seus respectivos agonistas: receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico, anteriormente designados receptores quisqualato) ou receptores cainato (Ozawa *et al.*, 1998).

Em invertebrados, o glutamato é também um importante neurotransmissor no SNC e o principal transmissor na junção neuromuscular, com funções tanto excitatórias quanto inibitórias (Osborne, 1996). A resposta excitatória, ou despolarizante, é mediada por um canal seletivo a cátion (Na^+), que também é sensível a AMPA. A resposta inibitória, ou hiperpolarizante, é mediada por um canal seletivo a ânion (Cl^-). Ambos os receptores são encontrados tanto no SNC quanto na junção neuromuscular de invertebrados (Rash e Hodgson, 2002). A alta atividade inseticida das acilpoliaminas seria devido a sua ação de bloqueio na junção neuromuscular de insetos, induzindo rápida paralisia.

Em meados de 1980, tomou-se conhecimento de várias toxinas de aranhas que atuam diferencialmente como antagonistas desses receptores glutamatérgicos. Primeiramente, acilpoliaminas foram quimicamente caracterizadas da peçonha das aranhas *Nephila clavata* e *N. maculata* (Aramaki *et al.*, 1986) e também de *Argiope lobata* (Grishin *et al.*, 1986). Blaschke e colaboradores (1993) mostraram que a JSTX-3 (Fig. 2-B), isolada de *N. clavata*, age bloqueando subunidades específicas de receptores ionotrópicos tipo AMPA e cainato. A Arg-636 (Fig. 2-C), denominada argiopina, com 636 Da, isolada da peçonha da *A. lobata*, mostrou-se estruturalmente semelhante à JSTX-3 (Grishin *et al.*, 1986). Priestley e colaboradores (1989) sugeriram que a Arg-636 age como antagonista de receptores NMDA, bloqueando canais iônicos de mamíferos ativados por NMDA em seu estado aberto. A ação em receptores não-NMDA foi cerca de 30 vezes menos seletiva. Acilpoliaminas também podem atuar em receptores nicotínicos de acetilcolina e canais de cálcio dependentes de voltagem de vertebrados (Fatehi *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997).

Há evidências experimentais e clínicas consideráveis indicando a participação do glutamato em casos de hipóxia/isquemia, crises convulsivas, hipoglicemia, dor crônica e trauma do SNC, e em desordens neurodegenerativas crônicas, como esclerose lateral amiotrófica e doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington (Bleakman *et al.*, 2006; Gogas, 2006; Quintana *et al.*, 2006). Assim, o desenvolvimento de agonistas e antagonistas específicos para receptores ionotrópicos de glutamato tem potencial para o desenvolvimento de novas drogas farmacêuticas (Watkins e Jane, 2006). Dessa forma, acilpoliaminas de aranhas, as quais agem inibindo estados ativados de receptores ionotrópicos de glutamato de modo não competitivo, têm sido estudadas como agentes

neuroprotetores e também para o tratamento de cânceres, dor crônica e de várias doenças neurodegenerativas (Estrada *et al.*, 2007).

1.4. COMPOSTOS PEPTÍDICOS

Os peptídeos presentes na peçonha de aranhas podem ser classificados em peptídeos citolíticos lineares e neurotoxinas com pontes dissulfeto (Corzo e Escoubas, 2003; Vassilevski *et al.*, 2009).

1.4.1. Peptídeos citolíticos lineares

Os peptídeos lineares são pequenos compostos (geralmente contêm menos de 50 resíduos de aminoácidos) livres de ponte dissulfeto e são representados principalmente por peptídeos que agem em membranas lipídicas. Sua composição é única dentre os demais peptídeos de aranhas, visto que possuem mais resíduos catiônicos (Lys e Arg) e menos resíduos aniônicos que os peptídeos que agem em canais iônicos (Corzo e Escoubas, 2003). Em solução, esses compostos adotam uma estrutura anfifílica, contendo uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, propensos à formação de α -hélices, o que permite que eles se incorporem facilmente às membranas celulares, resultando na formação de poros, o que pode resultar em um desequilíbrio de cargas ou na lise celular (Villegas e Corzo, 2005).

Visto que peptídeos citolíticos possuem menor especificidade em relação às neurotoxinas e que seu mecanismo de ação independe de receptores, atribui-se a eles uma função mais acessória, embora sua função exata ainda não esteja esclarecida (Vassilevski *et al.*, 2008). Possíveis funções incluem o efeito tóxico direto na presa, como no caso das licotoxinas, da peçonha de *Lycosa carolinensis* (Lycosidae) (Yan e Adams, 1998), das cupieninas, de *Cupiennius salei* (Ctenidae) (Kuhn-Nentwig *et al.*, 1994) e das oxiopininas, de *Oxyopes kitabensis* (Oxyopidae) (Corzo *et al.*, 2002). Peptídeos citolíticos poderiam agir também como “agentes de espalhamento”, que facilitam a passagem das neurotoxinas através das barreiras celulares e eventualmente garantem seu acesso a neurônios-alvo. Essa cooperação positiva com neurotoxinas já foi reportada para as cupieninas e oxiopininas (Kuhn-Nentwig *et al.*, 1994; Corzo *et al.*, 2002). Outra sugestão seria um papel antisséptico direto no caso das licotoxinas (Yan e Adams, 1998), cupieninas (Kuhn-Nentwig *et al.*, 1994) e

latarcinas (Kozlov *et al.*, 2006), o que poderia atuar na desinfecção e conservação da presa paralisada.

Devido às características anfílicas e catiônicas desses compostos que facilitam a interação com membranas celulares, a maioria dos peptídeos antimicrobianos de aranhas adota essa configuração, embora existam peptídeos com pontes dissulfeto, isolados da hemolinfa de aranhas (Daffre *et al.*, 2001). Peptídeos antimicrobianos apresentam um amplo espectro de ação contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. Vários modelos são propostos para descrever seu modo de ação (Bechinger e Lohner, 2006; Brodgen, 2005; Shai, 1999; Zasloff, 2002). Em todos eles há o rompimento da membrana celular, resultando em um fluxo excessivo de íons e de pequenas moléculas através da membrana, levando à lise celular e, conseqüentemente, à morte do organismo.

Exemplos de peptídeos lineares citolíticos com atividade antimicrobiana da peçonha de aranhas são: licotoxinas (Yan e Adams, 1998), cupieninas (Kuhn-Nentwig *et al.*, 1994) e oxiopininas (Corzo *et al.*, 2002). As citoinscetotoxinas (CITs) isoladas da peçonha da aranha *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) além de possuírem atividade antimicrobiana, são também potentes toxinas inseticidas, e constituem uma classe interessante de peptídeos lineares catiônicos, com aproximadamente 8 kDa, diferentemente das demais (Vassilevski *et al.*, 2008). Cupieninas e oxiopininas também mostraram atividade inseticida (Kuhn-Nentwig *et al.*, 1994; Corzo *et al.*, 2002). Peptídeos antimicrobianos da peçonha de aranhas são candidatos promissores para o desenvolvimento de novas drogas para o combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (Daffre *et al.*, 2001).

1.4.2. Peptídeos neuroativos

Até o momento, 201 sequências peptídicas contendo pontes dissulfeto foram descritas para a peçonha de aranhas caranguejeiras (incluindo sequências preditas a partir da construção de bibliotecas de cDNA da glândula de peçonha), parte das quais ainda não tem o alvo molecular ou função determinados (Herzig *et al.*, 2011). Esse ainda é um número pequeno se considerada a quantidade de peptídeos existentes em uma peçonha e o total de cerca de 900 espécies da família Theraphosidae (Platnick, 2011), evidenciando o potencial farmacológico que ainda pode ser explorado nessas peçonhas (Escoubas e Rash, 2004). A maioria desses peptídeos apresenta entre 31 e 40 resíduos de aminoácidos, três pontes

dissulfeto e caráter básico (Escoubas e Rash, 2004), embora haja exceções, como peptídeos da peçonha de *Lasiadora parahybana* (LpTxs), os quais possuem 49 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto (Escoubas *et al.*, 1997). Análise por MALDI-TOF MS da peçonha de 55 espécies de aranhas caranguejeiras mostrou um perfil bimodal da distribuição de massas moleculares, com 57,8% dos peptídeos em uma classe central de 3.500 – 4.500 Da e 6,9% em uma distribuição secundária de 6.500 – 7.000 Da (Escoubas e Rash, 2004).

Peptídeos de aranhas são tidos mais como moduladores que como bloqueadores de canais iônicos dependentes de voltagem, como os de Ca^{2+} , Na^+ , K^+ e Cl^- (Estrada *et al.*, 2007). A função biológica mais relevante das toxinas que agem nesses canais é paralisar a presa, tanto pela inibição (inibidores Na_v e Ca_v) ou pela estimulação excessiva (inibidores K_v e ativadores Na_v) da transmissão sináptica no sistema nervoso (Swartz, 2007).

A classificação desses peptídeos é motivo de discussão entre pesquisadores que visam criar um sistema único de nomenclatura. King e colaboradores (2008) propuseram um sistema baseado em parâmetros farmacológicos e na posição taxonômica da espécie de origem. Essa nomenclatura apresenta um símbolo grego em seu início, referente ao modelo proposto por McIntosh e colaboradores (1999) para as conotoxinas (*Conus* sp.), e que tem sido utilizado também para toxinas de aranhas, onde os mais usados são: α - para toxinas cujo alvo são receptores ionotrópicos de membranas pós-sinápticas (acetilcolina e glutamato), κ - para toxinas cujo alvo são canais K_v (canais de K^+ dependentes de voltagem), μ - para bloqueadores de poro de canais Na_v (canais de Na^+ dependentes de voltagem) e δ - para moduladores desses canais, e ω - para toxinas cujo alvo são canais Ca_v (canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem).

1.4.2.1. Motivos estruturais de toxinas peptídicas de aranhas

Peptídeos de aranhas também podem ser caracterizados pela distribuição diferencial de resíduos de cisteína ao longo de sua cadeia de aminoácidos e por sua disposição estrutural (Vassilevski *et al.*, 2009). A variabilidade funcional de peptídeos com o mesmo tipo de estrutura espacial tem despertado bastante interesse dos cientistas para a criação de esqueletos estruturais de compostos com as propriedades desejadas (Skerra, 2000). A maioria dos compostos peptídicos contendo pontes dissulfeto de aranhas caranguejeiras pode apresentar pelo menos dois motivos estruturais distintos.

O primeiro é o motivo ICK (*Inhibitory Cystine Knot* – Fig. 3A e 3D), com uma sequência consensual $C_IX_{2-7}-C_{II}X_{3-11}-C_{III}X_{0-7}-C_{IV}X_{1-17}-C_VX_{1-19}-C_{VI}$ e pareamento das pontes dissulfeto C_I-C_{IV} , $C_{II}-C_V$, $C_{III}-C_{VI}$, onde C representa as cisteínas e X representa os demais resíduos de aminoácidos (Craig *et al.*, 2001; Norton e Pallaghy, 1998; Vassilevski *et al.*, 2009). A estrutura espacial desse motivo é caracterizada pela presença de um β -*hairpin* e um peculiar nó de cisteína que consiste em um anel formado pelas interações C_I-C_{IV} e $C_{II}-C_V$ penetrado por uma terceira ponte dissulfeto ($C_{III}-C_{VI}$), podendo haver ou não uma terceira folha- β (Fig. 3A e 3D). Conformações do tipo α -hélice são raras. A maioria das toxinas peptídicas de caranguejeiras segue a sequência consensual desse motivo (Fig. 4A), o que não necessariamente significa que elas possuam conformidade estrutural com o mesmo.

Podem-se distinguir três fragmentos principais nos peptídeos que adotam o motivo ICK: (i) região N-terminal com 8-10 resíduos de aminoácidos antes do segundo resíduo Cys; (ii) fragmento central rico em resíduos Cys e contendo um motivo duplo de Cys – CC –; e (iii) fragmento C-terminal após o quinto resíduo Cys caracterizado por alta variabilidade, tanto em tamanho quanto na composição de resíduos de aminoácidos. Na maioria dos peptídeos que possuem esse motivo foi observado um padrão característico, no qual a distância entre a primeira e a segunda Cys corresponde a seis resíduos de aminoácidos, enquanto o terceiro e o quarto resíduos Cys geralmente ocupam posições adjacentes, gerando assim o denominado motivo estrutural principal, ou PSM (do inglês *principal structural motif*): $C_IX_6C_{II}\dots\dots C_{III}C_{IV}$. A presença do motivo PSM na estrutura de peptídeos de aranhas é um grande indicativo de função neuroativa. Em mais de 70% dos peptídeos que contém mais de seis resíduos de cisteína e que possuem o motivo ICK observou-se que o quinto e o sexto, assim como o sétimo e o oitavo, resíduos de cisteína estão organizados em intervalos de apenas um resíduo extra entre eles, propondo, assim, o motivo estrutural extra, ou ESM (do inglês *extra structural motif*): $C_VXC_{VI}\dots\dots C_{VII}XC_{VIII}$, com pareamento das pontes dissulfeto C_I-C_{IV} , $C_{II}-C_V$, $C_{III}-C_{VIII}$, $C_{VI}-C_{VII}$. Diferentemente do PSM, a presença do motivo ESM por si só não sugere função neuroativa (Kozlov *et al.*, 2005).

O segundo é o motivo DDH (*disulfide-directed β -hairpin* – Fig. 3C), cuja sequência consensual proposta por Wang e colaboradores (2000) é $CX_{5-19}-CX_2-[G \text{ ou } P]-X_2-CX_{6-19}-C$. Esse motivo não possui o nó de cisteína e compreende um β -*hairpin* antiparalelo estabilizado por apenas duas pontes dissulfeto obrigatórias – as duas que formam a maior parte do núcleo hidrofóbico. Assim, o *loop* 1 não mais se liga necessariamente à cisteína do N-terminal, como

no motivo ICK (Fig. 3A), e o *loop* 3 possui geralmente cinco resíduos de aminoácidos com uma Gly ou Pro centrais para garantir a estabilidade antes da primeira folha- β (Fig. 3C). O motivo DDH é encontrado em proteínas de diversos organismos, incluindo fungos, algas, aracnídeos, plantas e vertebrados, excetuando-se Archaea e Eubacteria. Esse cenário sugere que esse motivo teria evoluído em um ancestral eucarioto anterior à divergência de plantas, animais e fungos. As variações nesse motivo incluem pontes dissulfeto adicionais e modificações nos *loops* de cisteína. Dependendo da posição da ponte dissulfeto adicional, visto que apenas duas são obrigatórias, o motivo DDH pode gerar um motivo ICK, e, assim, sugere-se que o ICK pode ser considerado uma evolução molecular do DDH (Wang *et al.*, 2000).

Um motivo variante foi demonstrado com a determinação da estrutura da huwentoxina II (HWTX-II) – ou U1-TRTX-Hh1a, de acordo com a nomenclatura proposta por King e colaboradores (2008) –, isolada da peçonha da caranguejeira *Haplopelma schmidti* (sinônimos: *Haplopelma huwenum*, *Ornithoctonus huwena*, *Selenocosmia huwena*, família Theraphosidae), a qual possui uma diferente organização das pontes dissulfeto: C_I-C_{III}, C_{II}-C_V, C_{IV}-C_{VI} (Fig. 3-B e E) (Shu *et al.*, 2002). Apesar de as duas folhas- β antiparalelas estarem conectadas por duas pontes dissulfeto de forma semelhante ao motivo ICK, a estrutura da HWTX-II difere desse motivo por não apresentar o nó de cisteína. Sugere-se que a HWTX-II adota uma estrutura semelhante ao motivo DDH (Fig. 3B), embora possa ser considerado como uma evolução do motivo DDH originalmente descrito por Wang e colaboradores (2000) (Fig. 3-C). É comum, entretanto, para fins simplificativos, descrever toxinas que adotam esse motivo DDH diferenciado como toxinas DDH, para distingui-las das demais toxinas que adotam o motivo ICK (Escoubas e Rash, 2004). Shu e colaboradores (2002) sugerem que a HWTX-II pode ser uma evidência molecular para a proposição de que o motivo ICK seria uma menor elaboração do motivo DDH, embora mais estudos comprobatórios sejam necessários.

Devido à alta similaridade primária entre HWTX-II e as toxinas de *Aphonopelma* (= *Eurypelma*) e *Brachypelma* (ESTxs e TxP1, respectivamente) (Fig. 4-B), essas últimas provavelmente possuem o mesmo motivo estrutural da HWTX-II. Entretanto, a disposição das pontes dissulfeto em TxP1, ou U1-TRTX-Bs1a, (C_I-C_{IV}, C_{II}-C_V, C_{III}-C_{VI}) assemelha-se mais ao motivo ICK do que ao DDH descrito para HWTX-II (Kaiser *et al.*, 1994). Alinhamento das

sequências primárias das LpTxs, de *L. parahybana*, com essas toxinas poderia indicar que elas também adotam esse motivo (Fig. 4-B), apesar de um pouco modificado por serem maiores e possuírem uma ponte dissulfeto extra. Porém, as LpTxs não possuem atividade inseticida, sendo tóxicas apenas para vertebrados (Escoubas *et al.*, 1997). Visto que ainda faltam informações sobre a organização das pontes dissulfeto nas LpTxs e que há um conflito na conformação da TxP1 em relação à HWTX-II, ainda é cedo para gerar conclusões generalizadas sobre a ocorrência do motivo DDH na peçonha de caranguejeiras, assim como sobre uma possível característica farmacológica relacionada a esse motivo (Escoubas e Rash, 2004).

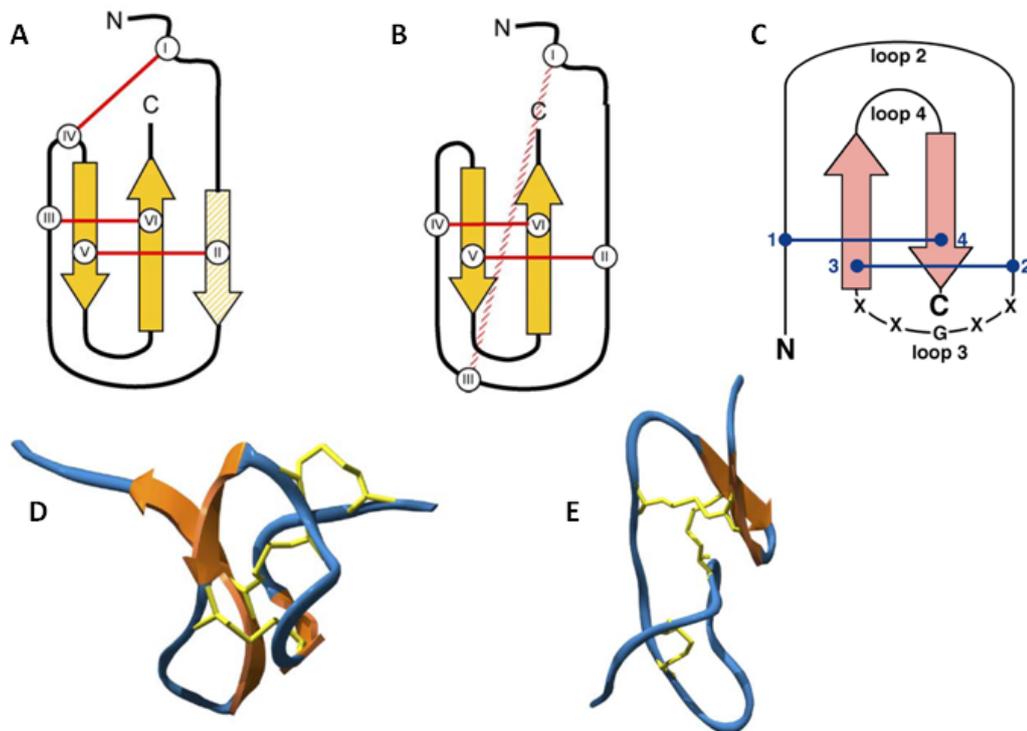


Figura 3. Comparação dos motivos estruturais de toxinas de aranhas caranguejeiras. O painel superior mostra diagramas esquemáticos representativos dos motivos ICK (A) e DDH (B e C), com pontes dissulfeto em vermelho (A e B) ou azul (C). A seta hachurada em (A) representa uma terceira folha- β nem sempre presente em peptídeos ICK. O diagrama (B) corresponde à representação da HWTX-II, uma possível evolução do motivo DDH, enquanto que o diagrama (C) corresponde ao motivo DDH originalmente descrito por Wang e colaboradores (2000). A linha tracejada em (B) representa a ponte dissulfeto adicional da HWTX-II como uma elaboração do motivo DDH básico. Trechos de sequências separados por resíduos Cys são denominados *loops* e numerados de 1-6 do N ao C-terminal. O painel inferior mostra desenhos em fita de estruturas representativas dos motivos ICK (D) e DDH (E), das toxinas ω -GsTxSIA (código PDB 1KOZ) e HWTX-II (código PDB 1I25), respectivamente. Pontes dissulfeto representadas em amarelo. Adaptado de Escoubas e Rash (2004) e Wang *et al.* (2000).

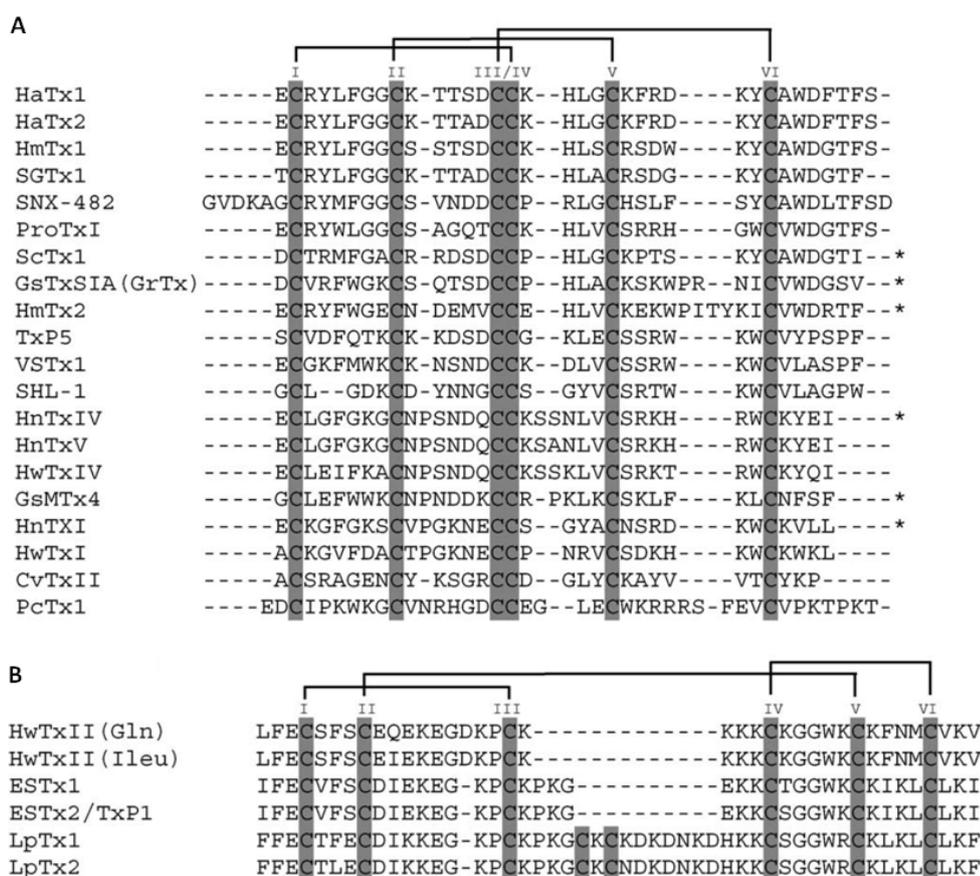


Figura 4. Alinhamento por ClustalW de toxinas peptídicas conhecidas de aranhas caranguejeiras em conformidade com os motivos ICK (A) ou DDH (B). Resíduos de cisteína estão designados por números romanos. Asteriscos denotam amidação no C-terminal. Adaptado de Escoubas e Rash (2004).

1.4.2.2. Peptídeos com ação em canais Na_v

Canais de sódio dependentes de voltagem (Na_v) são canais iônicos permeáveis a Na^+ que se ativam ou inativam em resposta a mudanças no potencial de membrana, e contribuem primariamente para a fase inicial do potencial de ação e para sua propagação em neurônios e outras células excitáveis, como miócitos e células endócrinas (Hodgkin e Huxley, 1952; Yu e Catterall, 2003). Nove isoformas de canais Na_v de mamíferos foram funcionalmente caracterizadas ($Na_v1.1$ – $Na_v1.9$), os quais são complexos multiméricos formados por uma subunidade α de 260 kDa associada a subunidades β auxiliares de 33-36 kDa: $\beta1$, $\beta2$ e/ou $\beta3$ (Fig. 5). A subunidade α consiste em quatro domínios homólogos (I-IV), contendo cada um deles seis segmentos transmembrânicos (S1-S6). Em cada domínio, o sensor de voltagem localiza-se no segmento S4, o qual contém resíduos de aminoácidos positivamente carregados. Os segmentos S5-S6 dos quatro domínios formam coletivamente

o poro central para a condução de Na^+ , sendo o filtro de seletividade iônica formado na porção extracelular do poro pelas alças reentrantes entre as hélices S5 e S6 de cada domínio, que se encontram embebidos na região transmembrana do canal (Yu e Catterall, 2003). O portão de inativação é formado pela alça intracelular entre os domínios III e IV (Fig. 5), sendo este uma estrutura rígida em α -hélice contendo um motivo de sequência hidrofóbica (motivo IFM) que interage com a porção intracelular do poro, bloqueando-a (Rohl *et al.*, 1999). Recentemente, reportou-se a primeira análise estrutural obtida por cristalografia de um canal Na_v , isolado da bactéria *Arcobacter butzleri*, auxiliando a compreensão dos mecanismos de ação desses canais (Payandeh *et al.*, 2011).

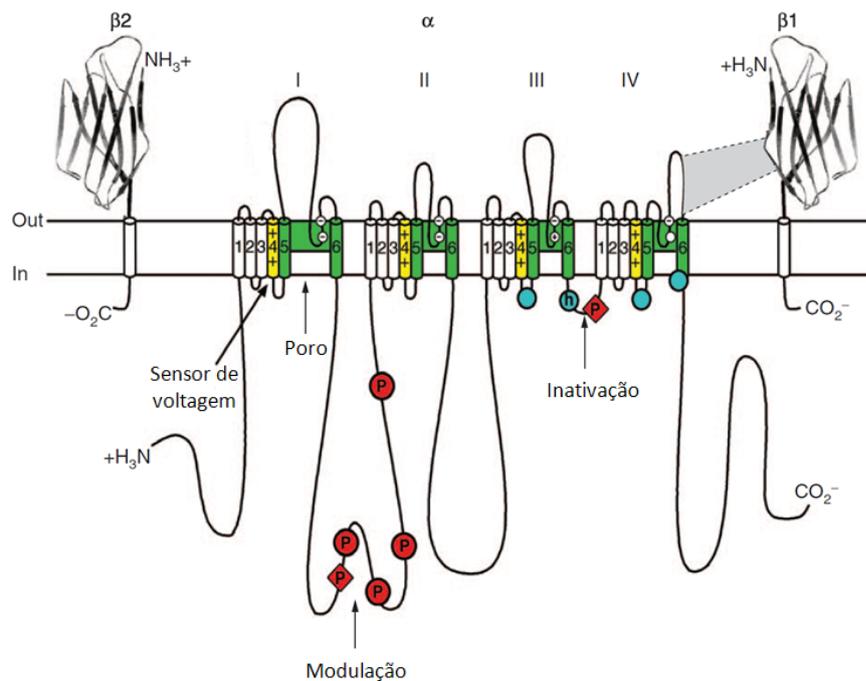


Figura 5. Representação esquemática das subunidades de um canal Na_v . A subunidade α de um canal $\text{Na}_v1.2$ é ilustrada junto com as subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$. Números romanos indicam os quatro domínios; segmentos 5 e 6 (em verde) são os formadores de poro; as hélices S4 (em amarelo) compõem os sensores de voltagem. Círculos azuis nas alças intracelulares dos domínios III e IV indicam o motivo IFM do portão de inativação e seu receptor (h, portão de inativação); P corresponde aos sítios de fosforilação (em círculos e losangos vermelhos). Adaptado de Yu e Catterall (2003).

Em humanos, a relevância médica de canais Na_v reflete-se nos casos em que determinadas mutações nesses canais geram certas desordens como arritmias cardíacas, epilepsia, fraqueza muscular e eritromelalgia (Cannon, 2006; George Jr, 2005). Mutações nos canais $\text{Na}_v1.7$ de humanos ($\text{hNa}_v1.7$), por exemplo, podem eliminar a habilidade em sentir

dor (Cox *et al.* 2006). Dessa forma, canais Na_v são alvos moleculares primários para inúmeras drogas terapêuticas, como anestésicos, anticonvulsivantes e antiarrítmicos, além de inseticidas químicos, como piretróides, com ação em canais Na_v de insetos (Cestèle e Catterall, 2000).

A estrutura primária de canais Na_v de insetos é semelhante àquela de mamíferos, embora haja algumas diferenças quanto às propriedades farmacológicas. O primeiro gene de canal Na_v de insetos, *para* (*paralytic*), foi clonado de *Drosophila melanogaster* (Loughney *et al.*, 1989; Warmke *et al.*, 1997). A partir de então, várias proteínas de canal Na_v de insetos, como *Drosophila Para*, *Vssc1* de mosca doméstica, *Para*^{CSMA} e *BgNa_v1-1* de baratas, têm sido funcionalmente expressas em oócitos de *Xenopus laevis* (Soderlund e Knipple, 2003; Tan *et al.*, 2005). Recentemente, dois novos genes de canal Na_v foram clonados do escorpião *Mesobuthus martensii* (*BmNa_v1*) e da aranha caranguejeira *Haplopelma schmidtii* (*OhNa_v1* – do sinônimo *Ornithoctonus huwena*) (Zuo *et al.*, 2006). Uma subunidade auxiliar β para canais Na_v de insetos também foi identificada. Descobriu-se que uma proteína ácida de membrana de 50 kDa, denominada tipE, estimula a expressão funcional da subunidade α de canal Na_v de inseto codificada pelo gene *para* (Feng *et al.*, 1995).

Canais Na_v possuem pelo menos oito sítios de ligação identificados, sendo seis desses específicos para neurotoxinas e três de interesse para o estudo de toxinas de aranhas (para revisão, Stevens *et al.*, 2011). O sítio 1, localizado na superfície extracelular do poro, e composto por resíduos nas alças-P que conectam os segmentos S5 e S6 dos quatro domínios, é o sítio da tetrodotoxina (TTX), saxitoxina (STX), μ -conotoxinas e algumas toxinas de aranhas (veja revisão por Nicholson, 2007), incluindo a toxina seletiva a insetos Hainantoxin-I (HNTX-I or μ -theraphotoxin-Hhn2b), isolada da peçonha da aranha *Haplopelma hainanum* (Theraphosidae) (Li *et al.*, 2003). Toxinas que com ação no sítio 1 bloqueiam fisicamente o poro do canal, impedindo a condutância ao Na^+ (Cestèle e Catterall, 2000). O sítio receptor 3, formado pela alça extracelular S5-S6 do domínio IV, é ocupado por vários grupos de toxinas polipeptídicas, como as toxinas α -escorpiônicas, toxinas de anêmonas marinhas Tipo-1 e Tipo-2 e várias toxinas de aranhas, as quais retardam a inativação de canais Na_v , provavelmente pela estabilização do sensor de voltagem S4 do domínio IV em sua posição desativada (Cestèle e Catterall, 2000; Bosmans e Tytgat, 2007). O sítio 4, formado pela alça extracelular S3-S4 do domínio II, é o alvo das

toxinas β -escorpiônicas e de várias toxinas de aranhas, as quais se ligam ao sensor de voltagem S4 do domínio II na configuração ativada e induzem uma mudança na dependência de voltagem da ativação de canais Na_v na direção hiperpolarizada, aumentando a abertura do canal devido à mudança para potenciais mais negativos, e também induzem a redução da amplitude da corrente de pico de sódio (Cestèle e Catterall, 2000).

A maioria das toxinas peptídicas de aranhas que agem em canais Na_v possuem de 30-40 resíduos de aminoácidos e são estabilizadas por 3 ou 4 pontes dissulfeto. O motivo ICK parece ser o mais utilizado, mas não especifica o mecanismo de ação, visto que algumas toxinas que utilizam esse motivo agem como bloqueadoras de poro e outras como moduladoras do sensor de voltagem (Bosmans e Swartz, 2010).

HNTX-I foi o primeiro relato de uma toxina seletiva a inseto a bloquear a condutância ao Na^+ pela provável interação com sítio 1 de canais Na_v . Ela possui 33 resíduos de aminoácidos, três pontes dissulfeto, e é cerca de 15 vezes mais seletiva ao canal Na_v de inseto *para/tipE* que ao canal de rato $\text{Na}_v1.2/\beta1$, sem efeitos em outros canais Na_v (Li et al., 2003).

Os primeiros peptídeos isolados da peçonha de aranha cujos alvos são canais Na_v foram δ -hexatoxina-Ar1 (robustoxina) e δ -hexatoxina-Hv1 (versutoxina), das aranhas *Atrax robustus* e *Hadronyche versuta*, respectivamente (Sheumack et al., 1985; Brown et al., 1988). Essas duas espécies são aranhas migalomorfas da família Hexathelidae encontradas primariamente ao longo da costa leste da Austrália e são provavelmente as aranhas mais perigosas do mundo para os humanos (Tedford et al., 2004). Tanto δ -HXTX-Ar1 como δ -HXTX-Hv1 possuem como característica 42 resíduos de aminoácidos estabilizados por quatro pontes dissulfeto e três resíduos de cisteína adjacentes em sua sequência primária (resíduos 14 a 16). Ambas reduzem a corrente de inativação de canais Na_v sensíveis a TTX ligando-se ao sítio 3 tanto em vertebrados quanto em invertebrados (Gilles et al., 2002; Nicholson et al., 1996).

As δ -palutoxinas IT1 a IT4 (δ -AMATX-PI1a a PI1d), da aranha *Pireneitega luctuosa* (Amaurobiidae), são significativamente tóxicas para larvas da praga agrícola *Spodoptera litura* (Lepidoptera), sem efeitos tóxicos para camundongos (Corzo et al., 2000). Elas retardam a inativação de canais Na_v de insetos, semelhante aos modificadores que se ligam ao sítio 3, mas ligam-se com maior afinidade ao sítio receptor 4, como as toxinas β -

escorpiônicas (Corzo et al., 2005). Dessa forma, as δ -PaluTs representam as primeiras toxinas de aranhas a agir no sítio 4 de canais Na_v de insetos, apesar de modularem a inativação dos mesmos.

A huwentoxina-IV (HWTX-IV) da caranguejeira *Haplopelma schmidti* inibe correntes de canais Na_v neuronais sensíveis à TTX em mamíferos, sem efeitos significativos naqueles resistentes à TTX. Peng e colaboradores (2002) sugeriram sua ação no sítio 1, por um mecanismo semelhante à TTX. Entretanto, por meio de mutações sítio-dirigidas em canais Na_v , sugeriu-se a interação dessa toxina com resíduos específicos da alça extracelular IIS3-S4, que se justapõe ao sítio 4 (Xiao et al., 2008). Diferentemente das toxinas β -escorpiônicas, que interagem com o sensor de voltagem IIS4 em sua configuração ativada, a HWTX-IV se ligaria ao sensor IIS4 em sua configuração fechada, sendo esse um novo mecanismo para a inibição de canais Na_v por toxinas de aranhas caranguejeiras.

Outro possível mecanismo de ação tem sido bastante estudado com as toxinas ProTxI e ProTxII, da aranha caranguejeira *Thrixopelma pruriens*. Esses peptídeos inibem a abertura de canais Na_v através de uma mudança na dependência de voltagem da ativação para potenciais mais positivos, ao contrário das toxinas β -escorpiônicas, semelhante aos modificadores de *gating* de canais K_v (Priest et al., 2007; Bosmans e Swartz, 2010).

1.4.2.3. Peptídeos com ação em canais K_v

Canais de potássio representam o maior e mais diverso subgrupo de canais iônicos, desempenhando um papel essencial em processos de sinalização celular, regulando a liberação de neurotransmissores, frequência cardíaca, secreção de insulina, excitabilidade neuronal, transporte de eletrólitos no epitelial, contração do músculo liso e regulação do volume celular. Dentre os canais de potássio, há aqueles dependentes de voltagem (K_v), os quais, juntamente com canais Na_v , são fundamentais para a manutenção do potencial de membrana celular e representam a base fisiológica da transmissão do sinal no sistema nervoso (Guyton e Hall, 2006).

Estruturalmente, canais K_v são tetrâmeros com quatro subunidades simétricas formando o poro central, sendo cada subunidade formada por seis segmentos transmembrana denominados S1-S6. O poro é formado pelos segmentos S5 e S6 de cada

subunidade, sendo que em sua região extracelular há uma sequência específica que forma o filtro de seletividade. Os segmentos S1-S4 formam o domínio sensor de voltagem (Swartz, 2007).

Diferentemente da maioria das toxinas animais conhecidas de serpentes, abelhas, escorpiões e anêmonas, as quais bloqueiam principalmente canais K_v1 e K_v3 , toxinas peptídicas de aranhas têm como alvo canais K_v2 e K_v4 , os quais são expressos no SNC e no sistema cardiovascular de mamíferos, promovendo o avanço no conhecimento acerca desses subtipos de canais (Estrada *et al.*, 2007).

As primeiras toxinas de aranha descritas como bloqueadores de canais K_v foram as hanatoxinas 1 e 2 (HaTx 1 e 2 ou κ -TRTX-Gr1a e κ -TRTX-Gr1b, respectivamente) da aranha caranguejeira *Grammostola spatulata* (Swartz e Mackinnon, 1995). Apesar das diferenças marcantes em sua sequência primária, ambas bloquearam o canal $K_v2.1$ (*shab-related*) com K_d de 42 nM. Outros canais K_v testados relacionados aos canais K_v1 e K_v3 foram insensíveis às HaTxs, enquanto que o canal *shal-related* (tipo K_v4) foi sensível à toxina.

As heteropodatoxinas (HpTx 1-3 ou κ -SPRTX-Hv1a-Hv1c, respectivamente), isoladas da peçonha de *Heteropoda venatoria* (Sparassidae), bloquearam a corrente de canais $K_v4.2$, mas não de $K_v1.4$, de maneira dependente de voltagem, com menor bloqueio em potenciais mais despolarizados. Além disso, as HpTxs reduziram o tempo de curso de ativação e inativação da corrente de K^+ e mudaram a dependência de voltagem da corrente de inativação para potenciais mais positivos (Sanguinetti *et al.*, 1997).

Outras toxinas com ação em canais K_v foram isoladas da peçonha da caranguejeira *Phrixotrichus auratus*. As frixotoxinas (PaTx 1 e 2) bloqueiam especificamente correntes de $K_v4.3$ e $K_v4.2$ em concentrações nanomolares, alterando as propriedades de *gating* desses canais através da interação com o sensor de voltagem. As subfamílias de correntes *shaker* (K_v1), *shab* (K_v2) e *shaw* (K_v3) não foram inibidas pelas PaTxs. Essas toxinas também bloquearam correntes cardíacas de potássio do tipo I_{to1} , que é inibida por 4-aminopiridina e pela classe I de drogas antiarrítmicas, sendo importantes para o estudo dessas correntes na fisiologia cardíaca (Diochot *et al.*, 1999). Chagot e colaboradores (2004) determinaram a estrutura da PaTx1, mostrando que ela apresenta o motivo estrutural ICK e liga-se preferencialmente ao canal em seu estado fechado.

A ScTx1, isolada da caranguejeira *Stromatopelma calceata*, foi o primeiro inibidor de alta afinidade descrito para o canal $K_v2.2$. ScTx1 também inibiu canais $K_v2.1$, $K_v4.2$ e o heterodímero $K_v2.1/K_v9.3$, o qual tem sido proposto estar envolvido com a sensibilidade a oxigênio nos miócitos de artérias pulmonares (Escoubas *et al.*, 2002). Nesse mesmo trabalho, Escoubas e colaboradores (2002b) descreveram a ação da HmTx 1 e 2, da aranha caranguejeira *Heteroscodra maculata*, que inibiram correntes de potássio associadas aos subtipos K_v2 . HmTx1 também inibiu canais K_v4 , incluindo $K_v4.1$, sendo o primeiro peptídeo efetivo descrito para esse subtipo.

Essas toxinas modificadoras de correntes de K^+ emergem como moléculas promissoras para o desenvolvimento de drogas cardíacas e também para a melhor compreensão das propriedades funcionais desses canais (Estrada *et al.*, 2007).

1.4.2.4. Peptídeos com ação em canais Ca_v

Canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) medeiam o influxo de cálcio em resposta à despolarização da membrana e regulam processos intracelulares como contração, secreção, neurotransmissão e expressão gênica em diferentes tipos de células. Sua atividade é essencial para o acoplamento de sinais elétricos na superfície celular com eventos fisiológicos na célula (Catterall *et al.*, 2005). Canais de Ca^{2+} são complexos protéicos compostos por uma única subunidade α_1 , com 10 subtipos atualmente identificados, e uma combinação de subunidades α_2 - δ , β e γ . A subunidade α_1 é a maior delas, com 190 a 250 kDa, e incorpora o poro condutor, o sensor de voltagem e aparato de *gating* e a maioria dos sítios conhecidos de regulação do canal por segundos mensageiros, drogas e toxinas. Semelhante à subunidade α de canais Na_v , essa subunidade possui quatro domínios (I-IV) com seis segmentos transmembrânicos cada (S1-S6) (Catterall *et al.*, 2005).

Atualmente já foram descritos 10 subtipos de canais de cálcio dependentes de voltagem em vertebrados (Tabela 1). A numeração identificadora dos canais Ca_v corresponde à subfamília do gene da subunidade α_1 (1 a 3 até o momento) e à ordem da descoberta da subunidade α_1 dentro de cada subfamília (1 a n). Assim, a subfamília Ca_v1 ($Ca_v1.1$ – $Ca_v1.4$) inclui canais contendo as subunidades α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} e α_{1F} , as quais medeiam correntes de Ca^{2+} tipo-L. A subfamília Ca_v2 ($Ca_v2.1$ – $Ca_v2.3$) inclui canais contendo α_{1A} , α_{1B} e

α_{1E} , as quais medeiam correntes tipo-P/Q, tipo-N e tipo-R, respectivamente. E a subfamília Ca_v3 ($Ca_v3.1 - Ca_v3.3$) inclui canais contendo α_{1G} , α_{1H} e α_{1I} , as quais medeiam correntes tipo-T. A sequência primária das subunidades α_1 possui mais de 70% de identidade dentro da mesma subfamília, mas apenas menos de 40% de identidade entre as três subfamílias distintas, o que garante variadas propriedades fisiológicas e farmacológicas (Catterall *et al.*, 2005).

Insetos possuem um repertório de canais Ca_v mais limitado que vertebrados (veja revisão por King, 2007). Enquanto o genoma humano codifica 10 subunidades α_1 , quatro subunidades β , quatro complexos $\alpha_2-\delta$ e sete subunidades γ formadoras dos canais Ca_v , o genoma de uma *Drosophila melanogaster*, por exemplo, codifica apenas três subunidades α_1 , uma subunidade β , três complexos $\alpha_2-\delta$ e possivelmente uma subunidade γ (Littleton e Ganetzky, 2000; Rieckhof *et al.*, 2003). Essas três subunidades α_1 de *D. melanogaster*, Dmca1D, Dmca1A e Ca- α_{1T} , apresentam não mais que 68% de identidade com subunidades α_1 de mamíferos, sendo cada canal Ca_v de inseto ortólogo aos canais de uma única subfamília Ca_v1 , Ca_v2 ou Ca_v3 de mamíferos, respectivamente (King, 2007). Apesar dessa homologia moderada, esses canais apresentam propriedades eletrofisiológicas distintas e diferentes sensibilidades a variados agentes farmacológicos e, portanto, não seria adequado receberem a mesma classificação (King, 2007). O pequeno repertório de genes $Ca_v-\alpha_1$ em insetos sugere o papel essencial desses canais (Eberl *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 2002).

Canais Ca_v1 são alvos moleculares de bloqueadores orgânicos de canais de Ca^{2+} frequentemente utilizados em doenças cardiovasculares (dihidropiridinas, fenilalquilaminas e benzotiazepinas). Os canais da subfamília Ca_v2 são relativamente insensíveis a dihidropiridinas, mas são bloqueados por toxinas peptídicas de aranhas e gastrópodes marinhos do gênero *Conus* (Miljanich e Ramachandran, 1995). Canais $Ca_v2.1$ são bloqueados por ω -agatoxina-IVA da aranha *Agelenopsis aperta* (Agelenidae) (Adams, 2004). Canais $Ca_v2.2$ são bloqueados por ω -conotoxina-GVIA e outras conotoxinas relacionadas do gênero *Conus*; e canais $Ca_v2.3$ são bloqueados pela toxina peptídica SNX-482, da peçonha da caranguejeira *Hysteroocrates gigas* (Newcomb *et al.*, 1998). Devido a seu efeito específico em canais Ca_v2 , esses compostos peptídicos são potentes bloqueadores da transmissão sináptica.

Tabela 1. Canais de cálcio dependentes de voltagem de vertebrados: classificação e características fisiológicas e farmacológicas. Adaptado de Catterall *et al.* (2005) e Gribkoff (2006).

Canal	Tipo de Corrente	Distribuição	Funções celulares	Antagonistas específicos	Doenças relacionadas
Ca _v 1.1	L	Músculo esquelético; túbulos transversos	Acoplamento excitação-contração (E-C) no sistema cardiovascular	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Desordens de movimento
Ca _v 1.2	L	Miócitos cardíacos; miócitos de músculo liso; células endócrinas; corpos celulares neuronais; dendritos proximais	Acoplamento E-C no sistema cardiovascular; liberação de hormônios; regulação da transcrição; integração sináptica	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Cardiovascular
Ca _v 1.3	L	Células endócrinas; corpos celulares neuronais e dendritos; miócitos cardíacos atriais e células marca-passo; células ciliadas da cóclea	Liberação de hormônios; regulação da transcrição; regulação sináptica; marca-passo cardíaco; audição; liberação de neurotransmissores de células sensoriais	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Arritmia, disfunção auditiva
Ca _v 1.4	L	Bastonetes e células bipolares da retina; medula espinhal; glândula adrenal; mastócitos	Liberação de neurotransmissores de fotorreceptores	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Desordens oftalmológicas
Ca _v 2.1	P/Q	Terminais nervosos e dendritos; células neuroendócrinas	Liberação de neurotransmissores; transientes dendríticos de Ca ²⁺ ; liberação de hormônios	ω-Agatoxina IVA	Ataxia e enxaqueca hemiplégica
Ca _v 2.2	N	Terminais nervosos e dendritos; células neuroendócrinas	Liberação de neurotransmissores; transientes dendríticos de Ca ²⁺ ; liberação de hormônios	ω-Conotoxina GVIA	Dor aguda e neuropática
Ca _v 2.3	R	Corpos celulares neuronais e dendritos	Disparos repetitivos; transientes dendríticos de Ca ²⁺	SNX-482 ^a	Desordens neurológicas (processamento de informação)
Ca _v 3.1	T	Corpos celulares neuronais e dendritos; miócitos musculares cardíacos e lisos	Marca-passo; disparos repetitivos	Nenhum	Epilepsia, fibrilação atrial
Ca _v 3.2	T	Corpos celulares neuronais e dendritos; miócitos musculares cardíacos e lisos	Marca-passo; disparos repetitivos	Nenhum	Hipertensão, dor, angina, epilepsia
Ca _v 3.3	T	Corpos celulares neuronais e dendritos	Marca-passo; disparos repetitivos	Nenhum	Epilepsia, desordens do sono

^a Mostrou-se que a SNX-482 exerce também uma fraca inibição em canais de corrente do tipo L (Bourinet *et al.*, 2001).

A peçonha da aranha *A. aperta* foi fonte para os primeiros bloqueadores peptídicos de canais Ca_v tipo não L. As ω -agatoxinas (ω -Aga ou ω -AGTX) modificam as propriedades de canais Ca_v através de diferentes mecanismos, agindo indiferentemente de forma a reduzir ou eliminar a entrada dependente de voltagem de Ca^{2+} em nervos terminais. Podem-se distinguir quatro tipos de ω -agatoxinas com base na similaridade de sequência primária e espectro de ação: ω -Aga-IA, ω -Aga-IIA, ω -Aga-III, e ω -Aga-IV (Adams, 2004). As ω -Aga IA-IC e IIA/IIB agem em canais Ca_v de corrente tipo L e tipo N, respectivamente. As ω -Aga-III (IIIA, IIIB e IIID) agem diferentemente em canais Ca_v de corrente tipo L, N e P/Q. As ω -Aga IVA e IVB são conhecidas como o protótipo antagonista do canal Ca_v tipo-P/Q de vertebrados ($Ca_v2.1$) (Mintz *et al.*, 1992b; Adams *et al.*, 1993). Assim como muitas toxinas dessa família, a ω -Aga-IVA (ou ω -AGTX-Aa4a) é também um potente bloqueador de canais Ca_v em neurônios centrais de invertebrados (Bickmeyer *et al.*, 1994; Wicher e Penzlin, 1997).

A toxina SNX-482 (ω -TRTX-Hg1a), da peçonha da caranguejeira *Hysteroocrates gigas*, mostrou-se uma bloqueadora efetiva de canais Ca_v com corrente tipo R em nervos terminais neurohipofisários de ratos, sem efeitos observados em correntes de canais Na_v e K_v (Newcomb *et al.*, 1998). Sugere-se que essa toxina iniba canais $Ca_v2.3$ atuando como antagonista de sua ativação. Uma fraca inibição de correntes do tipo L foi também observada (Bourinet *et al.*, 2001). A SNX-482 foi utilizada em um modelo de dor crônica neuropática em ratos, inibindo respostas neuronais mediadas pelas fibras C e A δ em condições de neuropatia, tendo sido esse o primeiro estudo a demonstrar o papel antinociceptivo de canais $Ca_v2.3$ em neurônios da medula dorsal (Matthews *et al.*, 2007).

Outro peptídeo, denominado ω -grammotoxina SIA (ω -GsTxSIA ou ω -TRTX-Gr1a) e isolado da peçonha da caranguejeira *Grammostola spatulata*, bloqueia seletiva e reversivelmente canais Ca_v com correntes tipo N, P e Q em neurônios hipocámpais de rato, prevenindo o influxo de Ca^{2+} e a liberação de neurotransmissores da membrana pré-sináptica, bloqueando, assim, a neurotransmissão glutamatérgica (McDonough *et al.*, 1997; Piser *et al.*, 1995).

Recentemente, mostrou-se que a gomesina – um peptídeo antimicrobiano de 18 resíduos de aminoácidos e duas pontes dissulfeto, isolado da hemolinfa da caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana* (Silva-Jr *et al.*, 2000), e que apresenta também atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* – leva à morte celular pelo influxo de Ca^{2+} em canais de

corrente tipo L (Soletti *et al.*, 2010). A gomesina foi citotóxica para células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e de feocromocitoma de ratos PC12, produzindo uma rápida e transiente elevação dos níveis de Ca^{2+} intracelular, efeito inibido por nimodipina, um bloqueador de canal Ca_v de corrente tipo L. A pré-incubação com nimodipina também inibiu a morte dessas células pelo efeito da gomesina. A partir desses dados e dos demais resultados obtidos nesse estudo propõe-se a gomesina como um potente agente anticâncer (Soletti *et al.*, 2010).

A subfamília Ca_v3 é insensível às dihidropiridinas e, até o momento, não existem agentes farmacológicos que bloqueiam seletivamente correntes tipo T (Catterall *et al.*, 2005). A toxina peptídica kurtoxina, isolada do escorpião *Parabuthus transvaalicus*, inibe o *gating* de ativação de canais $\text{Ca}_v3.1$ e $\text{Ca}_v3.2$ (Sidach e Mintz, 2002). Semelhante às toxinas α -escorpiônicas, essa toxina também interage com canais Na_v retardando sua inativação (Chuang *et al.*, 1998). A ProTx-I, da caranguejeira *Thrixopelma pruriens*, também atua tanto em canais Na_v quanto $\text{Ca}_v3.1$ (Middleton *et al.*, 2002). O uso da kurtoxina e de outros inibidores da corrente de canais $\text{Ca}_v3.1$ e $\text{Ca}_v3.2$ durante episódios que simulam uma isquemia mostraram proteção significativa contra a morte de células neuronais em um modelo realizado com culturas de células hipocâmpais de ratos (Nikonenko *et al.*, 2005). O desenvolvimento de bloqueadores específicos e de alta afinidade para canais Ca_v3 é de interesse científico para estudos funcionais e estruturais desses canais e também para uso terapêutico (Catterall *et al.*, 2005).

1.4.2.5. Peptídeos com ação inseticida

Estima-se uma perda de cerca de 20% das áreas agrícolas devido à ação de pragas, geralmente artrópodes, o que representa fator significativo para a limitação da produção de alimentos (Oerke e Dehne, 2004). Além disso, muitos artrópodes são vetores para a transmissão de várias doenças que atingem humanos (Gratz, 1999). A abordagem tradicional de controle de pragas em sistemas agrícolas baseia-se na utilização sazonal de pesticidas químicos, sendo a redução de pragas uma resposta à quantidade utilizada ou à sua toxicidade. Porém, tem-se observado que o uso persistente de pesticidas pode causar um aumento na resistência por parte dos insetos e levar a danos na saúde humana através do acúmulo de químicos prejudiciais ao longo da cadeia alimentar. A poluição causada pelos

pesticidas é um problema tanto para o ambiente como para os insetos não-alvo, que algumas vezes são mais afetados que os próprios insetos-alvo (Georgescu e Zhang, 2010).

Como alternativa, técnicas de controle de pragas com menor impacto ambiental têm sido buscadas a fim de se manter as espécies alvo em um patamar abaixo do nível de impacto econômico, enquanto os demais organismos são preservados (Georgescu e Zhang, 2010). Essas técnicas incluem os métodos mecânicos, como barreiras ou armadilhas para capturar pragas, e os métodos biológicos, dentre os quais se destacam a reprodução de predadores naturais das pragas, o uso de inseticidas biológicos como *Bacillus thuringiensis* (Bt) ou fungos entomopatogênicos ou a interrupção do processo reprodutivo da praga através da inserção de indivíduos estéreis (Hansen *et al.*, 2006; Nagai e Yano, 2000; Frankenhuyzen, 2009; Gurr e Kvedaras, 2010; Ferry *et al.*, 2006).

Outros agentes estudados desde a década de 40 como estratégia de controle biológico são os baculovírus, vírus patogênicos a insetos, principalmente à Lepidoptera, e que não infectam plantas nem vertebrados (Bonning e Hammock, 1996; Inceoglu *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 1998). Devido a sua alta especificidade, os baculovírus têm sido considerados como agentes seguros de controle biológico de insetos-praga, pois não afetam as populações não-alvo, diferentemente da maioria dos pesticidas químicos (Inceoglu *et al.*, 2001). Desde os anos 80, o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) tem sido utilizado em mais de um milhão de hectares por ano no Brasil para controle biológico da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis*, atingindo cerca de 10% da área cultivada com soja no país na safra 1997/98 (Moscardi, 1999). Alguns anos depois, reportou-se sua utilização em aproximadamente 1.400.000 ha de soja no país, sendo 40% desse uso concentrado no Estado do Paraná, com crescente expansão para a região central do país (Moscardi e Souza, 2002). O sucesso do projeto com baculovírus como biopesticida no Brasil tem levado ao interesse gradual de outros países (Szewczyk *et al.*, 2006; Rohrmann, 2011).

No entanto, uma das maiores limitações dos baculovírus é o grande tempo de latência para exercer sua atividade inseticida. Os NPVs tipo-selvagem geralmente levam de dias a semanas para matar seus alvos e durante esse tempo o inseto continua a se alimentar, danificando a plantação (Bonning e Hammock, 1996). Uma das formas de abordar essa lacuna baseou-se em técnicas de engenharia molecular, através da expressão heteróloga de neurotoxinas inseticidas, como de escorpiões (McCutchen *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1991;

Cory *et al.*, 1994; Gershburg *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2002), aranhas (Prikhod'ko *et al.*, 1996; 1998; Hughes *et al.*, 1997) e anêmonas (Prikhod'ko *et al.*, 1996, 1998). Todas demonstraram reduzir o intervalo de tempo entre a aplicação do vírus e a morte do inseto. Além disso, a introdução da toxina parece não alterar a especificidade do vírus ou sua habilidade em se replicar (Inceoglu *et al.*, 2001). Entretanto, a atitude relutante de sociedades europeias (e também de outras regiões) em relação a produtos geneticamente modificados tem dificultado sua introdução (Szewczyk *et al.*, 2006).

Os peptídeos com atividade inseticida da peçonha de aranhas são, em sua maioria, relativamente pequenos (3 a 6 kDa) e ricos em pontes dissulfeto, o que aumenta sua estabilidade *in vivo* e resistência a proteases, possibilitando a redução da degradação na glândula de peçonha e na presa após envenenamento. Essas toxinas geralmente causam a morte ou a rápida paralisção da presa através da interação com canais iônicos e receptores do sistema neuromuscular (Nicholson, 2007). Devido à estrutura estável dessas moléculas, elas podem ser transportadas rapidamente, via difusão, na hemolinfa de insetos, alcançando seu alvo molecular (Corzo e Escoubas, 2003).

Até o momento, no banco de dados ArachnoServer (Herzig *et al.*, 2011), estão cadastradas cerca de 100 toxinas peptídicas de aranhas com ação em insetos de diferentes ordens (Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattaria e Coleoptera). Enquanto a maioria delas foi testada e ativa em insetos pertencentes a apenas uma ordem, 16 foram tóxicas a insetos de duas ou mais ordens, sendo algumas delas ativas também em mamíferos. O alvo molecular de muitas dessas toxinas inseticidas são canais Ca_v e Na_v , ou ainda, em menor quantidade, canais de potássio ativados por cálcio (K_{Ca}) ou receptores ionotrópicos glutamatérgicos. Todavia, mais da metade desses compostos permanece sem seus alvos moleculares caracterizados (Herzig *et al.*, 2011). Na Tabela 2 estão mostradas algumas toxinas de aranhas seletivas a insetos caracterizadas até o momento.

Tabela 2. Exemplos de peptídeos inseticidas isolados da peçonha de aranhas com ação em diferentes canais iônicos.

UniProt	Peptídeo	Espécie	Ensaio	Dose tóxica	Alvo molecular	Referência
P59368	Tx4(6-1) (δ -CNTX-Pn1a)	<i>Phoneutria nigriventer</i>	DL ₅₀	3,8 ± 2 ng/mosca (<i>M. domestica</i>)	Canais Na _v (sítio 3)	(Figueiredo <i>et al.</i> , 1995)
P83558	Magi-2 (μ -HXTX-Mg1a)	<i>Macrothele gigas</i>	DL ₅₀	17,6 nmol/g (<i>Spodoptera litura</i>)	Canais Na _v (sítio 3)	(Corzo <i>et al.</i> , 2003)
P83256	δ -PaluIT1 (δ -AMATX-PI1a)	<i>Pireneitega luctuosa</i>	DL ₅₀	9,5 ± 3,7 μ g/g (<i>S. litura</i>)	Canais Na _v (sítio 4)	(Corzo <i>et al.</i> , 2000)
P83257	δ -PaluIT2 (δ -AMATX-PI1b)	<i>Pireneitega luctuosa</i>	DL ₅₀	24,7 ± 11,18 μ g/g (<i>S. litura</i>)	Canais Na _v (sítio 4)	(Corzo <i>et al.</i> , 2000)
P83258	δ -PaluIT3 (δ -AMATX-PI1c)	<i>Pireneitega luctuosa</i>	DL ₅₀	12,3 ± 5,0 μ g/g (<i>S. litura</i>)	Canais Na _v (sítio 4)	(Corzo <i>et al.</i> , 2000)
P11057	μ -Aga-I (μ -AGTX-Aa1a)	<i>Agelenopsis aperta</i>	DL ₅₀	28 ± 7 μ g/g (<i>Manduca sexta</i>)	Canais Na _v	(Skinner <i>et al.</i> , 1989)
P11058	μ -Aga-II (μ -AGTX-Aa1b)	<i>Agelenopsis aperta</i>	DL ₅₀	75 ± 27 μ g/g (<i>M. sexta</i>)	Canais Na _v	(Skinner <i>et al.</i> , 1989)
P60178	μ -Aga-III (μ -AGTX-Aa1c)	<i>Agelenopsis aperta</i>	DL ₅₀	28 ± 12 μ g/g (<i>M. sexta</i>)	Canais Na _v	(Skinner <i>et al.</i> , 1989)
P11060	μ -Aga-IV (μ -AGTX-Aa1d)	<i>Agelenopsis aperta</i>	DL ₅₀	40 ± 9 μ g/g (<i>M. sexta</i>)	Canais Na _v	(Skinner <i>et al.</i> , 1989)
P15967	curtatoxin I (μ -AGTX-Hc1a)	<i>Hololena curta</i>	DL ₅₀	20 μ g/g (<i>Acheta domestica</i>)	Canais Na _v	(Stapleton <i>et al.</i> , 1990)
P60177	curtatoxin II (μ -AGTX-Hc1b)	<i>Hololena curta</i>	DL ₅₀	4 μ g/g (<i>A. domestica</i>)	Canais Na _v	(Stapleton <i>et al.</i> , 1990)
P82228	J-ACTX-Hv1c (κ -HXTX-Hv1c)	<i>Hadronyche versuta</i>	DL ₅₀	167 ± 10 pmol/g (<i>A. domestica</i>)	Canais BK _{Ca}	(Gunning <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2000)
ND	κ -TRTX-Ec2a	<i>Eurocratoscelus constrictus</i>	IC ₅₀	3,7 nM (<i>Gryllus bimaculatus</i>)	Canais BK _{Ca}	(Windley <i>et al.</i> , 2011)
ND	κ -TRTX-Ec2b	<i>Eurocratoscelus constrictus</i>	IC ₅₀	25,3 nM (<i>G. bimaculatus</i>)	Canais BK _{Ca}	(Windley <i>et al.</i> , 2011)
P56207	ω -ACTX-Hv1a (ω -HXTX-Hv1a)	<i>Hadronyche versuta</i>	DL ₅₀	89 ± 10 pmol/g (<i>A. domestica</i>)	Canais Ca _v	(Fletcher <i>et al.</i> , 1997; Wang <i>et al.</i> , 1999)
P83580	ω -ACTX-Ar1a (ω -HXTX-Ar1a)	<i>Atrax robustus</i>	DL ₅₀	236 ± 28 pmol/g (<i>A. domestica</i>)	Canais Ca _v	(Chong <i>et al.</i> , 2007)
P82852	ω -ACTX-Hv2a (ω -HXTX-Hv2a)	<i>Hadronyche versuta</i>	DP ₅₀	160 ± 9 pmol/g (<i>A. domestica</i>)	Canais Ca _v	(Wang <i>et al.</i> , 2001)
P61104	HWTX-V (ω -TRTX-Hh2a)	<i>Haplopelma schmidti</i>	DE ₅₀	16 ± 5 μ g/g (<i>Migratory manieusis</i>)	Canais Ca _v	(Deng <i>et al.</i> , 2008; Zhang <i>et al.</i> , 2003)

ND = não determinado

Em busca de novas estratégias para o controle de pragas, Hughes e colaboradores (1997) produziram dois AcMNPVs (NPVs de *Autographa californica*) recombinantes expressando genes de neurotoxinas inseto-seletivas de *Tegenaria agrestis* e *Diguetia canities*. Observou-se uma redução significativa tanto no tempo médio para cessar a alimentação (FT₅₀) quanto no tempo médio de sobrevivência (ST₅₀) nas três larvas de Lepidoptera (*Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* e *Heliothis virescens*) infectadas com esses vírus em relação às larvas infectadas com AcMNPVs tipo-selvagem. Larvas infectadas com AcMNPVs recombinantes expressando o gene quimérico da μ -agatoxina-IV (μ -Aga-IV ou μ -AGTX-Aa1d) com a melittina, da abelha *Apis mellifera*, também morreram mais rapidamente do que aquelas infectadas com os vírus controle (Prikhod'ko *et al.*, 1996). Além disso, a co-expressão em AcMNPVs das toxinas μ -Aga-IV e As II – esta última da anêmona *Anemonia sulcata* – reduziu significativamente o FT₅₀ em relação aos vírus expressando uma única toxina (Prikhod'ko *et al.*, 1998).

Khan e colaboradores (2006) mostraram que a toxina ω -ACTX-Hv1a (ω -HXTX-Hv1a) isolada da peçonha da aranha *Hadronyche versuta* (Hexathelidae), mantém sua atividade biológica antagonista de canal de cálcio específico de inseto quando expressa em sistema heterólogo. Expressa em plantas *Nicotiana tabacum*, a toxina efetivamente protegeu as plantas de ambas as larvas testadas (*Helicoverpa armigera* e *Spodoptera littoralis*), com 100% de mortalidade em 48 h. A ω -ACTX-Hv1a é um peptídeo de 37 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto e é considerada como um dos peptídeos inseticidas mais potentes caracterizados até o momento, sendo tóxica para uma série de artrópodes de importância agrícola das ordens Coleoptera, Lepidoptera e Diptera, mas sem efeitos reportados para mamíferos (Fletcher *et al.*, 1997; Atkinson *et al.*, 1998; Tedford *et al.*, 2004).

Um estudo semelhante foi realizado ao clonar e expressar a toxina Magi-6 (U7-HXTX-Mg1a), da aranha *Macrothele gigas* (Hexathelidae), em plantas de tabaco (Hernández-Campuzano *et al.*, 2009). Não foram observadas alterações morfológicas nas linhagens transgênicas nem mudanças no crescimento da planta. O ensaio biológico utilizando larvas herbívoras de *S. frugiperda* mostrou que as linhagens geneticamente modificadas foram significativamente mais resistentes que as plantas tipo-selvagem (Corzo *et al.*, 2003).

Embora a maioria dos estudos visando à utilização de baculovírus associados a toxinas inseticidas tenha sido realizada na década de 90, a existência de registros recentes

em bancos de patentes mundiais mostra que esse pode ser um campo promissor para investigações futuras e para o desenvolvimento de novos compostos com potencial uso agrícola (Regev *et al.*, 2003; Szewczyk *et al.*, 2006; US Pat. Nº 7,951,929; US Pat. Nº 7,880,060). Além disso, a utilização de baculovírus recombinantes pode, por exemplo, se expandir para além das plantações, visto que há baculovírus que almejam a vetores de doenças humanas, incluindo NPVs específicos para mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Moser *et al.*, 2001).

Em relação à biossegurança de baculovírus recombinantes, não há evidências de que estes representem ameaças maiores para o meio ambiente e para animais do que os baculovírus tipo-selvagem (para revisão, ver Szewczyk *et al.*, 2006). No entanto, essa técnica suscita polêmica em vários segmentos da sociedade quanto à sua segurança ambiental e para a saúde humana, especialmente aqueles com toxinas associadas, o que comumente gera aversão. É possível que com a mudança de mentalidade dos legisladores de alguns países, os biopesticidas recombinantes adquiram, gradualmente, maior quota no mercado de pesticidas (Moscardi e Souza, 2002). A maior divulgação de informações sobre os riscos e benefícios dos pesticidas químicos e biológicos para o público geral também é um fator importante para que isso aconteça. Embora não haja dúvida que biopesticidas baseados em formulações de baculovírus representam um risco muito menor ao meio ambiente que os pesticidas químicos clássicos, mais testes em campo são necessários para se ter uma avaliação mais completa dos seus benefícios e dos riscos potenciais ao ambiente e à saúde humana (Moscardi e Souza, 2002; Szewczyk *et al.*, 2006). Nos sistemas de expressão heteróloga de toxinas diretamente em plantas, testes avaliativos são ainda mais importantes, principalmente quando se trata de uma planta destinada a consumo humano.

1.4.3. Seletividade e promiscuidade de toxinas de aranhas

Embora algumas aranhas de maior tamanho possam predar vertebrados, como pequenos répteis, sapos, roedores, peixes e pássaros, a maioria das presas de aranhas é constituída de invertebrados, principalmente insetos. Assim, a evolução molecular desses componentes provavelmente selecionou toxinas que agem eficientemente em células excitáveis no sistema nervoso de insetos (Corzo e Escoubas, 2003).

Algumas toxinas peptídicas da peçonha de aranhas possuem, todavia, considerável especificidade e seletividade a canais iônicos de mamíferos, provavelmente devido à alta conservação evolutiva das proteínas de canal iônico através dos diversos grupos zoológicos. As δ -atraxotoxinas, por exemplo, ligam-se tanto a canais Na_v de insetos como de vertebrados (Gilles *et al.*, 2002). As δ -palutoxinas, em contrapartida, reconhecem apenas canais Na_v de insetos (Corzo *et al.*, 2000; Corzo *et al.*, 2005). Já a HWTX-IV mostrou-se efetiva apenas para canais Na_v neuronais sensíveis à TTX em mamíferos, sem efeito aparente em baratas ou em canais Na_v de músculo esquelético e cardíaco de anfíbios e mamíferos (Peng *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2008). Essa alta afinidade de toxinas por receptores particulares gera a possibilidade de se descobrir ferramentas de potencial farmacológico em muitas peçonhas de aranhas.

Apesar de muitos alvos moleculares ainda não terem sido satisfatoriamente investigados, grande parte das toxinas de aranhas estudadas até o momento apresenta promiscuidade entre as diversas famílias de canais iônicos (Fig. 6). ProTxI e ProTxII, por exemplo, da caranguejeira *T. pruriens*, inibem o canal $\text{Na}_v1.8$ resistente à TTX, e, além disso, ProTxI modifica correntes tipo T de canais $\text{Ca}_v3.1$ e também inibe canais $\text{K}_v2.1$, com 10 vezes menos potência que para canais Na_v (Middleton *et al.*, 2002). ProTxII possui ainda 82% de identidade com as frixotoxinas, que agem em canais K_v4 (Diochot *et al.*, 1999), embora essa atividade ainda não tenha sido investigada. Outro exemplo é a ω -GsTxSIA, da caranguejeira *G. spatulata*, a qual bloqueia canais Ca_v com correntes tipo N, P e Q em neurônios de rato (Piser *et al.*, 1995) e também inibe canais K_v *drk1*, embora com baixa afinidade (Li-Smerin e Swartz, 1998).

Toxina	Sequência	% C	Na _v	K _v	Ca _v
ProTx-I	----ECRYWLGCSA-GQTCCKHLV--CSR--R--HGWCVWDGTF-	100	●	●	●
HmTx2	----ECRYFWGECND-EMVCEHL--VCKEKWPITYKICVWDRTF--	68		●	
CcoTx3	GVDKEGCRKLLGGCT-IDDDCCPHL--GCNK----KYWHCGWDGTF--	67	●		
HmTx1	----ECRYLFGGCS--TSDCCKHL--CRS--D--WKYCAWDGTF-	66		●	
JzTx-IV	----ECTKFLGGCS-EDSECCPHL--GCKD----VLYYCAWDGTF--	61	●		
Hanatoxin	----ECRYLFGGCKT-TSDCCKHL--GCKF--R--DKYCAWDFTFS-	60	●	●	●
JzTx-IX	----ECTKLLGGCTK-DSECCPHL--GCRKKWP---YHCGWDGTF--	59	●	●	
JzTx-XI	----ECRKMFGGCSV-DSDCCAHL--GCKP--T--LKYCAWDGTF--	56	●	●	
SGTx1	----TCRYLFGGCKT-TADCCKHL--ACRS--D--GKYCAWDGTF--	56	●	●	
VSTx1	----ECGKFMWKCKN-SNDCCDL--VCSS--R--WKVCVLASPF--	56		●	
SNX-482	GVDKAGCRYMFGGCSV-NDDCCPRL--GCHS----LFSYCAWDLTFSD	54	●		●
GrTx-SIA	----DCVRFWKGCSQ-TSDCCPHL--ACKSKWP--RNICVWDGVS--	53		●	●
CcoTx1	----DCLGWFKSCDPKNDKCCKNYT--CSR----RDRWCKYDL----	53	●		
PaTx1	----YCQKMMWTCDS-ARKCCEGL--VCRL-----WCKKII----	52		●	
CcoTx2	----DCLGWFKSCDPKNDKCCKNYT--CSR----RDRWCKYYL----	50	●		
ProTx-II	----YCQKMMWTCDS-ERKCCCEGMV--CRL-----WCKKILW---	50	●		●
JzTx-V	----YCQKMMWTCDS-KRACCEGLR--CKL-----WCRKII----	48	●	●	
HnTx-IV	----ECLGFGKGCNPSNDQCCSSNLVCSRKHR---WCKYEI----	47	●		
HnTx-V	----ECLGFGKGCNPSNDQCCSSANLVCSRKHR---WCKYEI----	47	●		
JzTx-III	---DGECCGFWWKCGRGKPPCCRGY--ACSKTWG---WCAVEAP---	47	●	●	
HpTx2	----DDCGKLFSGCDT-NADCCCEGY--VCRL-----WCKLDW----	45		●	
PaurTx3	----DCLGFLWKCNPNDKCCR--PNLVCSRKDK---WCKYQI----	45	●		
HnTx-I	----ECKGFGKSCVPGKNECCS--GYACNSRDK---WCKVLL----	43	●		
HnTx-III	----GCKGFGDSCTPGKNECCP--NYACSSKHK---WCKVYL----	43	●		
TlTx-2	----DDCLGMFSSCDPKNDKCCP--NRVCRSRDQ---WCKYKLW---	38		●	
TlTx-3	----DDCLGMFSSCDPNNDKCCP--NRVCRVRDQ---WCKYKLW---	38		●	
HwTx-IV	----ECLIEIFKACNPSNDQCCSSKLVCSRKTR---WCKYQI----	37	●		
HwTx-I	----ACKGVFDACTPGKNECCP--NRVCSKHK---WCKWKL----	36			●
Magi5	----GCKLTFWKCKN-KKECCGW-N-ACALG-----ICMPR----	36	●		
GxTx-1E	---EGECGGFWWKCGSGKPAACP--KYVCSPKWG---LCNFPMP---	34			●
TlTx-1	----AACLGMPFSCDPNDKCCP--NRECNRKHK---WCKYKLW---	31		●	

Figura 6. Alinhamento de sequências de toxinas peptídicas de aranhas que atuam em canais iônicos dependentes de voltagem: toxinas com motivo ICK e três pontes dissulfeto cujo alvo são canais Na_v, K_v e/ou Ca_v (indicado pelos círculos cinzas). %C indica a porcentagem de resíduos conservados. Retirado de Bosmans e Swartz (2010).

Muitos estudos farmacológicos investigam apenas uma quantidade limitada de alvos moleculares para essas toxinas, enfatizando o fato de elas poderem interagir também com outros sítios. Isso ocorre em grande parte devido à quantidade limitada de peçonha e também à dificuldade em obter os variados subtipos de canais iônicos e modelos biológicos para experimentação. Porém, como as toxinas peptídicas de aranhas apresentam promiscuidade entre canais iônicos, essas potenciais drogas poderiam induzir diversos efeitos colaterais, sendo necessária certa cautela em sua utilização (Bourinet e Zamponi, 2005). Por outro lado, essa promiscuidade pode ser bastante vantajosa em relação a estudos com mutações sítio-dirigidas para o estudo de receptores e canais iônicos (Xiao *et al.*, 2010). Evolutivamente, as possibilidades múltiplas oferecidas pelas toxinas de aranhas permitem peçonhas mais eficientes e a exploração de nichos ecológicos adicionais e presas variadas (Corzo e Escoubas, 2003).

1.5. *ACANTHOSCURRIA PAULENSIS* MELLO-LEITÃO, 1923

No Brasil, ocorrem 36 gêneros e 185 espécies de aranhas Theraphosidae, e os gêneros com maior número de espécies são *Acanthoscurria*, *Lasiadora*, *Avicularia*, *Homoeomma* e *Vitalius* (Motta e Bertani, 2010). O gênero *Acanthoscurria* Ausserer, 1871 atualmente engloba 34 espécies, sendo duas delas encontradas na América Central e 32 na América do Sul. Dessas, 21 são citadas para o Brasil, restritas ou não (Platnick, 2011). As aranhas que constituem esse gênero possuem cerdas estridulatórias na face retrolateral do trocânter do pedipalpo. Os machos possuem bulbos com suas duas quilhas pró-laterais bem desenvolvidas e enroladas (Bertani, 2001). Infelizmente, a maioria das descrições data do século XIX e primeira metade do século XX, e não mencionam alguns caracteres morfológicos importantes para a análise taxonômica atual. Alguns espécimes não mais são encontrados em seu habitat natural, e outros estão em coleções nacionais, mas em estado de extrema fragilidade para serem analisados (Lucas *et al.*, 2010).

Dez espécies do gênero *Acanthoscurria* foram descritas para o Brasil por Mello-Leitão (1923), incluindo *A. paulensis*, cuja descrição foi baseada em um macho coletado em Pirassununga, no estado de São Paulo. Após analisarem diversos espécimes desse gênero localizados na coleção de aranhas do Instituto Butantan, Lucas e colaboradores (2010) detectaram a fêmea dessa espécie e ilustraram as estruturas sexuais de ambos os sexos, anteriormente não descritas. Além disso, nesse estudo, os autores propuseram *A. atrox* Vellard, 1924 como um sinônimo júnior de *A. paulensis* Mello-Leitão, 1923. Assim, adotamos nesse trabalho a nomenclatura sênior, *Acanthoscurria paulensis* Mello-Leitão, 1923.

A aranha *A. paulensis* (Araneae: Theraphosidae – Fig. 7) é uma migalomorfa grande, de cor acastanhada, de fácil identificação e encontrada em quase todo o Brasil central, incluindo os estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul (Fig. 8) (Lucas *et al.*, 2010). É comum em várias fitofisionomias do Cerrado do Distrito-Federal e regiões do entorno, principalmente dentro de cupinzeiros construídos por *Armitermes* sp., também utilizado como abrigo por diversas outras espécies de artrópodes e alguns representantes de vertebrados (Lourenço, 1978).



Figura 7. Fêmea de *Acanthoscurria paulensis* (Theraphosidae). Foto: C.B.F. Mourão.

Aparentemente sem inimigos naturais, a *A. paulensis* apresenta um comportamento bastante agressivo, sendo observado que essa espécie exerce predação sobre a maioria das espécies inquilinas dos cupinzeiros onde vivem, havendo preferência entre os Ortópteros (baratas do cerrado, grilos) e outras aranhas, incluindo caranguejeiras de menor tamanho. O canibalismo foi observado quando duas aranhas eram colocadas dentro do mesmo ambiente fechado, em que, após uma curta batalha, a aranha sobrevivente alimentava-se da outra. Assim sendo, para as aranhas adultas, apenas outra *A. paulensis* representaria um inimigo natural. Acredita-se, porém, que a existência de um território bastante definido seja responsável por uma redução de batalhas entre aranhas no habitat natural (Lourenço, 1978).

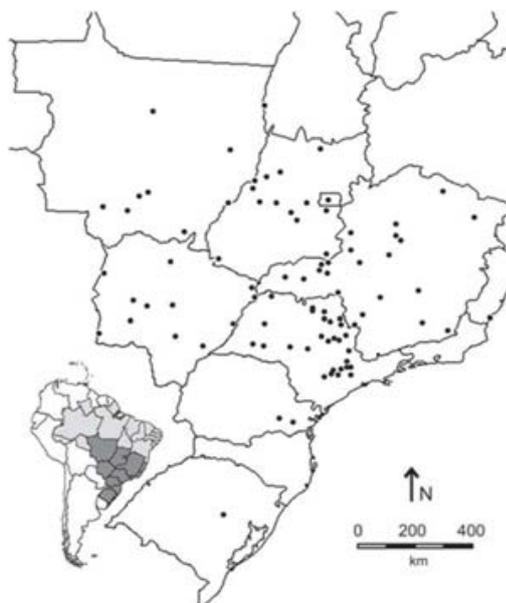


Figura 8. Distribuição geográfica descrita para *A. paulensis*. Retirado de Lucas *et al.* (2010).

As fêmeas dessa espécie apresentam maior comprimento de carapaça (parte dorsal do cefalotórax) que os machos, assim como pedipalpos maiores. Os machos possuem pernas mais longas que as fêmeas, o que facilita a procura de fêmeas e a fuga de ataques agressivos destas, além de possuírem em suas pernas esporões tibiais que são presos às quelíceras da fêmea no ato da cópula, na tentativa de evitar que a mesma ataque o macho quando esse estiver embaixo de seu corpo (Rodrigues, 2009). Os machos errantes de *A. paulensis* são encontrados preferencialmente entre janeiro e abril (meados a fim da estação chuvosa), época do acasalamento, sobrevivendo geralmente até dezembro do mesmo ano em que foram capturados. A postura dos ovos, alojados em uma grande ooteca protegida pela fêmea, ocorre de agosto a setembro. Após cerca de 90 dias eclodem cerca de 800 a 2000 filhotes (Motta e Bertani, 2010).

1.6. ESTUDOS PRÉVIOS COM A PEÇONHA DE *A. PAULENSIS*

Em 2007, iniciou-se no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília um estudo visando à caracterização química da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*. Por meio de técnicas de análise proteômica, verificou-se que a peçonha da aranha *A. paulensis* possui cerca de 100 componentes, distribuídos entre um intervalo de massas

moleculares de 635 a 21.895 Da, estando a maior parte compreendida entre 700 e 8.000 Da (Mourão *et al.*, 2008). Um dos compostos, eluído aos 35% de acetonitrila em cromatografia líquida de alta eficiência em coluna analítica de fase reversa (RP-HPLC), apresentou massa molecular monoisotópica $[M+H^+] = 5.458$ (detectada em MALDI-TOF MS) e teve seus 18 resíduos de aminoácidos iniciais da porção N-terminal elucidados (Mourão *et al.*, 2008). Esse composto apresentou similaridade com a HWTX-II (U1-TRTX-Hh1a), uma toxina inseticida com 37 resíduos de aminoácidos e seis resíduos de cisteína, as quais se ligam formando o motivo estrutural DDH, capaz de paralisar reversivelmente baratas por diversas horas, com DE_{50} de $127 \pm 54 \mu\text{g/g}$ de animal (Shu e Liang, 1999; Shu *et al.*, 2002).

Uma fração peptídica denominada Paulensis-A1, isolada por RP-HPLC da peçonha de *A. paulensis*, mostrou atividade antinociceptiva dependente da dose quando injetada via intracerebroventricular (i.c.v.) no ventrículo lateral de ratos (Araujo *et al.*, 2010). Para os ensaios, ratos Wistar machos receberam cirurgicamente uma cânula-guia em seu ventrículo lateral direito e, após 5-7 dias de recuperação, foram submetidos aos ensaios de analgesia com estímulo químico (teste de formalina) e térmico (teste *tail-flick*). O efeito antinociceptivo foi observado pela redução significativa ($p < 0,001$), comparada aos controles, no comportamento nociceptivo de levantar as patas nas duas fases do teste de formalina – fases neurogênica e inflamatória. No teste de estímulo térmico, a fração mostrou uma potente atividade antinociceptiva dependente da dose (2,5, 5 e 15 $\mu\text{g}/\text{animal}$), sendo que na maior dose testada o efeito durou por todo o ensaio (2 h). Essa fração ainda está em estudo, visando à purificação do peptídeo responsável pelo efeito antinociceptivo.

Compostos com ação anticonvulsivante da peçonha da *A. paulensis* também foram estudados, porém, a dificuldade em isolá-los – por eluírem nas frações mais hidrofílicas nas cromatografias por RP-HPLC – dificultou a continuação de sua caracterização (Mourão *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos com componentes da peçonha de aranhas têm demonstrado potencial utilidade dos mesmos como interessantes fontes de novas ferramentas para a pesquisa farmacológica e conduta terapêutica. Entretanto, apesar de um recente aumento de interesse na peçonha de artrópodes por vários grupos de pesquisa, ainda há muitos desafios para toxicologistas interessados na peçonha de aranhas caranguejeiras. Apenas uma pequena parcela dos peptídeos presentes na peçonha dessas aranhas é conhecida, quantidade ainda menor em se tratando de terafosídeas brasileiras, visto que, apesar da grande biodiversidade existente, maior parte dos estudos concentra-se em famílias de importância clínica.

Dentre os inúmeros compostos peptídicos com ação em canais iônicos e receptores celulares, na peçonha de aranhas destacam-se peptídeos com atividade inseticida, os quais têm recebido atenção crescente nos últimos anos. A caracterização desses peptídeos é importante para a compreensão das bases moleculares e da seletividade de toxinas ao nível de receptores, para o desenvolvimento de novos biopesticidas, para prevenir plantas de interesse comercial de ataques de insetos herbívoros por meio da expressão heteróloga e futuramente, com o advento de mais estudos, para o possível combate a vetores de doenças recorrentes que atingem os humanos.

Estudos prévios realizados no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília (LTx – UnB) com a peçonha da *A. paulensis* demonstraram um peptídeo com sequência primária parcial semelhante à HWTX-II, cujo motivo estrutural utilizado é o DDH (Shu *et al.*, 2002). Além de ser um potencial peptídeo com atividade inseticida, esse composto pode auxiliar na compreensão da ocorrência do motivo DDH na peçonha de caranguejeiras. Também foram demonstradas potenciais atividades antinociceptiva e anticonvulsivante nessa peçonha. Espera-se que esse estudo venha a elucidar melhor o potencial biotecnológico dos compostos presentes na peçonha da aranha *Acanthoscurria paulensis*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo fazer uso das técnicas de análise proteômica, dentre as quais cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massa e degradação automática de Edman, para a identificação e caracterização de novas moléculas neuroativas da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*. Após a realização de diferentes ensaios biológicos, espera-se promover o levantamento do potencial farmacológico e terapêutico dessa peçonha.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição peptídica da peçonha da *A. paulensis* por meio de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa;
- Purificar os peptídeos mais abundantes da peçonha da *A. paulensis* e identificar suas estruturas primárias por meio de sequenciamento MS/MS ou por degradação automática de Edman (ambos auxiliados pela obtenção da sequência nucleotídica do precursor obtida por meio da biblioteca de cDNA construída);
- Caracterizar a atividade biológica dos peptídeos mais abundantes, em especial aquele de massa molecular monoisotópica igual a 5.458, e testá-lo quanto à atividade inseticida.

4. MATERIAL

Somente reagentes de grau analítico de diferentes fontes comerciais foram utilizados nos experimentos. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q (Millipore Reagent Water System, EUA).

4.1. SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Solvente A (Polar) – solução aquosa de ácido trifluoracético (TFA) 0,12% (v/v)

Solvente B (Apolar) – acetonitrila contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v)

4.2. COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

Foram utilizadas colunas comerciais analíticas C18 marcas Phenomenex (Synergi 4 μm Fusion-RP 80 Å, 250 x 4,60 mm, Phenomenex, EUA) e Shim-pack XR-ODS (Shimadzu 30 mm x 2,0 mm, partícula 2,2 μm , poro 12 nm), e uma coluna semipreparativa C18 marca Phenomenex (Jupiter 5 μm C18 300 Å, 250 x 10 mm, Phenomenex, EUA).

4.3. SOLUÇÕES PARA ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI TOF/TOF MS)

Matriz para ionização de peptídeos: matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (acetonitrila/água/TFA 3%; 5:4:1), sendo 3 μL de matriz para 1 μL de amostra.

Mistura de peptídeos e proteínas para calibração externa: é adicionada uma solução de matriz para ionização na proporção de 1:1 (v/v) à mistura de peptídeos e proteínas (Bruker Daltonics, Alemanha) (Tabela 3) antes da calibração.

Tabela 3. Mistura de peptídeos e proteínas para calibração externa no MALDI-TOF/TOF MS.

Peptídeo	Massa Molecular
Bradicinina (1-7)	757,4
Angiotensina II	1046,5
Angiotensina I	1296,7
Substância P	1347,7
Bombesina	1619,8
Substrato Renina	1758,9
ACTH clip (1-17)	2093,1
ACTH clip (18-39)	2465,2
Somatostatina (28)	3147,5
Insulina	5734,5
Ubiquitina I	8565,8
Citocromo C	12361,0
Mioglobina	16952,3

4.4. KITS COMERCIAIS UTILIZADOS

Extração de RNA: ZR-Duet™ DNA/RNA Miniprep (Zymo Research)

Construção da biblioteca de cDNA e clonagem gênica: *In-Fusion™ SMARTer™ cDNA Library Construction* (Clontech Lab., Palo Alto, CA, EUA), protocolo *Long-Distance PCR (LD-PCR)*

PCR de colônia: *Advantage 2 PCR Kit* (Clontech Lab., Palo Alto, CA, EUA)

Sequenciamento de nucleotídeos: ABI Prism BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit

4.5. ENZIMAS

PCR: *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, Brasil)

Digestão do peptídeo Ap1a: endopeptidase Glu-C de *Staphylococcus aureus* V8 (Sigma, Aldrich, EUA), pepsina imobilizada (Pierce, Rockford, IL, EUA), tripsina imobilizada (Pierce, Rockford, IL, EUA)

4.6. OLIGONUCLEOTÍDEOS

M13 Forward primer (-21): 5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3'

Advantage 2 PCR Kit (Clontech Lab., Palo Alto, CA, EUA):

Forward Screening Primer (10 μM): 5' - TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA - 3'

Reverse Screening Primer (10 μM): 5' - CCT CTT CGC TAT TAC GCC AGC - 3'

4.7. SOLUÇÕES PARA ENSAIOS ELETROFISIOLÓGICOS

Salina de inseto (em mM): 101 NaCl, 1 CaCl₂, 4 MgCl₂, 3 KCl, 5 glicose, 1,25 NaH₂PO₄, 20,7 NaHCO₃, pH 7,2 (Gu e O'Dowd, 2006).

Solução Ringer para anfíbios (em mM): 111 NaCl; 1,9 KCl, 1,1 CaCl₂, 2,4 NaHCO₃, 10 glicose, pH 7,2 (ajustado com NaOH).

Soluções para ensaio em receptor de acetilcolina tipo nicotínico (nAChR): solução extracelular padrão (em mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 D-glicose, pH 7,4 (ajustado com NaOH). Solução padrão da pipeta em $[Ca^{2+}]_i = 10^{-9}$ M (pCa 9) (em mM): 130 K⁺-aspartato, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 0,2 CaCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7,3 (ajustado com KOH).

Soluções para ensaio em canais de sódio: solução extracelular padrão (em mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 D-glicose, pH 7,4. Solução intracelular padrão (em mM): 130 aspartato de potássio, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA-KOH, 10 HEPES, pH 7,3.

5. MÉTODOS

5.1. LICENÇAS E AUTORIZAÇÕES

Os espécimes de *Acanthoscurria paulensis* necessários à execução deste projeto foram coletados conforme permissão legal (Licença número 24227-1) cedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) após submissão e aprovação do projeto de pesquisa. O projeto também foi submetido ao Conselho Técnico e Científico da Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (RECOR – IBGE) e aprovado para coleta de espécimes de *A. paulensis*, cadastrado na Base de Dados da RECOR com o código 52 PC.

Os ensaios biológicos realizados nesse estudo estão de acordo com o guia ético da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), a qual segue o guia de cuidado animal preparado pelo *Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources (National Research Council, EUA)*. Esforços foram feitos para evitar estresse desnecessário e dor aos animais experimentais, e o número de animais foi mantido ao mínimo necessário para testar o conceito.

5.2. ANIMAIS E COLETA

Indivíduos adultos de *Acanthoscurria paulensis* foram coletados na Reserva Ecológica do IBGE (RECOR), situada a 35 km ao sul do centro de Brasília (15° 56' 41" S e 47° 53' 07"W), e em outras áreas do Cerrado do Distrito Federal e regiões do entorno. As aranhas foram mantidas em recipientes plásticos, com substrato terroso e tampas perfuradas para passagem de ar. A alimentação ocorreu mensalmente com neonatos de camundongo (*Mus musculus*) e baratas *Leurolestes circumvagans* criadas no laboratório, além de água *ad libidum*. Exemplares de *A. paulensis* encontram-se tombados na coleção de Aracnídeos da Universidade de Brasília (UnB), sob responsabilidade do professor Dr. Paulo César Motta.

Os animais experimentais utilizados nesse estudo foram camundongos machos *Mus musculus* e dois indivíduos adultos machos de rã *Lithobates catesbeianus*. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, onde foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 h, com água e ração balanceada *ad libidum*.

5.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PEÇONHA

A peçonha de exemplares adultos de ambos os sexos de *A. paulensis* foi obtida mensalmente por meio de estimulação elétrica na região basal das quelíceras, sendo coletada em tubos de polietileno tipo *ependorf* de 1,5 mL colocados diretamente sob as quelíceras. As amostras foram ressuspensas em água Milli-Q e centrifugadas a $10.000 \times g$ por 10 min, para remoção do sedimento. Posteriormente, foram secas a vácuo e armazenadas a -20°C . A quantificação da peçonha bruta foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro (SpectraMax[®] Molecular Devices), medindo-se a absorvância do material a 280 nm, assumindo que uma unidade de absorvância em uma cubeta de quartzo de 1 cm de largura equivale a 1,0 mg/mL de concentração protéica (Caliskan *et al.*, 2006; Stoscheck, 1990).

5.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA (RP-HPLC)

5.4.1. Fracionamento da Peçonha Bruta

Alíquotas de 5,0 mg de peçonha bruta liofilizada de ambos os sexos de *A. paulensis* foram ressuspensas em uma solução de 0,12% de TFA/água (v/v) e centrifugadas por 10 min a $10.000 \times g$. O sobrenadante foi submetido a um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (RP-HPLC) Shimadzu Co. (Kyoto, Japão) série LC10A, equipado com um arranjo de diodo SPD-M10A, em uma coluna semipreparativa Phenomenex C18. Para a eluição utilizou-se um gradiente binário de solução aquosa de TFA 0,12% (A) e de solução de acetonitrila e TFA 0,1% (B), com um fluxo de 1,5 mL/min e detecção a 216 e 280 nm de absorvância. O gradiente iniciou-se com 0% de B por 10 min; seguido de 0 a 60% de B em 60 min; 60 a 100% de B em 10 min; e, finalmente, 100% B mantidos por 10 min, para então equilibrar a coluna novamente na solução A. As frações cromatográficas foram manualmente coletadas, secas a vácuo e armazenadas a -20°C . Sob as mesmas condições anteriores, porém utilizando-se de uma coluna analítica Phenomenex C18 e fluxo de 1,0 mL/min, foram cromatografadas alíquotas de 1,0 mg de peçonha bruta.

Para a realização do ensaio com a peçonha bruta em coração de rã (veja seção 5.12.2), um *pool* de peçonha de oito espécimes machos de *A. paulensis* foi obtido por extração mensal (conforme seção 5.3), durante um período de quatro meses. Alíquotas de

5,0 mg de peçonha bruta foram submetidas à RP-HPLC, em uma coluna semipreparativa C18 (Phenomenex, EUA), conforme protocolo descrito acima. A primeira fração, com tempo de eluição de 10 a 45 min (0 a 35% B), e a segunda fração, entre 45 e 74 min (35 a 64% B), foram separadamente coletadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, mantidos em gelo durante a corrida, e foram denominadas “fração de baixa massa molecular (FBMM)” e “fração protéica (FP)”, respectivamente, com base nos resultados obtidos por espectrometria de massa no presente estudo (ver seção 6.1.1). Para remoção dos solventes orgânicos, as amostras foram submetidas a um evaporador rotativo e, posteriormente, foram secas a vácuo em um liofilizador, quantificadas por peso seco em uma balança analítica de alta precisão e armazenadas a -20°C.

5.4.2. Purificação de Peptídeos

As frações de interesse obtidas a partir do fracionamento da peçonha bruta passaram por um ou mais passos de recromatografia em sistema de RP-HPLC em uma coluna analítica C18 (Phenomenex, EUA) utilizando-se fluxo de 1,0 mL/min e absorvância monitorada a 216 e 280 nm. Para a eluição, foram utilizadas as mesmas soluções descritas na seção 4.1, sendo o gradiente variável de acordo com o tempo de retenção de cada fração. As amostras foram manualmente coletadas, secas a vácuo e armazenadas a -20°C. Os peptídeos puros foram quantificados em espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare) a 280 nm, conforme instruções do fabricante.

5.5. ESPECTROMETRIA DE MASSA E SEQUENCIAMENTO MS/MS

Para a inspeção das massas moleculares (MS) e identificação das sequências de aminoácidos (MS/MS) das frações cromatográficas e peptídeos de interesse, utilizou-se nesse estudo espectrometria de massa em sistema MALDI TOF/TOF UltraFlex III (Bruker Daltonics, Alemanha). As frações solubilizadas em água Milli-Q foram dissolvidas em uma matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (acetonitrila/água/TFA 3%; 5:4:1), sendo 3 μ L de matriz para 1 μ L de amostra, e aplicadas em triplicata em uma placa de aço inoxidável. Para a calibração externa do espectrômetro utilizou-se uma mistura de peptídeos de massa molecular conhecida (Tabela 3). As análises de massa molecular foram realizadas

operando em modo positivo refletido e linear. A fragmentação dos peptídeos para o posterior sequenciamento MS/MS foi realizada no modo LIFT (Suckau *et al.*, 2003).

Utilizou-se também, para a análise de algumas amostras em modo MS, o espectrômetro micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização eletrospray (ESI) ortogonal e operado em modo positivo. As amostras foram diluídas em uma solução de acetonitrila 50% contendo 1% de ácido fórmico, em concentrações variadas, e foram aplicadas por infusão direta.

Para a análise dos dados foram utilizados os programas MassLynx™ 3.5 (Manchester, UK) e FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As análises de espectrometria de massa e sequenciamento MS/MS foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Espectrometria de Massa, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob supervisão do pesquisador Dr. Carlos Bloch Jr. e auxílio de seu aluno de doutorado Eder Barbosa.

5.6. SEQUENCIAMENTO N-TERMINAL DO PEPTÍDEO AP1A

Para a obtenção da sequência parcial N-terminal do peptídeo denominado Ap1a, realizou-se degradação automática de Edman com o peptídeo em sua forma natural, não reduzida, por meio do Sequenciador de Peptídeos e Proteínas Beckman LF 3000 Protein Sequencer (Palo Alto, CA, EUA). Essa atividade foi realizada no Instituto de Biotecnologia da *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM), Cuernavaca, México, em colaboração com o laboratório do Dr. Lourival Possani (Processo CNPq/CONACyT 490068/2009-0).

5.7. REDUÇÃO, ALQUILAÇÃO E DIGESTÃO DA AP1A COM GLU-C

Para complementação da sequência do peptídeo Ap1a, uma alíquota de 50 µg do peptídeo purificado foi reduzida com 50 µL de ditioltreitol (DTT) 25 mM em tampão carbonato de amônio 50 mM, sendo incubada sob agitação constante de 300 rpm a 60°C por 60 min. Após esse período, adicionou-se à alíquota 50 µL de iodoacetamida 25 mM em tampão carbonato de amônio 50 mM, sendo incubada sob proteção da luz, com agitação constante de 300 rpm, a 37°C por 40 min.

Após redução e alquilação, essa mesma alíquota, agora com 100 µL, foi digerida com a endopeptidase Glu-C de *Staphylococcus aureus* V8 (Sigma-Aldrich, EUA), por 60 min a 37°C, sob agitação constante de 300 rpm, sendo a razão de enzima/substrato utilizada de 1:25 (v/v) no volume final de 100 µL. Segundo fabricante, em tampão carbonato de amônio, pH 7,8, a clivagem é restrita à região carboxi-terminal de resíduos Glu somente.

Os peptídeos gerados após digestão foram fracionados em sistema UFLC utilizando uma coluna analítica C18 Shim-pack XR-ODS, com um gradiente binário de solução aquosa de TFA 0,1% (A) e de solução de acetonitrila e TFA 0,1% (B), fluxo de 0,4 mL/min e detecção a 216 e 280 nm. O gradiente iniciou-se com 5% de B por 5 min; seguido de 5-60% de B em 20 min; e 60-90% de B em 2 min, sendo os 90% de B mantidos por 3 min. As frações cromatográficas foram posteriormente analisadas em MALDI-TOF/TOF MS para determinação da massa molecular e sequenciamento MS/MS dos fragmentos de interesse.

5.8. BUSCA POR SIMILARIDADE

As sequências peptídicas obtidas por degradação automática de Edman e sequenciamento MS/MS em espectrômetro de massas foram submetidas a buscas por similaridade por meio dos programas Fasta3 sob o servidor ExPASy (*ExPASy Molecular Biology server*; <http://www.expasy.org>) e BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) com valores de expectância (*e-values*) ajustados para $< 10^{-5}$ para a identificação das possíveis funções desses peptídeos. Para o alinhamento de sequências, comparação das substituições de aminoácidos e cálculo de porcentagem de identidade entre pares de sequências, foi utilizado o *software* ClustalW 2.0 (Larkin et al., 2007).

5.9. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA E ELUCIDAÇÃO DO PRECURSOR DA AP1A

Uma biblioteca de cDNA foi construída a partir do RNA total extraído das glândulas de peçonha de uma única espécime fêmea adulta de *A. paulensis*. A aranha teve sua peçonha extraída por eletroestimulação cinco dias antes da extração de RNA. Para a remoção das glândulas, a aranha foi previamente anestesiada por 60 min a - 4°C e teve suas glândulas cirurgicamente removidas pela dissecação da porção basal das quelíceras. O RNA total foi extraído com o kit ZR-Duet™ DNA/RNA Miniprep (Zymo Research). A biblioteca de

cDNA foi construída com utilização do kit *In-Fusion™ SMARTer™ cDNA Library Construction* (Clontech Lab., Palo Alto, CA, EUA), seguindo o protocolo *Long-Distance PCR* (LD-PCR), sugerido para quantidades limitantes de RNA total inicial (< 1,0 µg). Os insertos de cDNA foram clonados no plasmídeo linearizado pSMART2IF (2716 pb) (Fig. 9). Os plasmídeos recombinantes foram utilizados na transformação de células eletrocompetentes *Escherichia coli* DH5α, as quais foram cultivadas em meio Luria-Bertani ágar com 150 µg/mL de ampicilina por 16 h a 37°C. As colônias foram utilizadas como modelo para a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos *Forward Screening Primer* (10 µM) e *Reverse Screening Primer* (10 µM), ambos adquiridos com o kit *Advantage 2 PCR* (Clontech Lab., Palo Alto, CA, EUA). Plasmídeos selecionados com cDNAs maiores que 300 pb foram isolados por lise alcalina e sequenciados a partir da sua extremidade 5' com o M13 *Forward Primer* em um sequenciador automático ABI 3130 XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante.

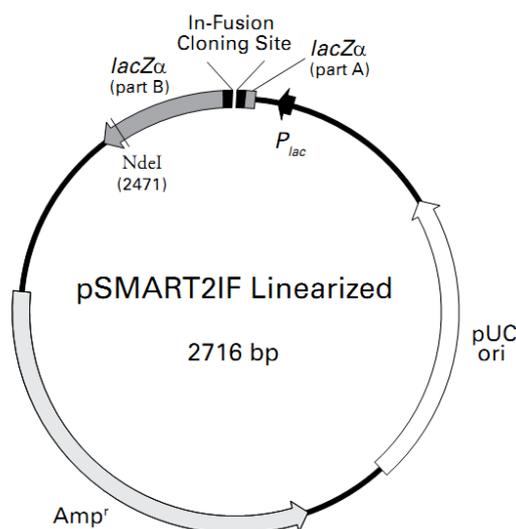


Figura 9. Mapa do vetor linearizado pSMART2IF e sítio de clonagem In-Fusion. Retirado de *In-Fusion™ SMARTer™ cDNA Library Construction Kit User Manual* (Clontech Lab., Palo Alto, CA, EUA).

Para a extração de sequências de alta qualidade, os cromatogramas resultantes do sequenciamento foram processados com o programa Phred, e as sequências com boa qualidade (pontuação ≥ 20 ; probabilidade de 0,01 de a base estar incorreta) foram, então, processadas pelo programa CrossMatch para a remoção de sequências de DNA do vetor. As

sequências nucleotídicas que compartilham uma identidade maior que 95% foram agrupadas em sequências consenso (*contigs*) e sequências únicas (*singlets*) pelo programa CAP3. Todas essas análises de bioinformática foram simultaneamente realizadas no sítio <http://www.biomol.unb.br/> utilizando as configurações padrões.

A sequência nucleotídica que codifica o peptídeo maduro correspondente ao peptídeo Ap1a, isolado da peçonha da aranha *A. paulensis*, foi submetida aos programas de busca de similaridade em bancos de dados não redundantes por meio dos algoritmos blastx e blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) considerando-se $e < 10^{-5}$ para a identificação das possíveis funções e estrutura desse composto. A região de provável peptídeo sinal foi predita pelo programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e comparada com os sítios de clivagens de toxinas maduras semelhantes previamente caracterizadas. Os alinhamentos múltiplos foram obtidos com o programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As massas moleculares teóricas monoisotópica e média da sequência putativa do peptídeo Ap1a foram calculadas pelo programa PeptideMass (<http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>). A sequência nucleotídica obtida nesse estudo será depositada no GenBank.

5.10. DETERMINAÇÃO DAS PONTES DISSULFETO DO PEPTÍDEO AP1A

Para determinação das pontes dissulfeto do peptídeo Ap1a, 100 µg do peptídeo purificado em sua forma não reduzida foram inicialmente submetidos à hidrólise enzimática com pepsina imobilizada (Pierce, Rockford, IL, EUA) em tampão de atividade (solução de acetato de sódio 20 mM, pH 4,5) a 37°C, por 90 min, sob agitação. Foram utilizados 5 µL de solução estoque de enzima, ativados de acordo com as instruções do fabricante, para um volume final de 30 µL de tampão. Para monitorar a reação, a cada 30 min, a solução com digestos era separada da pepsina imobilizada por centrifugação (5.000 × g por 2 min) e alíquotas de 1 µL eram retiradas do sobrenadante, misturadas à matriz saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico e analisadas em MALDI-TOF/TOF MS. Após a retirada da alíquota, a solução era homogeneizada e novamente mantida a 37°C sob agitação.

Após 90 min de reação, a amostra foi centrifugada (5.000 × g por 5 min) e o sobrenadante foi submetido a um sistema de RP-HPLC em coluna analítica Phenomenex C18,

a 216 e 280 nm e fluxo de 1,0 mL/min, com gradiente padrão de fracionamento da peçonha bruta. As frações cromatográficas foram manualmente coletadas, secas a vácuo e armazenadas a -20°C. Em seguida, foram ressuspensas em água Milli-Q e tiveram suas massas moleculares analisadas em MALDI-TOF/TOF MS no modo refletido positivo. As duas frações mais abundantes (P1 e P2) foram também analisadas em micrOTOF-Q II. Dessas, a primeira fração – cuja digestão por pepsina foi confirmada pela massa molecular – foi seca a vácuo e, posteriormente, digerida com tripsina imobilizada (Pierce, Rockford, IL, EUA).

A fração P1 foi ressuspensa em 30 µL de tripsina imobilizada solubilizada em tampão de atividade (carbonato de amônio 50 mM) e mantida sob agitação, a 37°C por 9 h. Para a obtenção desses 30 µL de enzima em tampão, foram utilizados 10 µL de solução estoque de enzima, ativados de acordo com as instruções do fabricante. O monitoramento da reação ocorreu de forma semelhante à digestão com pepsina, porém, com intervalos de 1 h entre cada análise por espectrometria de massas. Após a reação, a amostra foi centrifugada (5.000 × g por 5 min) e o sobrenadante foi submetido a um sistema UFLC utilizando uma coluna analítica C18 Shim-pack XR-ODS, nas mesmas condições descritas na seção 5.7. As frações cromatográficas foram manualmente coletadas, secas a vácuo e armazenadas a -20°C. Para determinação das massas moleculares e sequenciamento dos digestos trípticos, as frações cromatográficas foram analisadas em MALDI-TOF/TOF MS (MS e MS/MS) e micrOTOF-Q II. As frações nas quais foram detectados os fragmentos trípticos com pares de cisteínas foram posteriormente reduzidas com 10 µL de ditioltreitol (DTT) 10 mM em tampão carbonato de amônio 10 mM, e mantidas por 30 min a 60°C. Após a redução, uma alíquota de 1 µL de cada fração foi analisada por MALDI-TOF/TOF MS (MS e MS/MS).

A escolha das enzimas deu-se com base na predição dos potenciais sítios de clivagem de Ap1a pelas enzimas pepsina (em pH>2) e tripsina pelo *software* PeptideCutter (web.expasy.org/peptide_cutter/), estando cada resíduo Cys em um fragmento distinto (Tabela 4).

Tabela 4. Prováveis sítios de clivagem do peptídeo Ap1a com as enzimas pepsina e tripsina.
 Predição feita pelo *software* PeptideCutter.

Enzima	Nº de clivagens	Posição dos sítios de clivagem
Pepsina (pH>2)	4	4 5 6 46
Tripsina	12	12 15 17 25 28 30 32 33 39 41 43 47

Pn2 Tryps Pn2
 Pn2 Tryps Pn2
 Pn2 Tryps Pn2
 IIECFFSCEIEKDGKSKEGKPKPKGDKNKDKKCSGGWRCKIKMCLKI
 1-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----48

5.11. PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA AP1A

A predição da estrutura secundária da Ap1a foi realizada por meio da ferramenta disponível no servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

5.12. ENSAIOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS COM A PEÇONHA BRUTA

Os efeitos causados pela peçonha bruta de *A. paulensis* em camundongos e coração de rã foram avaliados durante a realização da disciplina “Farmacologia de Princípios Ativos de Origem Animal” do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da UnB.¹ Apenas a peçonha de espécimes machos foi utilizada para esses ensaios.

5.12.1. Ensaio de Toxicidade em Camundongos

A toxicidade da peçonha de *A. paulensis* foi avaliada pela determinação da dose letal 50% (DL₅₀) em camundongos, dose capaz de matar 50% dos animais testados. Para esse experimento foram utilizados camundongos machos de 28 ± 2 g. Quatro grupos experimentais (n = 5 cada) foram testados com diferentes doses de peçonha: 20, 25, 30 e 40 µg/g de animal. As alíquotas de peçonha foram dissolvidas em 100 µL de solução salina (NaCl

¹ Essa disciplina foi ofertada no segundo semestre de 2011, sob a supervisão dos professores Elisabeth Schwartz, Márcia Mortari e Carlos Schwartz e do doutorando Fagner Oliveira, com a minha participação.

0,9%) e injetadas via intraperitoneal (i.p.). O grupo controle (n = 5) foi injetado via i.p. com o volume correspondente de solução salina. A taxa de sobrevivência dos animais foi observada até 48 h após a inoculação. Ao fim do experimento, os animais sobreviventes foram eutanasiados com injeções de pentobarbital sódico (75 mg/kg). Os valores de DL₅₀ e os respectivos índices de confiança foram calculados usando o teste estatístico Probit (Finney, 1971), com o *software* BioStat 2009.

Para a caracterização das alterações comportamentais e fisiológicas provocadas pela peçonha de *A. paulensis* nos camundongos, todos os grupos do ensaio de toxicidade foram observados durante a primeira hora após o início do experimento de toxicidade. Foram consideradas as alterações visíveis nos animais injetados com peçonha e ausentes nos animais controle.

5.12.2. Ensaio de Atividade em Coração

5.12.2.1. Coração *in situ*

Para a avaliação da atividade da peçonha bruta de *A. paulensis* em coração de rã (*Lithobates catesbeianus*) *in situ*, o animal foi inicialmente anestesiado via *foramen magno* com cloreto de lidocaína 2% e, em seguida, espinhalado e decerebrado. O animal teve sua veia cava posterior canulada com um tubo de polietileno contendo solução Ringer para anfíbios. O nervo vago direito foi exposto ao nível da veia jugular e conectado a um par de eletrodos para estimulação a 6 V e 10 Hz com duração de 0,5 ms (S48 Stimulator - Grass Instrument Division, Warwick, RI, EUA). Para o registro mecânico, o esterno e o pericárdio foram removidos e o coração exposto foi conectado, por meio de uma pinça cardíaca, a um transdutor mecânico-elétrico (F-60, NarcoBio Systems). Os registros elétricos foram obtidos por meio de um eletrodo de sucção posicionado na região mediana do ventrículo, sobre o epicárdio. Esse eletrodo consistia em um tubo de polietileno com um fio metálico de prata cloretada em seu interior na extremidade próxima ao coração, preenchido com solução Ringer, e uma válvula com uma seringa na outra extremidade. O eletrodo foi conectado a um amplificador DC de alto ganho (NarcoBio Systems). Um segundo eletrodo metálico de prata cloretada foi inserido dentro da cavidade torácica da rã, servindo como conexão de "terra". Foram registradas as respostas a um estímulo vagal e à administração de peçonha bruta (500 µg). Após lavagem com solução Ringer, o coração foi tratado com atropina (2 µg)

e recebeu novamente estímulo vagal e a mesma dose de peçonha bruta. Os compostos foram administrados na veia cava posterior, em um volume de 200 µL.

5.12.2.2. Fatias Isoladas de Ventrículo

A peçonha bruta foi também avaliada quanto à sua atividade em fatia isolada de ventrículo de coração de rã. O mesmo foi realizado com suas frações peptídica (FP) e de baixa massa molecular (FBMM). Para isso, outro exemplar de *L. catesbeianus* foi imobilizado como descrito acima e, após a remoção do coração, fatias de aproximadamente 3 mm de ventrículo foram cortadas e imersas em um banho contendo solução Ringer para anfíbio constantemente aerada. Durante o ensaio, a fatia era montada em uma câmara preenchida com 2,0 mL de solução Ringer, com uma extremidade da fatia presa à base da câmara, onde encontravam-se os dois eletrodos, e a outra conectada ao transdutor (F-60, NarcoBio Systems). A fatia recebeu estímulos elétricos de 20 V e 0,15 Hz com duração de 2,0 ms (S48 Stimulator - Grass Instrument Division, Warwick, RI, EUA) e as contrações eram continuamente registradas em um polígrafo (NarcoBio Systems). A atividade cardíaca foi registrada e analisada após adição de acetilcolina (0,25 µg), peçonha bruta (50 µg), FP (50 µg) ou FBMM (12,5 µg) ao banho, havendo lavagens com solução Ringer entre cada tratamento. As fatias foram então tratadas com atropina (2 µg) e novamente testadas com as frações anteriores. Cada tratamento foi realizado em duplicata.

5.13. ENSAIOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS COM O PEPTÍDEO AP1A

O peptídeo Ap1a foi avaliado quanto a sua atividade inseticida em lagartas *Spodoptera frugiperda* e, para identificar seu provável sítio de ação, foram realizados também ensaios eletrofisiológicos com o circuito da Fibra Gigante de *Drosophila melanogaster* e com receptores nicotínicos de acetilcolina. Posteriormente, a Ap1a foi avaliada quanto a sua toxicidade em camundongos e em canais de sódio de vertebrados tipo Na_v1.2, Na_v1.4, Na_v1.5 e Na_v1.6.

5.13.1. Atividade Inseticida em Lagartas

O peptídeo Ap1a foi avaliado quanto a sua atividade inseticida em lagartas *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) pesando em média 100 mg cada. Com

auxílio de uma seringa Hamilton[®] de 10 µL acoplada por meio de uma cânula flexível a uma agulha Gengival tribiselada (Injecta[®], Brasil), foram injetados 2 µL de quatro diferentes doses do peptídeo (10, 15, 25 e 50 µg/g de animal) diluído em água na região ventral posterior do animal, entre o penúltimo e último par de pernas (n = 10 cada dose). O grupo controle (n = 15) foi injetado pela mesma via com 2 µL de água. As lagartas inoculadas foram mantidas individualmente em recipientes plásticos transparentes e monitoradas por intervalos regulares (1, 3, 5, 8, 12, 24 e 48 horas após o início do experimento). Para o cálculo da dose efetiva média (DE₅₀), dose com efeito em 50% dos animais testados, considerou-se o efeito de paralisia tanto parcial (locomoção afetada pela paralisia da metade posterior das lagartas) quanto total, e o período de 8 h de experimento. Os valores de DE₅₀ e os respectivos índices de confiança foram calculados utilizando o teste estatístico Probit (Finney, 1971), com o *software* BioStat 2009.

5.13.2. Circuito da Fibra Gigante de *Drosophila melanogaster*

Para observar os efeitos do peptídeo Ap1a no Sistema da Fibra Gigante (GFS) de *Drosophila melanogaster*, um circuito neuronal bem caracterizado que medeia a resposta de escape da mosca-doméstica (veja revisão por Allen *et al.*, 2006) e é composto por diferentes sinapses colinérgicas, conexões elétricas (junções comunicantes, ou *gap junctions*) e junções neuromusculares (JNMs) (Mejia *et al.*, 2010), pequenas quantidades do composto foram injetadas nas moscas vivas, com a obtenção simultânea de registros eletrofisiológicos. Esse experimento foi realizado em colaboração com o Dr. Frank Marí, do Departamento de Química e Bioquímica da *Florida Atlantic University* (FAU), em Boca Raton, FL, EUA, com auxílio de sua aluna Mari Heghinian, os quais participam do grupo responsável pela adaptação da técnica clássica de estudo do GFS para a caracterização da atividade biológica de toxinas (Mejia *et al.*, 2010).

Foram utilizadas moscas *w*¹¹¹⁸ e P{GawB}OK307 (Estoques #6326 e #6488, Bloomington Stock Center) de 2 a 6 dias de idade, fêmeas e machos (1,1 ± 0,1 mg), armazenadas em tubos de vidro à temperatura ambiente. As moscas foram anestesiadas com CO₂ e transferidas para uma resina composta dental, na qual foram imobilizadas com auxílio de uma pinça fina, mantendo-se a região dorsal exposta e as asas aderidas à resina.

Para a geração dos estímulos, dois eletrodos de tungstênio foram colocados no cérebro através dos olhos das moscas (Fig. 10). Para certificar-se da posição dos eletrodos, a Fibra Gigante foi estimulada com pulsos de 40-50 V com duração de 0,03 ms (S48 Stimulator - Grass Instrument Divion, Warwick, RI, EUA), sendo observados movimentos das asas e contrações dos músculos do tergotrocânter (TTM) e no músculo dorso longitudinal (DLM). Em alguns momentos, os eletrodos de estímulo foram também colocados na extremidade anterior do tórax para estimular os neurônios motores diretamente. Um terceiro eletrodo de tungstênio foi inserido no abdômen da mosca, servindo como “terra”.

Para o registro muscular, foram utilizados microeletrodos com 80 – 100 M Ω de resistência feitos a partir de um capilar de vidro de borosilicato com diâmetro externo de 1,0 mm e diâmetro interno de 0,58 mm (World Precision Instruments, EUA). Os capilares tiveram suas pontas estiradas em um estirador vertical de pipetas (Electrode Puller Model 700c, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) e, em seguida, foram preenchidos com solução salina de inseto. Um eletrodo de registro era posicionado em uma das fibras do músculo DLM e, do lado oposto, o outro eletrodo de registro era inserido nas fibras do músculo TTM (Fig. 10). A movimentação mecânica de todos os eletrodos para a aproximação e perfuração da mosca foi realizada por meio de micromanipuladores mecânicos, capazes de movimentos macros e micros nos três eixos. Os registros foram amplificados (5 A amplifier, Getting Instruments Inc, San Diego, CA, EUA) e armazenados em um computador com o *software* pCLAMP e uma interface Digidata 1440A (Molecular devices[®], Silicon Valley, CA, EUA).

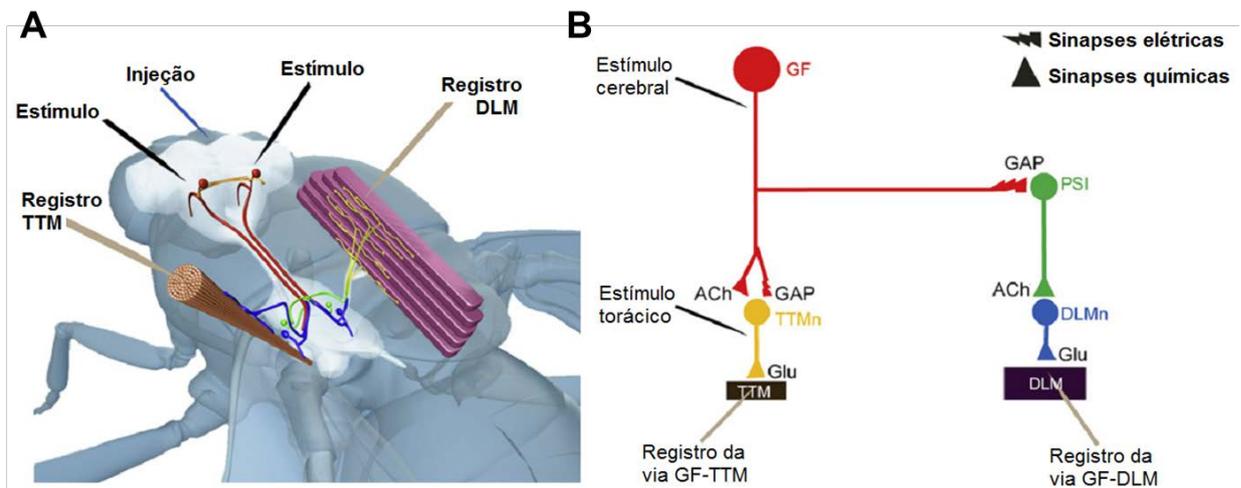


Figura 10. Sistema da Fibra Gigante (GFS) de *Drosophila melanogaster*. (A) Impressão artística indicando a posição do SNC da mosca, os neurônios da Fibra Gigante (GF), os músculos TTM e DLM e a posição relativa dos eletrodos de estímulo, registro e injeção. O eletrodo de aterramento não está ilustrado. (B) Esquema indicando os neurônios e as conexões do GFS. A fibra gigante (GF, em vermelho) transmite informações do cérebro ao gânglio torácico, onde forma sinapses elétricas (junções comunicantes, GAP) e químicas (neurotransmissor colinérgico, ACh) com os neurônios motores (TTMn, amarelo) do músculo do tergotrocâter (TTM, esquerda) e com o interneurônio sináptico periférico (PSI, verde). O PSI, por sua vez, forma sinapses colinérgicas com os neurônios motores (DLMn, azul) do músculo dorso longitudinal (DLM, direita). Ambas as junções neuromusculares do TTM e DLM são sinapses glutamatérgicas. Apenas metade do circuito bilateral está representada. Adaptado de Mejia *et al.* (2010).

Antes da injeção do composto, o Sistema da Fibra Gigante de cada mosca foi eletrofisiologicamente testado quanto à latência, frequência e amplitude de respostas com 10 trens de 10 estímulos a 100 Hz (1 s entre cada trem), resultando em um total de 100 estímulos, a fim de se obter um patamar para os efeitos da toxina. Apenas foram selecionadas moscas com respostas do tipo “selvagem”, definidas como tendo uma resposta de latência (tempo entre estímulo no cérebro e despolarização do músculo) entre 0,7 e 1,2 ms para o TTM e entre 1,3 e 1,7 ms para o DLM, assim como tendo as duas vias funcionais, GF-TTM e GF-DLM, com proporção 1:1 e aproximadamente 100% de frequência de respostas para ambas. Para monitorar quaisquer efeitos imediatos à injeção do composto sobre o GFS, as Fibras Gigantes foram estimuladas com pulsos únicos de 1 Hz gerados antes, durante e imediatamente após a injeção do composto, totalizando 100 pulsos, e as respostas do TTM e DLM foram registradas e armazenadas.

Logo após esse período de monitoramento (aproximadamente 1 min após a injeção), as vias GF-TTM e GF-DLM foram testadas quanto à frequência e amplitude de respostas com

10 trens de 10 estímulos a 100 Hz (1 s entre cada trem), resultando em um total de 100 estímulos. Frequência e amplitude foram calculadas como porcentagem e comparadas à média das respostas antes da injeção do composto e às moscas controle injetadas com salina (n = 10). Mudanças na forma e latência das respostas também foram observadas. Análises estatísticas dos valores da frequência e amplitude das respostas das vias GF-DLM e GF-TTM foram realizadas pelo teste ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste Bonferroni, comparando os valores obtidos em cada tempo de cada dose com o tempo equivalente do grupo controle (salina).

Para a injeção do composto, micropipetas de vidro (Nanoliter2000 borosilicate glass capillaries, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) foram estiradas em um estirador vertical de pipetas (Electrode Puller Model 700c, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) e tiveram suas pontas biseladas para uma abertura de 11 – 17 μm (K.T. Brown Type micropipette beveller, Sutter Instrument Co., Novato, CA, EUA). Após serem preenchidas com óleo de silicone, as micropipetas foram acopladas a um injetor automático Nanoliter2000 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA) e posicionadas em um micromanipulador para inserção na cabeça das moscas via ocelo e injeção da toxina (Fig. 10).

Para o ensaio com o peptídeo Ap1a, moscas foram injetadas com 46 nL do peptídeo diluído em salina de inseto nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 μM , o equivalente a 0,23, 1,15, 2,30 e 4,60 pmol/mosca (n = 8 \pm 2 cada). As respostas das vias GF-TTM e GF-DLM foram testadas com 10 trens de 10 estímulos a 100 Hz antes da injeção e imediatamente após o período de estímulos a 1 Hz (1 min), 5, 10 e 15 min após. As moscas controle (n = 10) foram injetadas com 46 nL de solução salina 0,7% em água deionizada.

5.13.3. Ensaio em Receptor de Acetilcolina tipo Nicotínico (nAChR)

Células do rabdiossarcoma da linhagem TE671 (Schoepfer *et al.*, 1988) foram rotineiramente cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) contendo 4,5 g/L de glicose e 10% de soro fetal bovino. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Todos os reagentes foram adquiridos da GIBCO®. Acetilcolina (ACh) e o peptídeo Ap1a foram adicionados à solução extracelular a partir de um estoque em água destilada. Soluções de trabalho nas concentrações finais foram preparadas a cada 2 h. As soluções extracelulares foram adicionadas por meio de um sistema de

microperfusão automático posicionado próximo à célula em estudo e o tempo médio de resposta foi de 1 s. Correntes geradas pela ativação dos receptores nicotínicos foram registradas à temperatura ambiente (20 - 25°C) utilizando um amplificador Axopatch 200 CV201 com o *software* pClamp7 (Molecular Devices, EUA). A resistência não compensada da pipeta foi cerca de 1-2 M Ω e a resistência de acesso celular foi menor de 3 M Ω . Os sinais de corrente foram filtrados em filtro passa-baixa Bessel 4 polos a 10 kHz e adquiridos pelo *software* a 20 kHz. Células foram “clampeadas” a 260 mV e correntes foram geradas pela aplicação do agonista ACh na concentração de 10 μ M por 4-6 s. Durante um experimento clássico, ACh foi aplicada pelo menos três vezes em intervalos de 90 s para confirmar a estabilidade atual e excluir artefatos do registro da atividade do canal. O efeito da Ap1a foi avaliado pela aplicação de 1 μ M, seguida imediatamente pela aplicação de ACh. Como controle positivo, aplicou-se 0,1 μ M da toxina α -BuTx (α -bungarotoxina), um antagonista de nAChR, seguida pela aplicação de ACh. Os dados foram analisados *off-line* usando pClamp9 e Origin7 (Microcal, EUA).

Esse ensaio foi realizado pela Dra. Rita Restano-Cassulini do Instituto de Biotecnologia da *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM), Cuernavaca, México, integrante do grupo do Dr. Lourival Possani.

5.13.4. Ensaio de Toxicidade em Camundongos

A toxicidade a mamíferos do peptídeo Ap1a foi avaliada em camundongos machos *Mus musculus* de 18 g por meio de injeções intracerebrais com auxílio de uma seringa Hamilton[®] de 10 μ L. O grupo controle (n = 3) foi injetado com 2 μ L de água deionizada cada. O grupo experimental (n = 3) recebeu uma única dose de 30 μ g de Ap1a por animal, em um volume de 2 μ L do peptídeo solubilizado em água deionizada. Os efeitos tóxicos do peptídeo foram analisados por meio da estatística descritiva, sendo os animais observados quantos às alterações comportamentais e fisiológicas durante o período de 1 h. Ao fim do experimento, os animais sobreviventes foram eutanasiados com injeções de pentobarbital sódico (75 mg/kg).

5.13.5. Ação em Canais de Na⁺

Células HEK (de rim embrionário humano) expressando canais humanos para sódio hNa_v1.2, hNa_v1.4, hNa_v1.5 e hNa_v1.6 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com

4,5 g/L de glicose, 10% de soro fetal bovino e geneticina (400 µg/ml) (Gibco BRL Life Technologies, Inc.). As células foram incubadas em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ a 37 °C. A Ap1a foi dissolvida na solução extracelular a partir de uma solução estoque em água. Correntes foram induzidas por pulsos (200 ms) de -120 mV a -10 mV precedidos por um pré-pulso de 5 ms a 50 mV (para testar a cinética de ativação), seguido de uma despolarização (50 ms) a -10 mV (para testar a cinética de inativação). O potencial de manutenção foi de -120 mV. Os dados foram adquiridos *on-line* por meio do amplificador 700B MultiClamp juntamente com Digidata 1440A e o *software* pClamp10 (Molecular Devices, EUA). A resistência da pipeta foi cerca de 1-3 MΩ e a resistência em série foi corrigida em pelo menos 80%. Os *software* Origin7 (OriginLab Corporation, EUA) e Clampfit10 (Dispositivo Molecular, EUA) foram rotineiramente utilizados durante a análise *off-line*. Esse ensaio foi realizado pela Dra. Rita Restano-Cassulini do Instituto de Biotecnologia da *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM), Cuernavaca, México.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISES COM A PEÇONHA BRUTA

6.1.1. Fracionamento Cromatográfico e Espectrometria de Massa

As alíquotas de peçonha bruta de *A. paulensis* foram fracionadas por RP-HPLC, produzindo perfis cromatográficos reproduzíveis. Optou-se por realizar ao longo desse estudo cromatografias com 5,0 mg de peçonha em coluna semipreparativa Phenomenex C18 (Phenomenex, EUA) (Fig. 11) em vez de 1,0 mg (Fig. 12) em coluna analítica Phenomenex C18 devido à melhor resolução obtida em modo semipreparativo, principalmente após os 35 min, onde estão as frações de maior interesse nesse estudo.

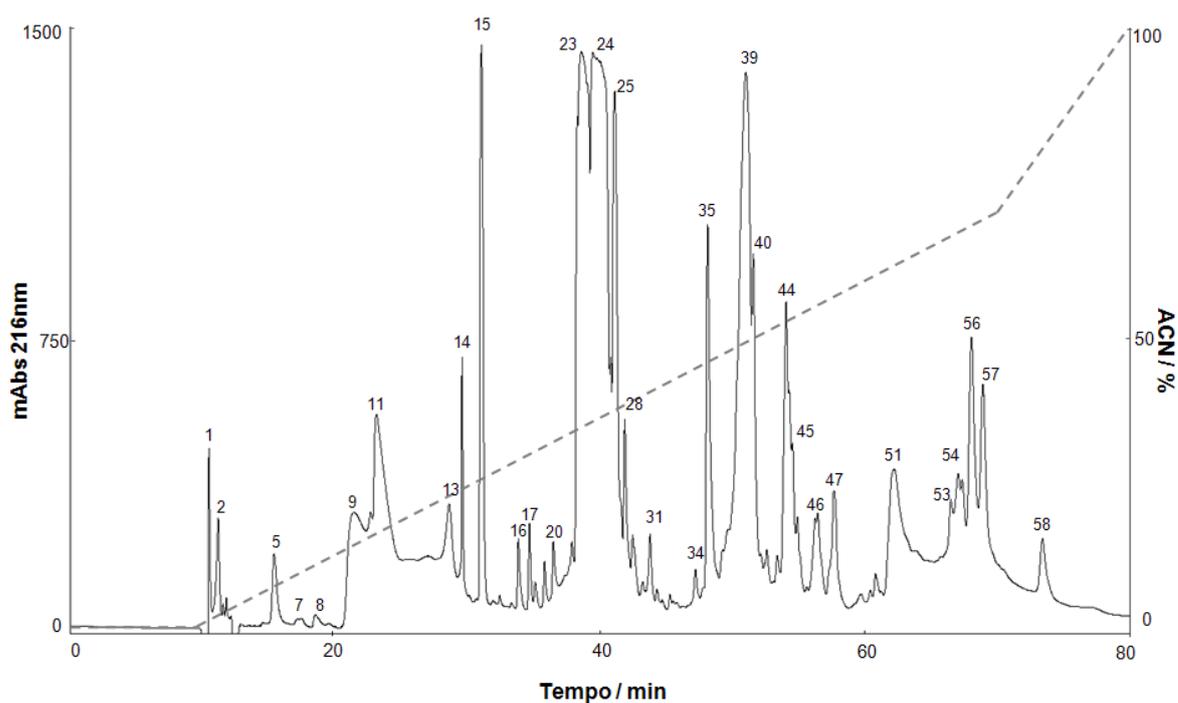


Figura 11. Perfil cromatográfico de 5,0 mg da peçonha bruta da aranha *A. paulensis*. Fracionamento por RP-HPLC em coluna semipreparativa Phenomenex C18, utilizando 5,0 mg de peçonha e monitoramento a 216 nm. O gradiente de acetonitrila (ACN) está representada pela linha tracejada. As principais frações encontram-se numeradas.

No fracionamento com 5,0 mg de peçonha bruta em coluna semipreparativa obteve-se um total de 58 frações cromatográficas, e com 1,0 mg de peçonha em coluna analítica 34 frações foram obtidas. Observa-se que em coluna semipreparativa (Fig. 11) todas as frações foram deslocadas para a direita, eluindo em porcentagens maiores de acetonitrila, em

relação ao fracionamento em coluna analítica (Fig. 12), ainda que o mesmo método de eluição tenha sido utilizado.

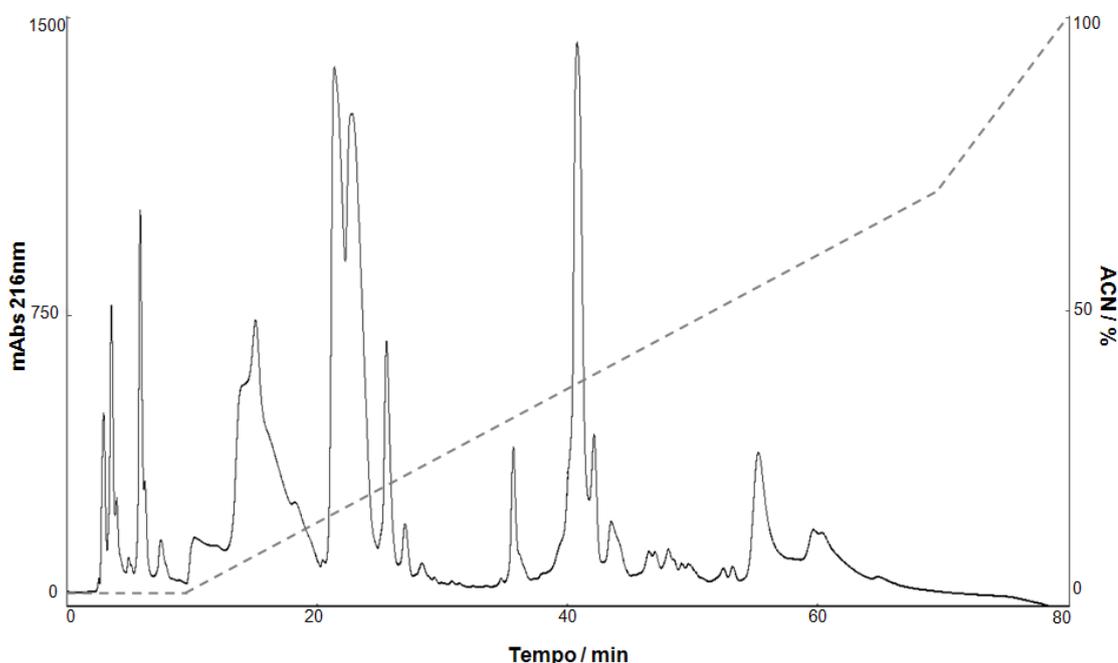


Figura 12. Perfil cromatográfico de 1,0 mg da peçonha bruta da aranha *A. paulensis*. Fracionamento por RP-HPLC em coluna analítica Phenomenex C18, utilizando 1,0 mg de peçonha e monitoramento a 216 nm. O gradiente de acetonitrila (ACN) está representado pela linha tracejada.

As 58 frações cromatográficas obtidas por RP-HPLC em coluna semipreparativa da peçonha de *A. paulensis* analisadas em MALDI-TOF/TOF MS apresentaram um total de 97 massas moleculares distintas, variando de m/z 601,4 a 21.932,3, estando algumas dessas presentes não apenas em uma, mas em várias frações ao longo da cromatografia. Em um gráfico de distribuição das massas moleculares em relação à hidrofobicidade (Fig. 13), observa-se a presença de compostos de baixa massa molecular (< 1 kDa) na maioria das frações analisadas. Os íons m/z 601,4 e 729,6 foram detectados em abundância e com alta intensidade em modo refletido (500 – 6.000 Da) na maioria das frações hidrofílicas, mas também estiveram presentes nas demais frações cromatográficas, em conjunto com os compostos de maior massa molecular. Compostos com maiores massas moleculares só foram detectados a partir da 33ª fração analisada, tanto em modo refletido (500 – 6.000 Da) quanto em modo linear (3,5 – 15 kDa e 10 – 40 kDa).

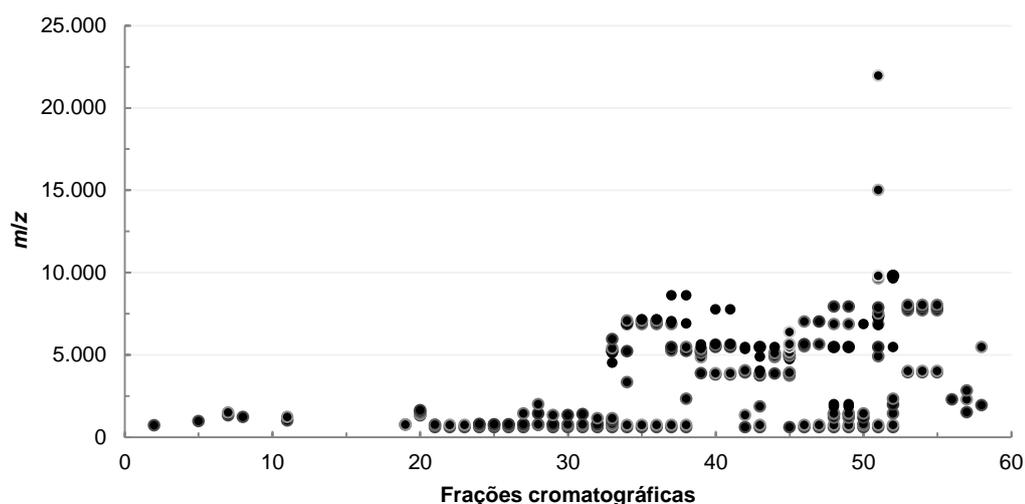


Figura 13. Distribuição das massas moleculares dos compostos presentes na peçonha de *A. paulensis* em função das frações cromatográficas obtidas em RP-HPLC em coluna Phenomenex C18 semipreparativa. Dados obtidos a partir de análise em MALDI-TOF/TOF MS, operando em modo refletido positivo e linear, com matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

Apenas dois íons (m/z 14.992,0 e 21.932,3) foram detectados acima de 10 kDa, estando 30% das massas moleculares obtidas compreendidas entre 500 e 1.999 Da, 38% entre 3.500 e 5.999 Da e 21% entre 6.500 e 7.999 Da (Fig. 14).

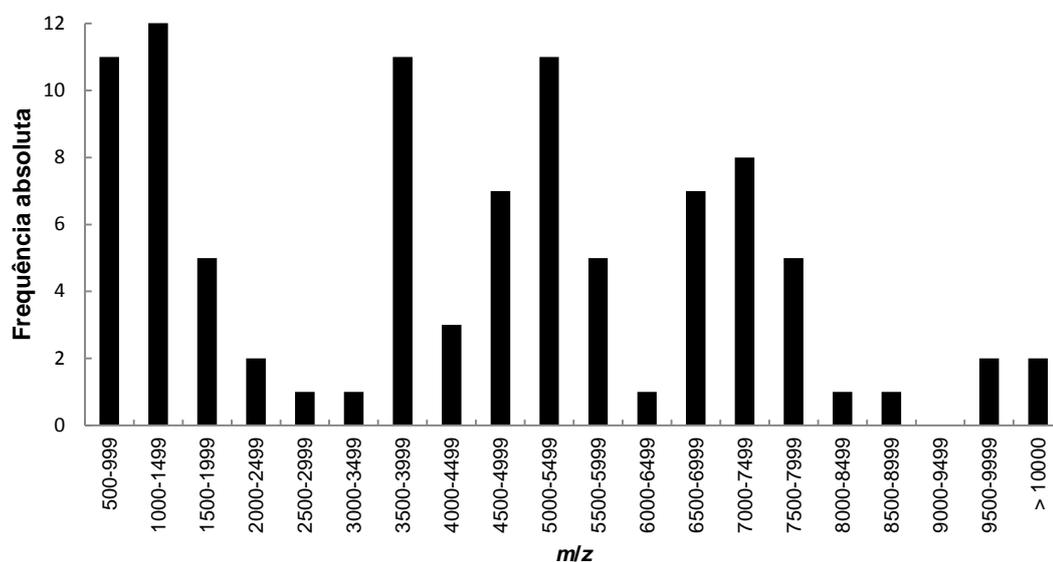


Figura 14. Frequência das massas moleculares obtidas das frações cromatográficas da peçonha de *A. paulensis*. Total de 97 massas moleculares distintas, com intervalo de 500 a 25.000 Da. Dados obtidos a partir de análise em MALDI-TOF/TOF MS, operando em modo refletido positivo e linear, com matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

6.1.2. Ensaio de Toxicidade em Camundongos

Durante o ensaio de toxicidade com a peçonha bruta da aranha *A. paulensis* em camundongos de 28 ± 2 g, observou-se que na dose inicial de 20 $\mu\text{g/g}$ de animal não houve letalidade no período de 48 h, embora tenham sido observados hipoatividade, prostração, contorções abdominais, dispneia, ataxia e constipação, conforme definições especificadas na tabela 5.

Nas doses intermediárias (25 e 30 $\mu\text{g/g}$ de animal), além desses sintomas relatados, houve espasmos abdominais, anúria e paralisia flácida generalizada, levando à morte 60% e 80% dos animais, respectivamente. Na maior dose (40 $\mu\text{g/g}$ de animal) todos os demais sintomas foram observados em todos os animais testados, além de espasmos generalizados, cianose, taquicardia, convulsão (próximo aos 5 min) e morte em aproximadamente 1 h 30 após o início do experimento.

Tabela 5. Alterações comportamentais e fisiológicas observadas no ensaio de toxicidade.

Alterações	Definição
Anúria	Redução ou ausência da eliminação de urina
Ataxia	Marcha cambaleante acompanhada de desequilíbrio postural
Cianose	Coloração azulada da pele e mucosas
Constipação intestinal	Evacuação reduzida
Contorções abdominais	Mover-se com movimentos contorcidos
Convulsões	Contrações musculares desorganizadas, súbitas, violentas e generalizadas
Dispneia	Dificuldade respiratória
Espasmos	Contração involuntária e brusca de pequenos grupos musculares
Espasmos abdominais	Contração involuntária de músculos abdominais
Hipoatividade	Redução dos movimentos normais do animal
Paralisia flácida	Perda do tônus muscular e fraqueza motora
Prostração	Fraqueza e perda de mobilidade normal
Taquicardia	Frequência cardíaca acelerada
Morte	Cessar definitivo das atividades fisiológicas

A dose letal média (DL_{50}) encontrada foi de $25,45 \pm 2,42 \mu\text{g/g}$ ($20,97 - 30,43$) (Fig. 15), o equivalente a uma dose de $763,5 \mu\text{g}$ por camundongo de 30 g , sendo esse o primeiro relato da DL_{50} para *A. paulensis*.

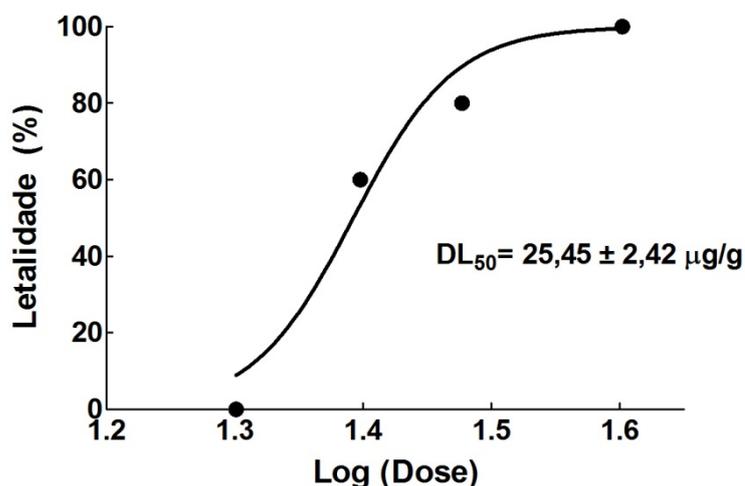


Figura 15. Curva dose-resposta obtida a partir de injeções i.p. em camundongos da peçonha de *A. paulensis*. $R^2 = 0,9618$.

6.1.3. Ensaio de Atividade em Coração

A avaliação dos registros obtidos em coração de rã *in situ* mostrou a parada cardíaca transiente produzida pelo estímulo vagal e após a administração da peçonha ($500 \mu\text{g}$) (Fig. 16). O estímulo vagal levou à redução da força de contração do coração (efeito inotrópico negativo) e da frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo), efeitos esses mediados pela liberação de acetilcolina (ACh) dos terminais nervosos autonômicos parassimpáticos. Observa-se a cessação da atividade elétrica imediatamente após o início do estímulo vagal, sendo esse efeito reversível após 30 s. A peçonha bruta apresentou efeito semelhante ao do estímulo vagal, com efeitos cronotrópico e inotrópico negativos, causando parada sinusal e parada cardíaca, reversíveis em 2 min e 10 s. O efeito do estímulo vagal foi completamente bloqueado na presença de atropina ($2 \mu\text{g}$), um bloqueador de receptores muscarínicos. Ao adicionar peçonha bruta ($500 \mu\text{g}$) no coração atropinizado, houve uma breve desestabilização no registro mecânico, sem alterações no registro elétrico, sugerindo o

bloqueio por atropina, mas uma alteração cardíaca mecânica devido ao mecanismo de Frank-Starling (com a adição de um volume adicional de solução Ringer, no qual a peçonha bruta estava diluída, o coração é mais distendido e tem sua força de contração alterada) (Guyton e Hall, 2006).

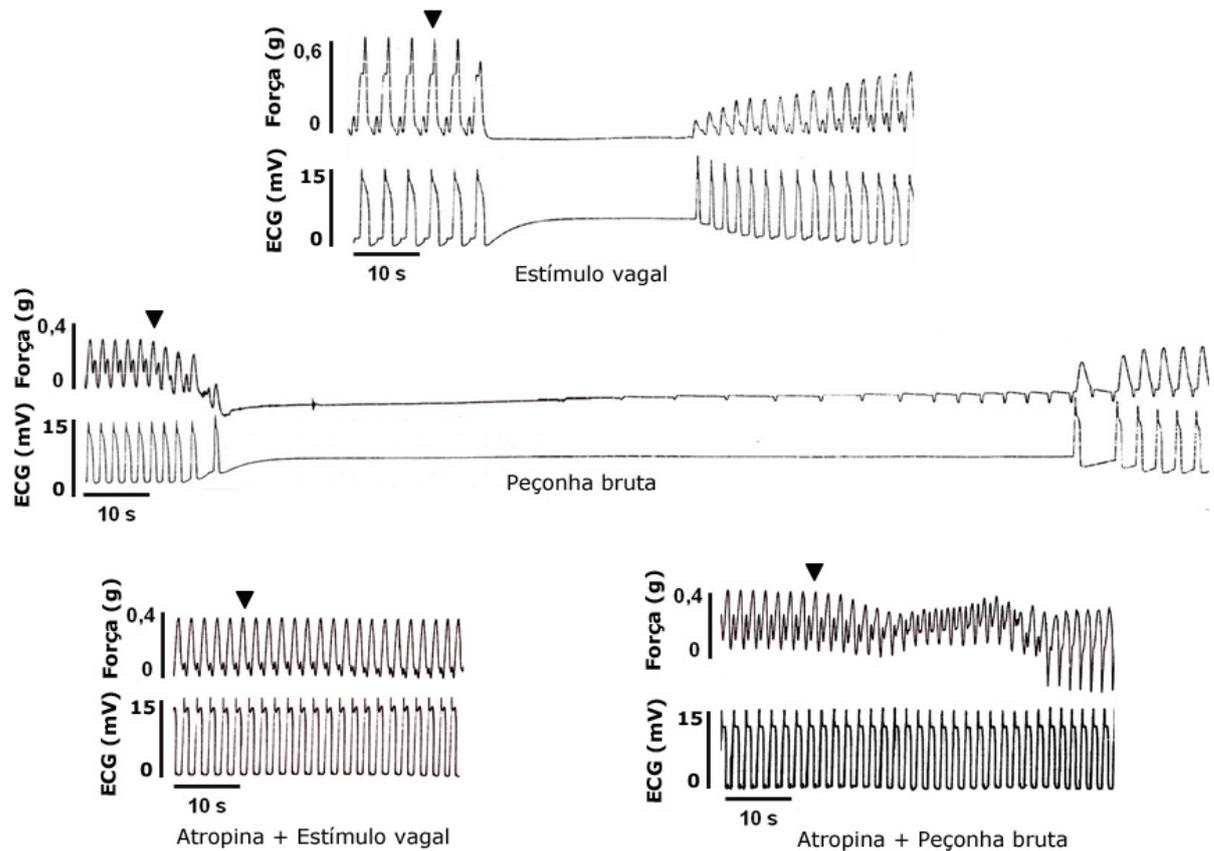


Figura 16. Efeitos do estímulo vagal e da peçonha bruta de *A. paulensis* em coração de rã *in situ*. Geração de força (superior) e atividade elétrica (inferior) foram registradas durante estímulo vagal (6 V e 10 Hz com duração de 0,5 ms), administração de peçonha bruta (500 μ g) ou de atropina (2 μ g) seguido dos mesmos tratamentos. Os compostos foram administrados na veia cava posterior, em um volume de 200 μ L. As setas indicam o momento de aplicação.

O ensaio com as fatias de ventrículo isoladas de coração de rã (Fig. 17) corroborou os resultados obtidos no coração *in situ*. A peçonha bruta (50 μ g) causou uma redução da força de contração do coração (efeito inotrópico negativo) semelhante ao produzido pela acetilcolina (0,25 μ g). Esse mesmo efeito foi reproduzido com a “fração de baixa massa molecular – FBMM” (12,5 μ g), mas não com a “fração protéica – FP” (50 μ g). A administração de atropina (2 μ g) ao banho contendo a fatia de coração causou um leve efeito inotrópico positivo, que se manteve após administração de ACh, peçonha bruta ou

FBMM. Na presença de atropina, os efeitos destes não foram mais observados. Os registros de ACh (0,25 μg) e FBMM (12,5 μg) na presença de atropina (2 μg) se igualaram ao de “atropina mais peçonha bruta”, mostrado na Figura 17, e, por isso, não foram ilustrados.

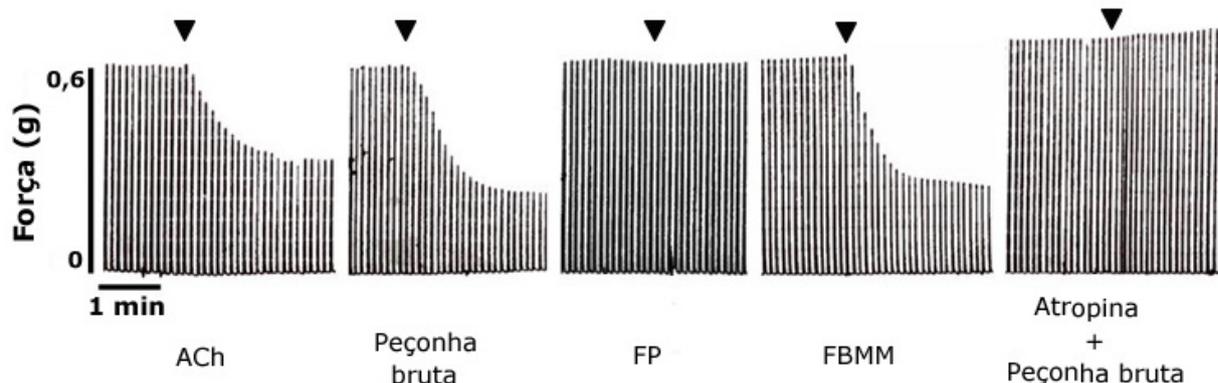


Figura 17. Registro da contração cardíaca ventricular após tratamentos com acetilcolina (ACh, 0,25 μg), peçonha bruta de *A. paulensis* (50 μg), fração protéica (FP – 50 μg), fração de baixa massa molecular (FBMM – 12,5 μg) e peçonha bruta (50 μg) na presença de atropina (2 μg). A fatia isolada de ventrículo recebeu estímulos elétricos de 20 V e 0,15 Hz com duração de 2,0 ms. Cada tratamento foi realizado em duplicata. As setas indicam o momento de aplicação.

6.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DO PEPTÍDEO AP1A

6.2.1. Fracionamento Cromatográfico e Espectrometria de Massa

A fração cromatográfica eluída aos 51,0 min (Fig. 11, fração número 39) passou por quatro processos adicionais de purificação por RP-HPLC em coluna analítica C18, até obtermos o peptídeo denominado Ap1a, por ser o primeiro peptídeo caracterizado da peçonha da aranha *Acanthoscurria paulensis*. Sua massa molecular, obtida em micrOTOF-Q II, foi de $[M+6H]^{6+} = 910,465$, o equivalente a $[M+H]^+ = 5.457,79$ (Fig. 18).

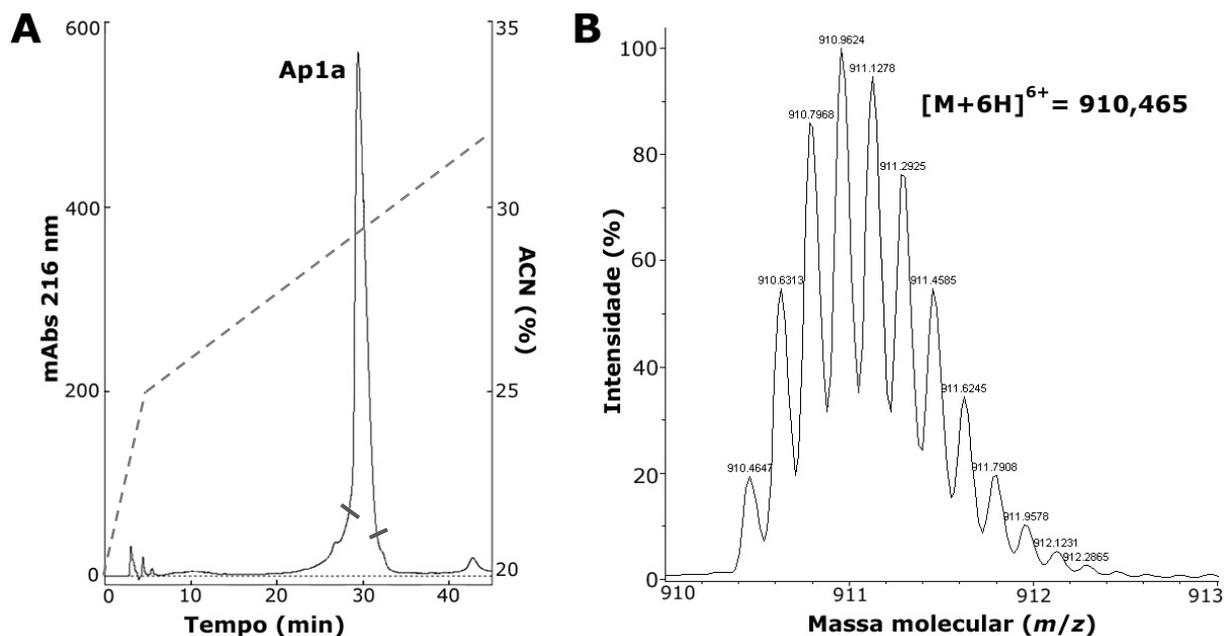


Figura 18. Purificação do peptídeo Ap1a e sua massa molecular. (A) Recromatografia do peptídeo Ap1a em sistema RP-HPLC em coluna Phenomenex C18 analítica. O gradiente de acetonitrila (ACN) está representado pela linha tracejada: 20-25% de B de 0-5 min, 25-32% B de 5-45 min, a 1 mL/min. Os dois traços na base do pico indicam o início e o final da coleta da fração. **(B)** Espectro de massa do peptídeo Ap1a obtido por micrOTOF-Q II, observando-se a distribuição monoisotópica do íon com seis prótons.

6.2.2. Sequenciamento e Similaridades

A determinação da estrutura primária do peptídeo Ap1a foi realizada por meio de diferentes estratégias complementares (Fig. 19). Dos 48 resíduos de aminoácidos que compõem o peptídeo, os 18 primeiros resíduos da região N-terminal (**IIECFFSCEIEKDGKSKE**) foram inicialmente resolvidos por degradação automática de Edman.

1	10	20	30	40	48
IIECFFSCEI	EKDGKSKEGK	PCKPKGDKNK	DKKCSGGWRC	KIKMCLKI	
IIECFFSCEI EKDGKSKE					
Degradação automática de Edman					
<u>IIECFFSCEI</u>	<u>EKDGKSKEGK</u>	<u>PCKPKGDKNK</u>	<u>DKKCSGGWRC</u>	<u>KIKMCLKI</u>	
Redução, alquilação e digestão com Glu-C					
IIECFFSCEI	EKDGKSKEGK	PCKPKGDKNK	DKKCSGGWRC	KIKMCLKI	
Sequência putativa (biblioteca de cDNA)					

Figura 19. Estrutura primária do peptídeo Ap1a e diferentes estratégias utilizadas para sua elucidação. Em duplo e simples sublinhado, sequências obtidas pelo sequenciamento MS/MS do primeiro e segundo fragmentos da digestão com Glu-C, respectivamente. Apenas uma sequência parcial foi obtida do segundo fragmento (simples sublinhado), sendo os últimos 10 resíduos da porção C-terminal (em cinza) obtidos apenas por análises transcriptômicas.

Após redução com DTT e alquilação com iodoacetamida, o peptídeo Ap1a foi submetido à digestão parcial com endopeptidase Glu-C, a partir da qual dois íons foram identificados por meio de MALDI-TOF/TOF MS: m/z 2.104,97 e m/z 3.548,48. Os dois íons foram submetidos à fragmentação em MALDI-TOF/TOF MS/MS no modo LIFT visando o sequenciamento *de novo* via MS/MS.

A interpretação do espectro gerado pela fragmentação do íon m/z 2.104,97 coincidiu com os primeiros 18 resíduos da porção N-terminal previamente obtidos por degradação automática de Edman (Fig. 20). A massa molecular monoisotópica teórica ($[M+H]^+$) desse fragmento peptídico, considerando as cisteínas reduzidas e não alquiladas, é igual a 2.104,99, muito próxima à massa molecular experimentalmente obtida cujo íon correspondente apresentou m/z 2.104,97, indicando que não houve alquilação nesses dois resíduos de cisteína (C_I e C_{II}). Exceto para esse espectro de fragmentação, no qual a sequência obtida foi idêntica à sequência anteriormente caracterizada por degradação automática de Edman, nos demais sequenciamentos *de novo*, a diferenciação dos resíduos isobáricos foi realizada *a posteriori*, com base na sequência precursora da Ap1a.

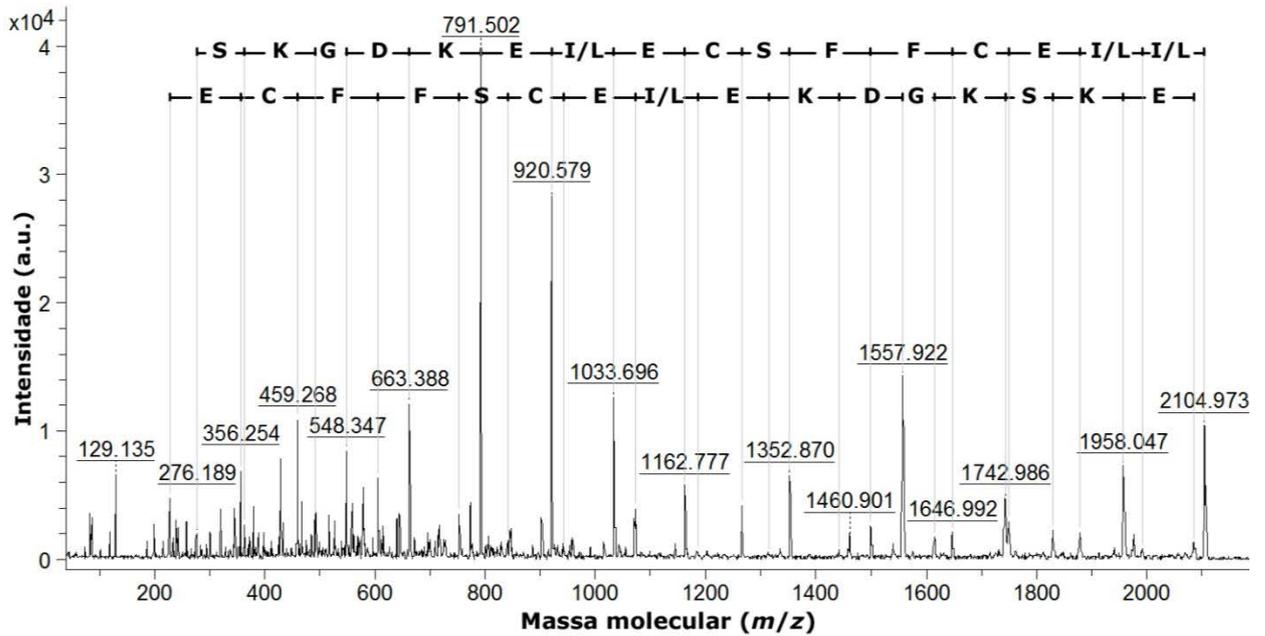


Figura 20. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 2.104,97 obtido após redução, alquilação e digestão parcial por Glu-C do peptídeo Ap1a. Estão representadas as séries Y (superior) e B (inferior).

O espectro de fragmentação do segundo íon gerado pela digestão com Glu-C (m/z 3.548,48) também foi interpretado, contudo, foi possível obter apenas uma sequência parcial (Fig. 21).

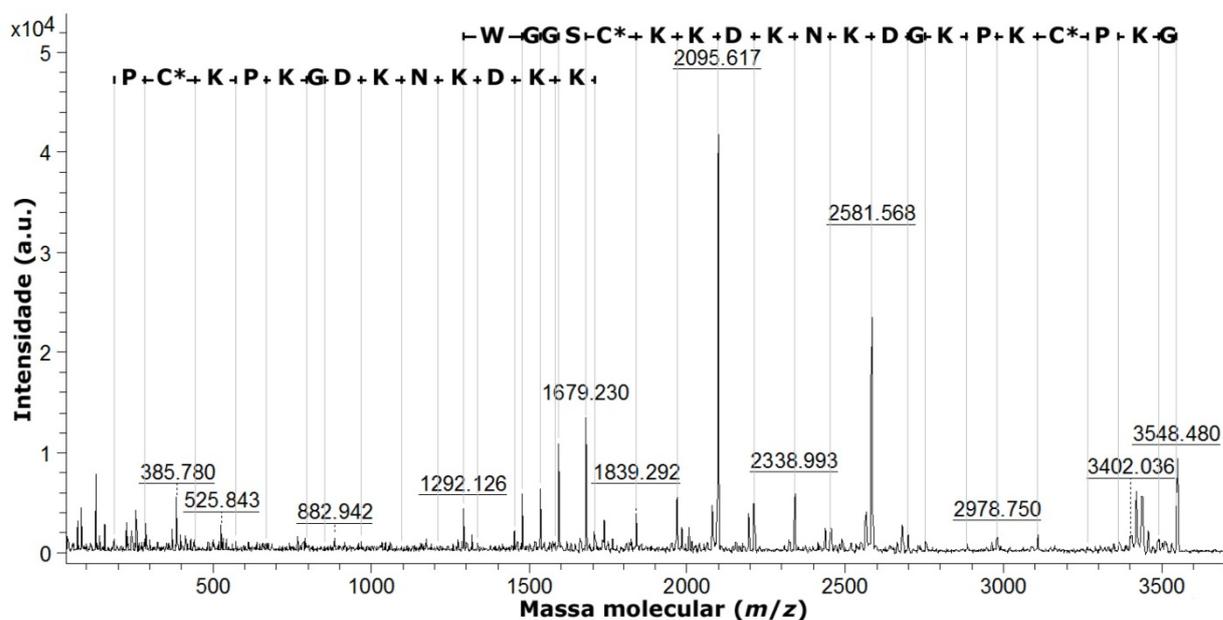


Figura 21. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 3.548,48 obtido após redução, alquilação e digestão parcial por Glu-C do peptídeo Ap1a. Estão representadas as séries Y (superior) e B (inferior). C* representa Cys alquilada.

A interpretação parcial do espectro de fragmentação do íon m/z 3.548,48 resultou na sequência **GKPCPKGDKNKDKKCSGGW**, a qual apresenta duas cisteínas (C_{III} e C_{IV}) alquiladas. Não foram gerados íons suficientes para interpretar o restante do espectro, faltando 1.273,12 Da tanto da série Y (sem considerar 19 Da que correspondem ao somatório da molécula de água mais o próton da ionização) quanto da série B para finalizar. No entanto, após a posterior obtenção da sequência peptídica completa, por meio da sequência precursora, observou-se que o valor referente à soma dos resíduos de aminoácido que compõem o fragmento C-terminal restante (**RCKIKMCLKI**) é igual a 1.216,71, o qual somado a 57 Da, correspondentes à alquilação de um resíduo de cisteína, resultam em 1.273,71, que corresponderia ao setor do espectro de fragmentação não interpretado. Dessa maneira, apenas uma cisteína localizada nesse último fragmento N-terminal estaria alquilada, o que pode ser suportado por mais duas observações:

- (1) O peptídeo Ap1a intacto possui massa molecular experimental $[M+H^+] = 5.457,79$, a qual, subtraída a massa desprotonada do primeiro íon (m/z 2.103,97), é igual a 3.353,82. Quando adicionados 18 Da provenientes do acréscimo da molécula de água da quebra da ligação peptídica, totaliza-se $[M+H^+] = 3.371,82$. Considerando a presença de seis resíduos de cisteína – posteriormente confirmados pela sequência

do precursor de Ap1a e por outros sequenciamentos *de novo* – e que a molécula reduzida possui seis prótons a mais, teríamos $[M+H^+] = 3.377,82$. Subtraindo-se a massa do segundo íon gerado a partir da digestão (m/z 3.548,48) pela massa do peptídeo teórico resultante da perda do primeiro fragmento e com as cisteínas reduzidas ($[M+H^+] = 3.377,82$), obtém-se 170,7 Da, os quais, divididos por 57 Da referentes a cada alquilação, resultam em 3 cisteínas alquiladas. Assim, como foi proposto, um dos quatro resíduos de cisteína do segundo íon estaria apenas reduzido, mas não alquilado.

- (2) Posteriormente, ao se obter a sequência completa do peptídeo Ap1a, observou-se que a massa molecular teórica da porção C-terminal (**GKPCKPKGDKNKDKKCSGGWRCKIKMCLKI**) é igual a $[M+H^+] = 3.377,79$, considerando suas quatro cisteínas reduzidas, e $[M+H^+] = 3.605,88$ considerando-as alquiladas. Uma cisteína não alquilada resultaria em $[M+H^+] = 3.548,88$, valor muito próximo ao da massa molecular experimental do segundo íon obtido pela digestão com Glu-C, indicando que este representa o fragmento C-terminal contendo três cisteínas alquiladas e uma apenas reduzida.

A sequência peptídica completa foi posteriormente deduzida por meio de análises transcriptômicas (Fig. 19), realizadas após a construção de uma biblioteca de cDNA obtida a partir da glândula de peçonha da aranha *A. paulensis*, o que possibilitou a clonagem e o sequenciamento do cDNA correspondente ao RNAm que codifica a Ap1a. Por meio dessa técnica, obteve-se o precursor da Ap1a, representado na alíquota da biblioteca de cDNA analisada por um *contig* de 6 sequências nucleotídicas (*contig* 1), cuja sequência consenso apresentou 297 nucleotídeos (Fig. 22). Por meio das análises de bioinformática e comparação com outras sequências similares depositadas em bancos de dados, foi possível identificar na sequência putativa do Ap1a um peptídeo sinal contendo 23 resíduos de aminoácidos, um pró-peptídeo contendo 27 resíduos e um peptídeo maduro contendo 48 resíduos, cuja massa molecular teórica ($[M+H^+] = 5.457,77$) equivale à massa molecular experimental ($[M+H^+] = 5.457,79$) do peptídeo Ap1a.

1	ATGCCATCTTTGACGTTGGCTGCCGTACTGGCATGCAGCCTGCTGCTAGTTTTTCACACT	60
1	<i>M P S L T L A A V L A C S L L L V F H T</i>	20
61	TCAGCAGCTGAAGAGCTTGAAGTTCAGGATGGGCATCTGATGAACCCCGGTGATGGTGAC	120
21	<i>S A A E E L E V Q D G H L M N P G D G D</i>	40
121	ACCGCACTAGCAACTGTCGATGATGAAAGAATTATCGAATGTTTTTTTTTCATGCGAAATT	180
41	<u>T A L A T V D D E R I I E C F F S C E I</u>	60
181	GAAAAAGATGGCAAATCAAAAGAGGGCAAACCATGCAAACCCAAGGGAGACAAAAACAAG	240
61	E K D G K S K E G K P C K P K G D K N K	80
241	GATAAGAAATGTTCTGGTGGTTGGAGATGTAAGATCAAGATGTGTCTGAAGATTTAAtac	297
81	D K K C S G G W R C K I K M C L K I stop	98
	ttccatcactacgagaaaactcaccataacatgcacaggaagagctatttcttggtgacgc	
	tgtagcaaataatattaacatgtagctagcaatgtagttgattgaattctattatggttctaa	
	aaaatcgtt <u>AATAAA</u> atagttccaaccttgc-poliA-3'	

Figura 22. Sequência de nucleotídeos e predição da sequência de aminoácidos de Ap1a. O peptídeo sinal está marcado em azul e em itálico, o pró-peptídeo está sublinhado e o peptídeo maduro está em negrito. A provável sequência do sinal de poliadenilação está em duplo sublinhado.

Pelo menos sete sequências putativas disponíveis em bancos de dados foram apresentadas com 52 a 73% de identidade com a sequência putativa de Ap1a (Fig. 23), sendo as U1-TRTX-Lsp1b (LTx2), U1-TRTX-Lsp1a (LTx1) e U1-TRTX-Lsp1c (LTx3), da aranha caranguejeira *Lasiodora* sp., as que apresentaram maior porcentagem de identidade: 73, 71 e 67%, respectivamente. A U3-TRTX-Cj1b (JZTX-47), da aranha *Chilobrachys jingzhao*, apresentou a menor porcentagem (52%), enquanto as demais sequências putativas de Huwentoxinas tiveram 60% de identidade com o precursor de Ap1a.

	10 20 30 40 50
Ap1a	MPSLTLAAVL ACSLLLVFHT SAAEELEVQD GHLMNPGDGD TALATVDDER
U1-TRTX-Lsp1b	MPSLTLAALL LCSLLLVFHT SAAEELQAQE GHLMI PGDTD TALETVDDER
U1-TRTX-Lsp1a	MPSLTLAALL LCSLLLVFHT SAAAELEAQE GHLMI PGDTD TALETVDDER
U1-TRTX-Lsp1c	MRKITIRALL LCSLLLVFHT SAAAELEAQE GHLMI PGDTD TALETVDDER
U3-TRTX-Cj1b	MRTFTLIAIL TCAAVLVFHV SAAEELEA-- QDVIQPEDIF TGVATLEEDR
HWTX-II	-MKVTLIAIL TCAAVLVLHT TAAEELEA-E SQLMEVGMPD TELAADVDEER
HWTX-VII	-MKVTLIAIL TCAAVLVLHT TAAEELE--E SQLMEVGMPD TELAADVDEER
HWTX-VIII	-MKVTLIAIL TCAAVLVLHT TAAEELE--E SQLMEVGMPD TELAADVDEER
	..*:*:* * : : : : * . : ** ** : . : : * : : : : : *

	60 70 80 90
Ap1a	IIECFFSCEI EKDGKSKEGK PCKPKGDKNK D-KKCSGGWR CKIKMCLKI
U1-TRTX-Lsp1b	LFECTFECDI KKEGKPCPKK GCKCDDKDNK DHKKCSGGWR CKLKLCLKI
U1-TRTX-Lsp1a	FFECTFECDI KKEGKPCPKK GCKCDDKDNK DHKKCSGGWR CKLKLCLKF
U1-TRTX-Lsp1c	FFECTFECDI KKEGKPCPKK GCKCDDKDNK DHKKCSGGWR CKLKLCLKF
U3-TRTX-Cj1b	IFECFSFCDI KKNGK----- PCKGAGE---- --KKCSGGWR CKMNFVKF
HWTX-II	LFECFSFCEI EKEGD----K PCKK----- --KKCKGGWK CKFNMCKV
HWTX-VII	LFECFSFCEI EKEGD----K PCKK----- --KKCKGGWK CKFNMCKV
HWTX-VIII	LFECFSFCEI EKEGD----K PCKK----- --KKCKGGWK CKFNMCKV
	: : ** * . * : * : : * . ** *** . *** : * : : : * .

Figura 23. Alinhamento da sequência putativa do peptídeo Ap1a com sequências putativas que codificam toxinas de outras aranhas da família Theraphosidae. U1-TRTX-Lsp1b (LTx2), U1-TRTX-Lsp1a (LTx1) e U1-TRTX-Lsp1c (LTx3) de *Lasiodora* sp.; U3-TRTX-Cj1b (JZTX-47) de *Chilobrachys jingzhao*; e HWTX-II, HWTX-VII e HWTX-VIII de *Haplopelma schmidtii*. Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) ou semi-conservativas. O peptídeo sinal encontra-se em azul, seguido pelo pró-peptídeo. O peptídeo maduro está em negrito, com destaque para os resíduos Cys.

Considerando-se apenas o peptídeo maduro da Ap1a, novas similaridades foram encontradas com toxinas pertencentes à família da HWTX-II (U1-TRTX-Hh1a) (Fig. 24), sendo todas elas isoladas da peçonha de aranhas caranguejeiras. As toxinas U1-TRTX-Lp1a e U1-TRTX-Lp1b, da peçonha de *Lasiodora* sp., foram as que apresentaram menor porcentagem de identidade (60%) com a Ap1a. A HWTX-II, membro protótipo dessa família de peptídeos, também apresentou uma porcentagem moderada de identidade (67%). As maiores porcentagens de identidade foram com as toxinas U1-TRTX-Bs1a (84%), U1-TRTX-Asp1b (84%), U1-TRTX-Asp1a (82%), U1-TRTX-Ba1a (82%) e U1-TRTX-Ba1b (82%).

									aa	% Id
U1-TRTX-Bs1a	IFECVFSCDI	EK-----EGK	-PCKPKG---	-----EKK	CSGGWKCKIK	LCLKI	39	84		
U1-TRTX-Asp1b	IFECVFSCDI	EK-----EGK	-PCKPKG---	-----EKK	CSGGWKCKIK	LCLKI	39	84		
U1-TRTX-Asp1a	IFECVFSCDI	EK-----EGK	-PCKPKG---	-----EKK	CTGGWKCKIK	LCLKI	39	82		
U1-TRTX-Lp1a	FFECTFECDI	KK-----EGK	-PCKPKGCKC	KDKDNKDHHK	CSGGWRCKLK	LCLKF	49	60		
U1-TRTX-Lp1b	FFECTLECDI	KK-----EGK	-PCKPKGCKC	NDKDNKDHHK	CSGGWRCKLK	LCLKF	49	60		
U1-TRTX-Ba1a	IIECVFSCDI	KK-----EGK	-PCKPKG---	-----EKK	CTGGWRCKIK	LCLKI	39	82		
U1-TRTX-Ba1b	IFECVFSCDI	KK-----EGK	-PCKPKG---	-----EKK	CTGGWRCKIK	LCLKI	39	82		
Ap1a	IIECFFSCEI	EKDGKSKEGK	-PCKPKG---	---DKNKDKK	CSGGWRCKIK	MCLKI	48	100		
HWTX-II	LFECFSFCEI	EK-----EGD	KPCKKK----	-----K	CKGGWKCKFN	MCVKV	37	67		
HWTX-VII	-FECFSFCEI	EK-----EGD	KPCKKK----	-----K	CKGGWKCKFN	MCVKV	36	69		
HWTX-VIII	-FECFISCEI	EK-----KGE	-SCKPK----	-----K	CKGGWKCKFN	MCVKV	35	62		
	:**	:.***	:*	:*	.***	*	***	***	:*	:*

Figura 24. Alinhamento da sequência peptídica de Ap1a com toxinas isoladas da peçonha de aranhas caranguejeiras. Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. (*) resíduos idênticos na mesma coluna, (:) substituições conservativas, (.) ou semi-conservativas. À direita, número de resíduos de aminoácidos (aa) e porcentagem de identidade (% Id). Em destaque, resíduos Cys.

6.2.3. Determinação das Pontes Dissulfeto

Depois de confirmada a presença de seis resíduos de cisteína na estrutura primária do peptídeo Ap1a, a determinação de suas ligações foi realizada a partir da digestão do peptídeo com pepsina e tripsina, e posterior análise dos íons por espectrometria de massa (MS e MS/MS).

Após digestão com pepsina e fracionamento por RP-HPLC, foram obtidas duas frações de maior abundância (Fig. 25-A), as quais foram posteriormente analisadas em micrOTOF-Q II. Na primeira fração (P1), foram detectados os íons m/z 783,115, sendo este o principal, de maior intensidade, e m/z 780,536, em menor intensidade na fração P1 (Fig. 25-B), mas o único na fração P2 (espectro não mostrado). Ambos os íons estavam presentes com sete cargas, apresentando, assim, valores de $[M+H]^+ = 5475,80$ e $5457,75$, respectivamente. Enquanto o segundo íon corresponde ao peptídeo Ap1a em sua forma intacta, o primeiro íon possui uma diferença de 18,0 Da em relação ao segundo, o que se propõe ser resultante do acréscimo de uma molécula de água da ligação peptídica desfeita após digestão com pepsina. Portanto, com a digestão, não houve perda de nenhum resíduo de aminoácido ou fragmento peptídico, apenas a abertura da molécula em algum sítio de clivagem, sem que houvesse a separação dos fragmentos devido à ligação das cisteínas. Visto isto, era esperado que essa clivagem tivesse ocorrido na região N-terminal do peptídeo, formando os fragmentos **IIEC**, **IIECF** ou **IIECFE**, de acordo com a clivagem

preferencial da pepsina nos resíduos de fenilalanina (ver Tabela 4), e não na região C-terminal, gerando o proposto fragmento **KI**, pois este seria despreendido da molécula devido à ausência de resíduos de cisteína.

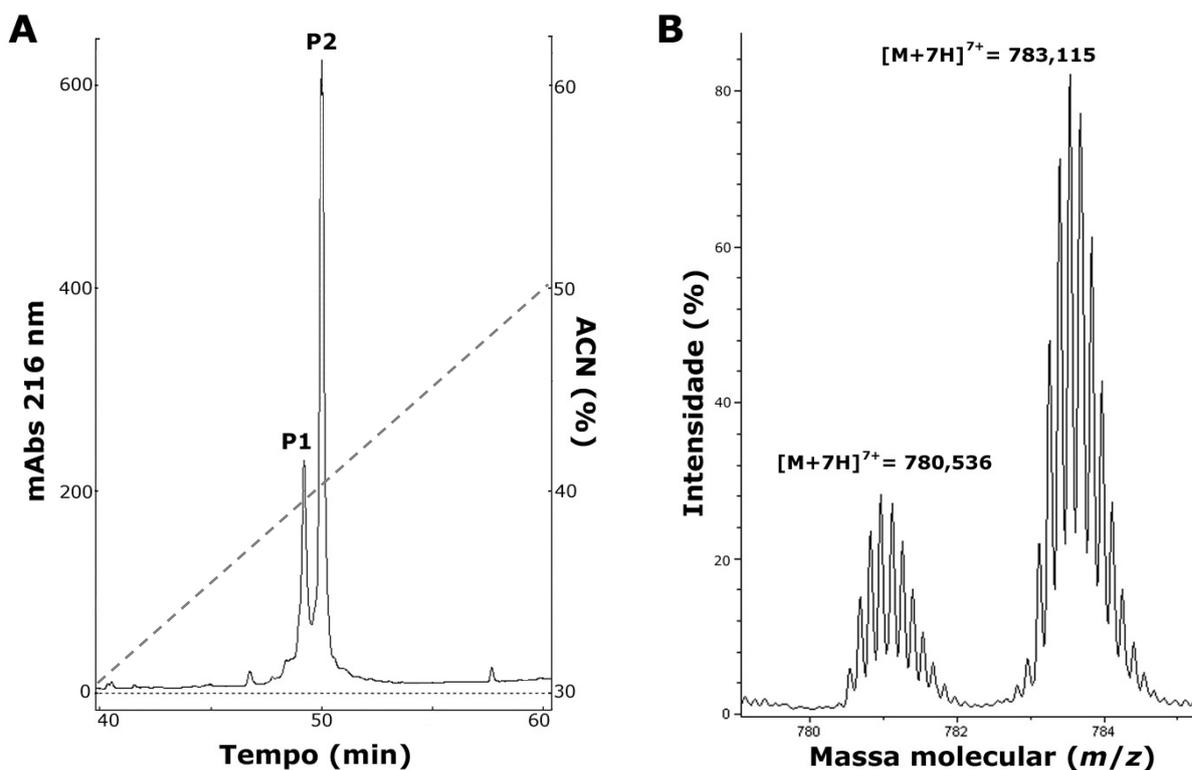


Figura 25. Cromatografia por RP-HPLC da fração Ap1a digerida com pepsina (A) e análise de massa da fração P1 em micrOTOF-Q II (B). Para fracionamento em RP-HPLC, utilizou-se uma coluna analítica Phenomenex C18, com o mesmo método adotado para purificação da peçonha bruta.

A presença da fração P2 em maior abundância que a P1 (Fig. 25-A) demonstra que o tempo de digestão com pepsina não foi suficiente para digerir todo o peptídeo da amostra, podendo-se aumentar o tempo de digestão, que, no caso, foi de 90 min. Todavia, a fração P1, na qual foi detectado o composto digerido, foi escolhida para posterior digestão com tripsina. Após digestão e cromatografia em UFLC (dado não mostrado), os digestos trípticos foram analisados quanto a sua massa molecular em micrOTOF-Q II e MALDI-TOF/TOF MS, sendo que no último foi também realizada a fragmentação em modo LIFT para obtenção das seqüências de resíduos de aminoácidos de cada íon (Tabela 6).

Tabela 6. Determinação das pontes dissulfeto do peptídeo Ap1a. Sequência de aminoácidos e massa molecular (MM) dos íons gerados após digestão com pepsina e tripsina, e após redução. Os íons gerados após redução estão indicados pelo número da cisteína (C_I a C_{VI}) presente em sua sequência. (–) MM não detectada.

Sequência *	MM (<i>m/z</i>)		MM após redução (<i>m/z</i>)		Ponte dissulfeto
	Teórica	Experimental **	Teórica	Experimental *	
IIECF CSGGWR	1.286,56	1.286,57	C _I : 624,30 C _{IV} : 665,28	C _I : 624,29 C _{IV} : 665,27	C _I -C _{IV}
FSCEIEK CK	1.102,49	1.102,49	C _{II} : 855,39 C _V : 250,12	C _{II} : 855,37 C _V : –	C _{II} -C _V
EGKPCKPK MCLK	1.377,70	1.377,70	C _{III} : 886,48 C _{VI} : 494,25	C _{III} : – C _{VI} : –	C _{III} -C _{VI}

* Análises realizadas em MALDI-TOF/TOF MS.

** Dados obtidos em micrOTOF-Q II.

A interpretação do espectro gerado pela fragmentação do íon *m/z* 1.286,57 (1.286,57 em micrOTOF-Q II, ou 1.286,52 em MALDI-TOF/TOF MS) permitiu a obtenção das sequências **IIECF/CSGGWR** (Fig. 26), referentes à ligação C_I-C_{IV}. O fragmento contendo o íon com as cisteínas ligadas, formando uma ponte dissulfeto, foi também verificado (**CCSGGW**).

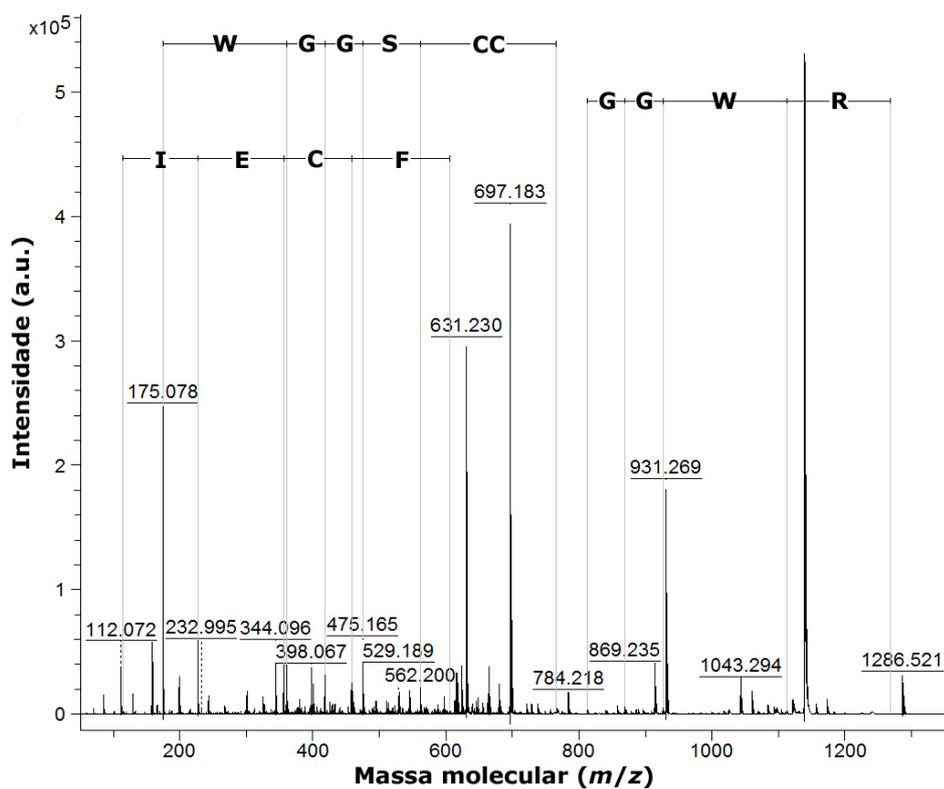


Figura 26. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 1.286,52, referente à ligação C_I - C_{IV} , obtido após digestão com pepsina e tripsina. Estão representadas a série Y da ligação de cisteínas (WGGSCC) e as séries B dos íons C_I (IIECF) e C_{IV} (GGWR).

Após redução com DTT desse fragmento, foram detectados os dois íons responsáveis pela ligação C_I - C_{IV} : m/z 624,29 e 665,27, respectivamente (Tabela 6). Ambos foram fragmentados em MALDI-TOF/TOF MS (Fig. 27 e 28), confirmando as sequências **IIECF** (C_I) e **CSGGWR** (C_{IV}).

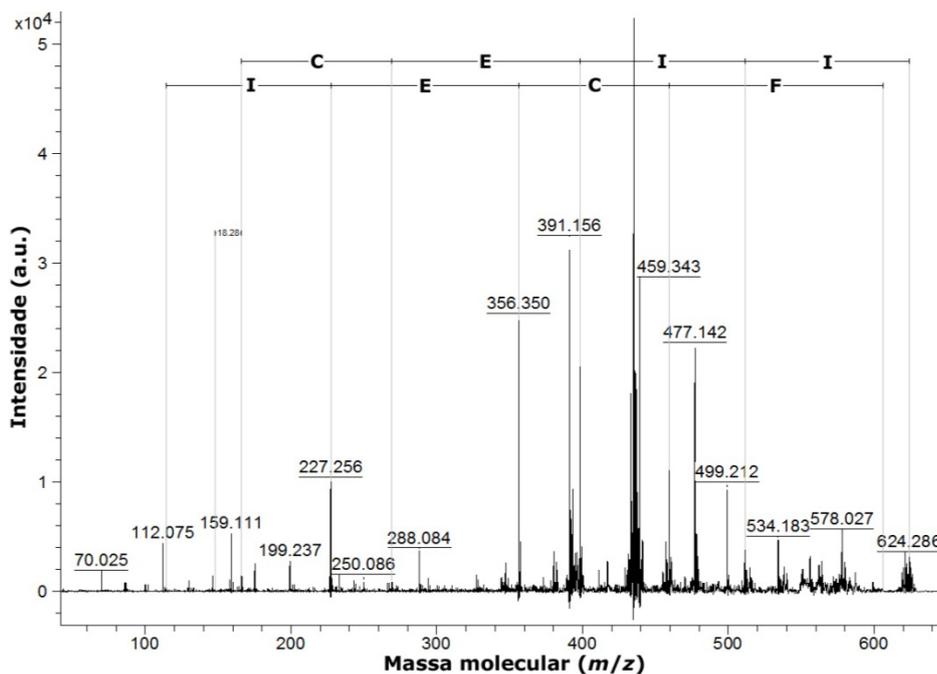


Figura 27. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 624,29, o qual contém a cisteína C_I, obtido após redução do fragmento $[M+H]^+ = 1.286,52$. Estão representadas as séries Y (superior) e B (inferior).

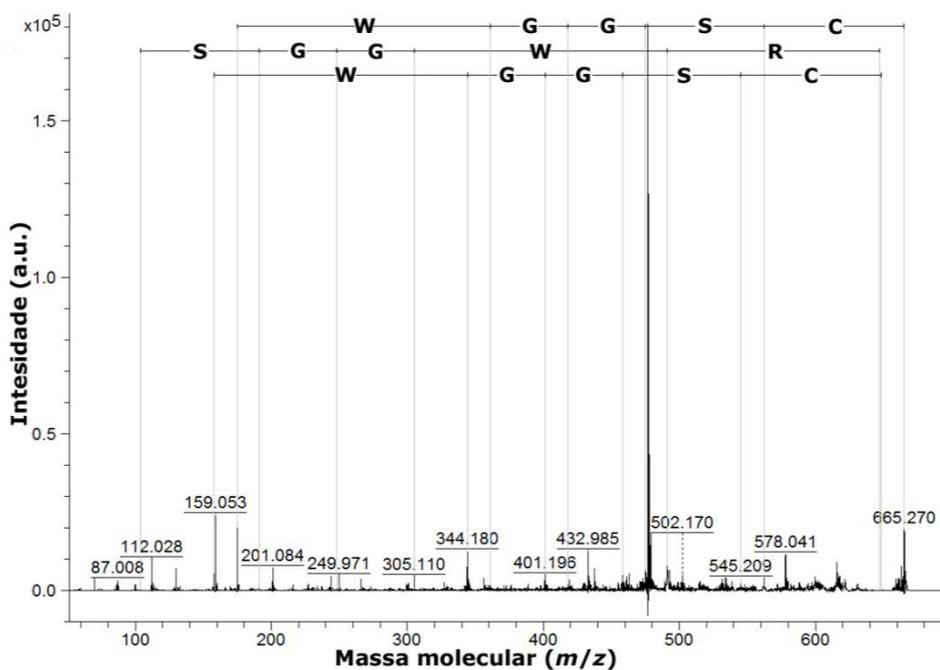


Figura 28. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 665,27, o qual contém a cisteína C_{IV}, obtido após redução do fragmento $[M+H]^+ = 1.286,52$. Estão representadas as séries Y (superior), B (intermediária) e Z (inferior).

Um segundo íon, de m/z 1.102,49, foi também identificado em uma das frações cromatográficas após digestão com tripsina. Sua massa molecular experimental foi igual à massa molecular teórica do fragmento contendo a ligação $C_{II}-C_V$ (Tabela 6), o que foi verificado pelo sequenciamento após fragmentação desse íon em MALDI-TOF/TOF MS/MS (Fig. 29). A sequência **FSCEIEK**, contendo o resíduo C_{II} , foi verificada em série Y. Verificou-se também a sequência referente à ligação das cisteínas $C_{II}-C_V$ pela formação do íon **FSCCK**, restando o íon **EIEK**, que juntos resultam na sequência completa do fragmento $[M+H^+] = 1.102,49$ (**FSCEIEK/CK**). A diferença de 247,04 Da refere-se à diferença de massa do fragmento **CK**, equivalente à soma do resíduo Cys (102,15) com o resíduo Lys (128,17) acrescidos de 18 Da (ganho de uma molécula de água ao serem desfeitas as ligações peptídicas para geração do fragmento **CK**) e subtraído 1 Da referente ao ganho do H^+ da cisteína presente no fragmento sequenciado (**KEIECSF**) (102,15 + 128,17 + 18 – 1 = 247,32).

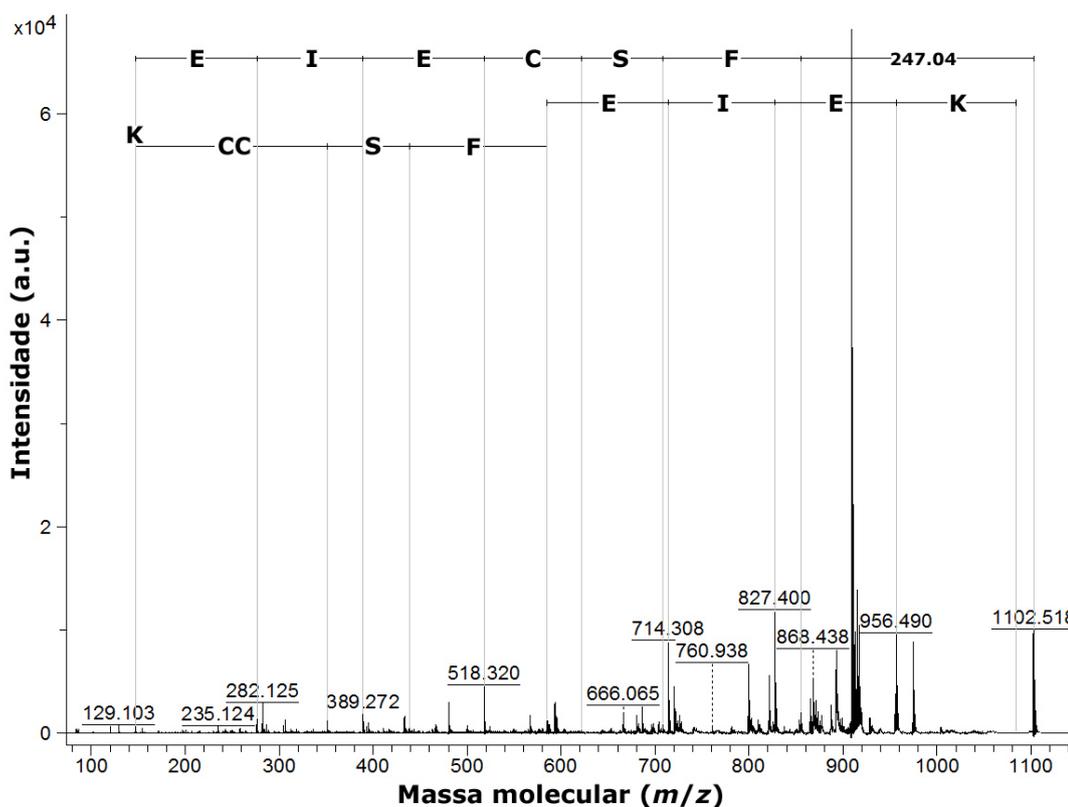


Figura 29. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 1.102,52, referente à ligação $C_{II}-C_V$, obtido após digestão com pepsina e tripsina. Estão representadas a série Y do íon C_{II} (EIECSF) e da ligação de cisteínas (KCCSF) e a série B do íon C_{II} (EIEK). A diferença de 247,04 Da refere-se ao fragmento CK.

Após redução do fragmento $[M+H^+] = 1.102,49$, foi detectado o íon m/z 855,37, o qual contém o resíduo C_{II} (Tabela 6), sendo sua sequência **FSCEIEK** confirmada após fragmentação em MALDI-TOF/TOF MS/MS (Fig. 30).

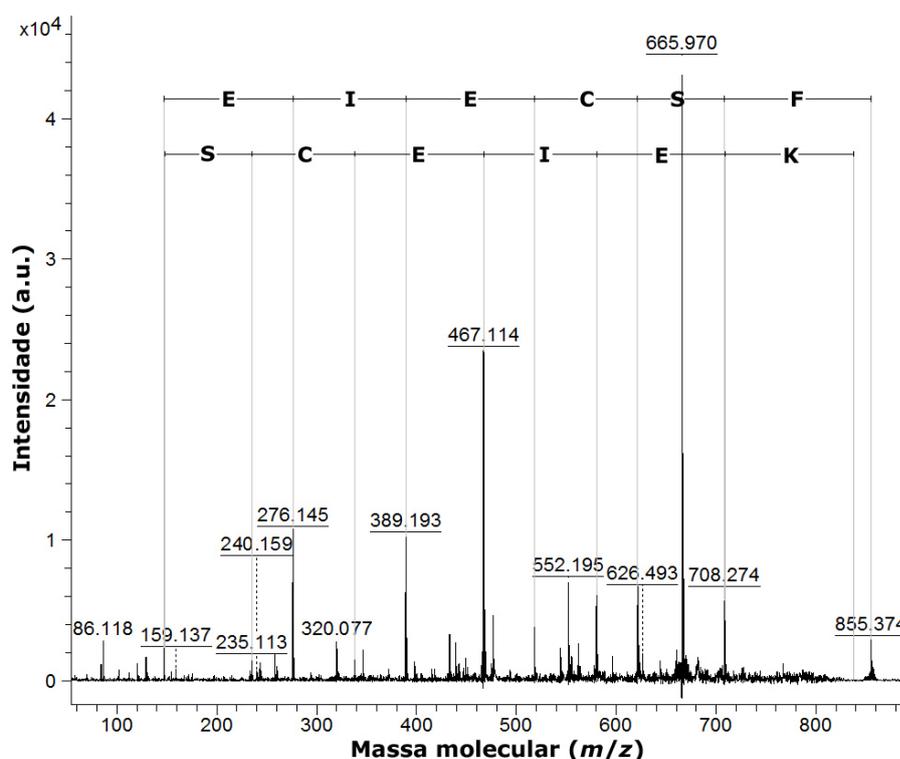


Figura 30. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 855,37, o qual contém a cisteína C_{II} , obtido após redução do fragmento $[M+H^+] = 1.102,49$. Estão representadas as séries Y (superior) e B (inferior).

O terceiro íon obtido após digestão com pepsina e tripsina do peptídeo Ap1a foi o de m/z 1.377,70, o qual contém a ligação $C_{III}-C_{VI}$ (Tabela 6), sendo sua sequência **EGKPKPK/MCLK** confirmada em MALDI-TOF/TOF MS/MS (Fig. 31-A). Visto que muitos íons foram obtidos a partir da fragmentação desse íon precursor, para facilitar a visualização, diagramas com as principais séries obtidas são apresentados (Fig. 31-B).

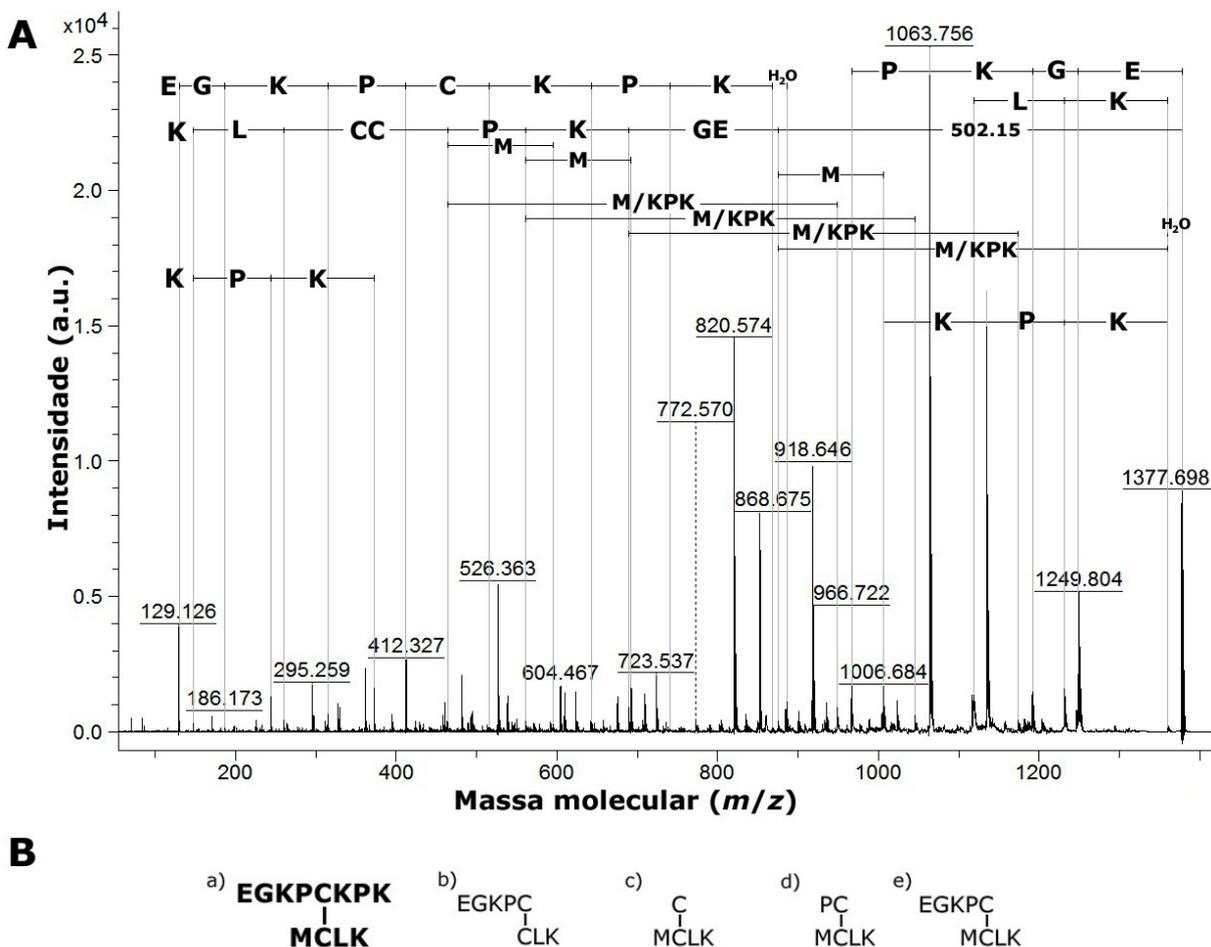


Figura 31. Sequenciamento MS/MS do íon m/z 1.377,70, referente à ligação C_{III}-C_{VI}, obtido após digestão com pepsina e tripsina. (A) Sequências obtidas a partir da fragmentação do íon precursor m/z 1.377,70. (B) Diagramas das principais séries obtidas pelo sequenciamento MS/MS: a) exemplo da ligação C_{III}-C_{VI} com todos os resíduos do íon precursor; b-e) séries identificadas no espectro de fragmentação.

Na parte superior do espectro, está demonstrada a série B contendo C_{III} (**EGKPCPKK**) e, logo abaixo, a série Y da ligação contendo as cisteínas (**KLCCPKGE**) (Fig. 31-Bb). A diferença de 502,15 Da corresponde à soma das massas moleculares dos resíduos não contidos nesse íon fragmento (**M/KPK**) mais 18 Da da molécula de água devido à quebra da ligação peptídica.

Os íons correspondentes ao fragmento **KLCC/M** também foram detectados (Fig. 31-Bc) em série Y, contendo a ligação de cisteínas (na Fig. 31-A está mostrado como o resíduo **M** logo abaixo da série **KLCC**, à esquerda). Os íons correspondentes aos resíduos **EGKP** complementares a essa fragmentação foram sequenciados em sua série Y (Fig. 31-A, direita superior). Outros íons gerados pela fragmentação formaram a série **KLCCP/M** (Fig. 31-Bd),

estando a metionina quimicamente ligada à cisteína C_{VI} (na Fig. 31-A, esse resíduo **M** encontra-se à direita inferior da série Y **KLCCP**). Outro plano de fragmentação gerou ainda íons da série **KLCCPKGE/M** (Fig. 31-Be; na Fig. 31-A esse resíduo **M** está à direita inferior da série Y **KLCCPKGE**).

Os resíduos de aminoácidos restantes para completar a sequência do íon precursor de todas essas séries (**KPK**, **M/KPK**, **LK**) também foram detectados e estão demonstrados na Figura 31-A.

Depois de determinadas as três pontes dissulfeto do peptídeo Ap1a, é possível resumir os resultados com o seguinte esquema (Figura 32), que mostra os fragmentos gerados pela digestão com pepsina e tripsina e a ligação das cisteínas para formação das pontes dissulfeto. O padrão de ligação dissulfeto para o peptídeo Ap1a é dado por C_I - C_{IV} , C_{II} - C_V , C_{III} - C_{VI} .



Figura 32. Ligação das cisteínas do peptídeo Ap1a. Os resíduos de cisteínas estão designados por números romanos. Em vermelho, fragmento obtido após digestão do peptídeo intacto com pepsina. Em azul e verde, fragmentos obtidos após digestão com tripsina.

6.2.4. Predição da Estrutura Secundária da Ap1a

A estrutura secundária predita para a Ap1a por meio da ferramenta disponível em PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) é mostrada na Figura 33. É possível observar a presença de duas folhas- β , localizadas nas regiões 2-11 e 39-47.

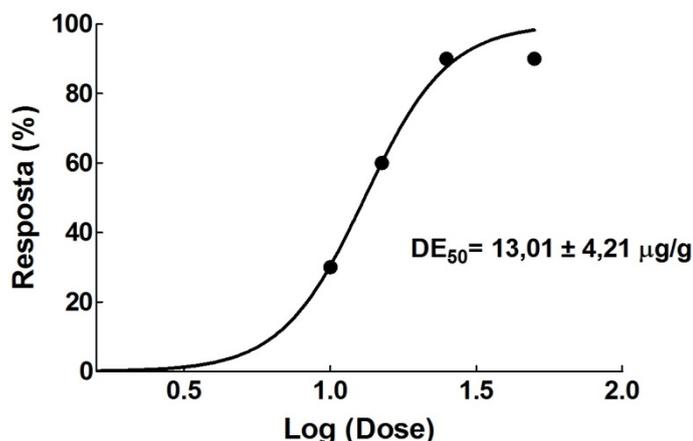


Figura 34. Curva dose-resposta obtida a partir de injeções i.p. do peptídeo Ap1a de *A. paulensis* em lagartas *Spodoptera frugiperda*. $R^2 = 0,9878$.

Para todas as doses, a maior porcentagem de paralisia foi observada 8 h após a administração do peptídeo, sendo este o ponto escolhido para a determinação da DE_{50} . Após esse tempo, o efeito foi reversível na maioria das lagartas; porém, 20 a 30% delas em cada dose permaneceram paralisadas até o final do experimento (48 h), sendo essa paralisia parcial nas duas menores doses (10 e 15 $\mu\text{g/g}$) e total nas duas maiores (25 e 50 $\mu\text{g/g}$). Na maior dose testada, o efeito paralítico teve início cerca de 15 minutos após a injeção, sendo esse tempo estendido a horas nas duas doses menores. O efeito paralítico na maior dose foi visualmente mais acentuado, todavia, a porcentagem máxima de efeito dessa dose igualou-se à da dose de 25 $\mu\text{g/g}$, ambas causando 90% de paralisia nas lagartas testadas. Doses maiores não foram utilizadas devido à quantidade limitada do peptídeo puro, mas, visto que a Ap1a apresentou efeito dependente da dose e que na maior dose a paralisia foi mais duradoura, pressupõe-se que doses maiores sejam letais às lagartas.

6.2.5.2. Circuito da Fibra Gigante de *Drosophila melanogaster*

Para testar a susceptibilidade do circuito da Fibra Gigante (GF) de *Drosophila melanogaster* ao peptídeo Ap1a, 46 nL de quatro diferentes concentrações (5, 25, 50 e 100 μM – ou 0,23, 1,15, 2,30 e 4,60 pmol/mosca, respectivamente) foram injetadas nas moscas ($n = 8 \pm 2$), que tiveram suas respostas dos músculos DLM e TTM registradas e comparadas com as das moscas injetadas com o mesmo volume de solução salina 0,7% ($n = 10$).

A latência das respostas, considerada como o tempo entre o estímulo cerebral e a despolarização do músculo, esteve de acordo com o esperado para uma mosca tipo “selvagem”: entre 1,3 e 1,7 ms para a via GF-DLM e entre 0,7 e 1,2 ms para a via GF-TTM (Fig. 35-A), indicando uma preparação sadia e técnicas de registro adequadas (Augustin et al., 2011). A “frequência de continuidade” após os 10 trens de 10 pulsos a 100 Hz antes da injeção das doses ou salina também foi verificada (Fig. 35-B), estando as respostas das vias GF-DLM e GF-TTM em proporção 1:1. Essa verificação é fundamental, visto que apenas moscas com frequência de resposta próxima a 100% são selecionadas para dar continuidade ao experimento.

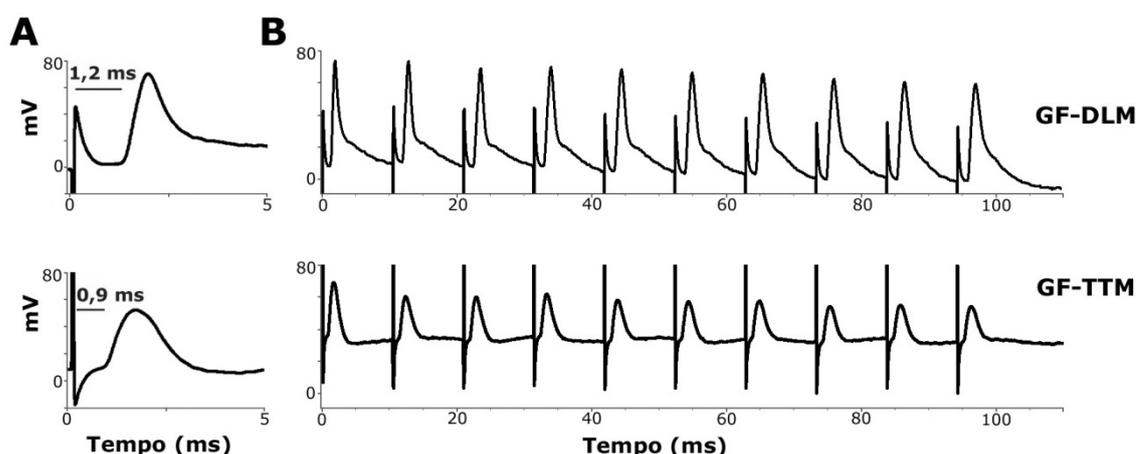


Figura 35. Traços eletrofisiológicos representativos dos registros das vias GF-DLM (superior) e GF-TTM (inferior) após estímulo cerebral em uma mosca tipo “selvagem”. (A) Latência das respostas das vias GF-DLM e GF-TTM, que nesse registro foram de 1,2 e 0,9 ms, respectivamente. (B) “Frequência de continuidade” após trem de 10 pulsos a 100 Hz antes da injeção das doses ou salina.

Durante a injeção das doses, no período de monitoramento com 100 pulsos de 1 Hz, observou-se uma redução na amplitude das respostas de ambas as vias em relação ao grupo controle (Fig. 36).

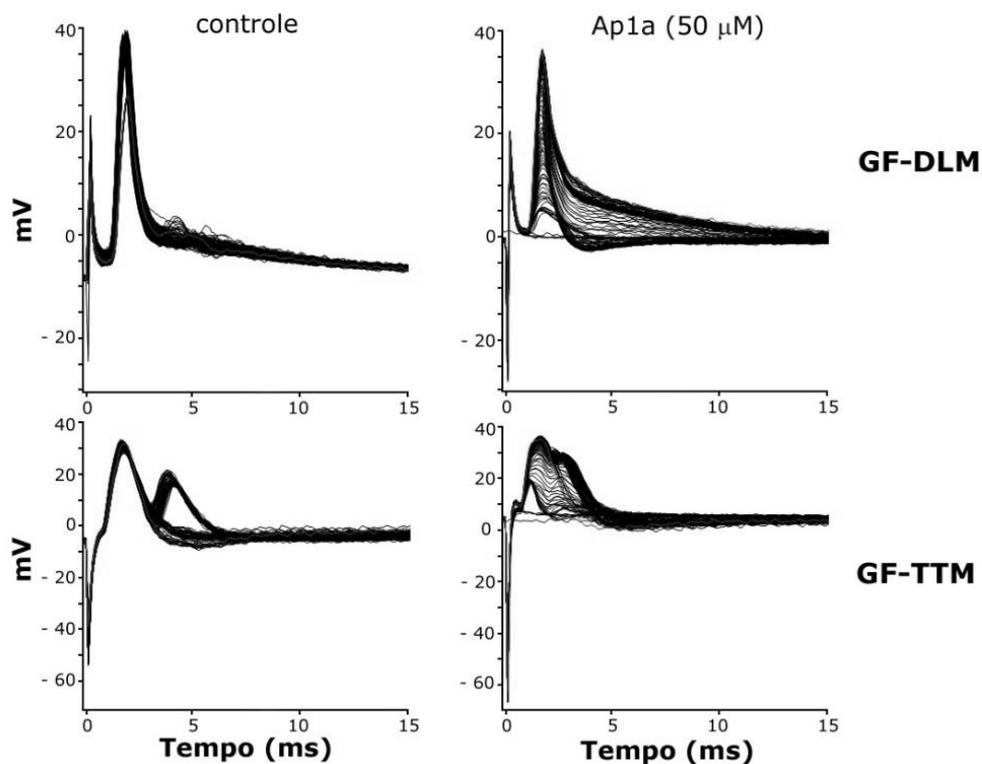


Figura 36. Resposta das vias GF-DLM (superior) e GF-TTM (inferior) durante a injeção dos compostos. Estímulo gerado com 100 pulsos de 1 Hz, com duração de 1 min. Os registros foram obtidos durante a injeção de salina (grupo controle, esquerda) e do peptídeo Ap1a (direita).

Essa redução na amplitude das respostas foi também observada em ambas as vias, GF-DLM e GF-TTM, durante os 10 trens de 10 estímulos a 100 Hz (com 1 s entre cada trem), imediatamente após a injeção das doses (1 min), 5, 10 e 15 min depois (Fig. 37). Apesar de também haver uma redução na amplitude das respostas dentro do grupo controle ao longo do tempo, a redução na amplitude foi significativa em todas as doses das vias GF-DLM e GF-TTM em relação ao tempo equivalente no grupo controle. Apenas a menor dose, de 5 μM, não apresentou uma resposta significativa na via GF-TTM entre os períodos anterior e imediatamente posterior (1 min) à injeção. No entanto, os tempos seguintes tiveram respostas significativas com $p < 0,001$ (Fig. 37-B).

A análise estatística, realizada pelo teste ANOVA de dois fatores, seguido pelo pós-teste Bonferroni, indicou diferença significativa entre doses, tempos e interação dose-tempo com $p < 0,001$ nos resultados em relação à amplitude das respostas das vias GF-DLM e GF-TTM.

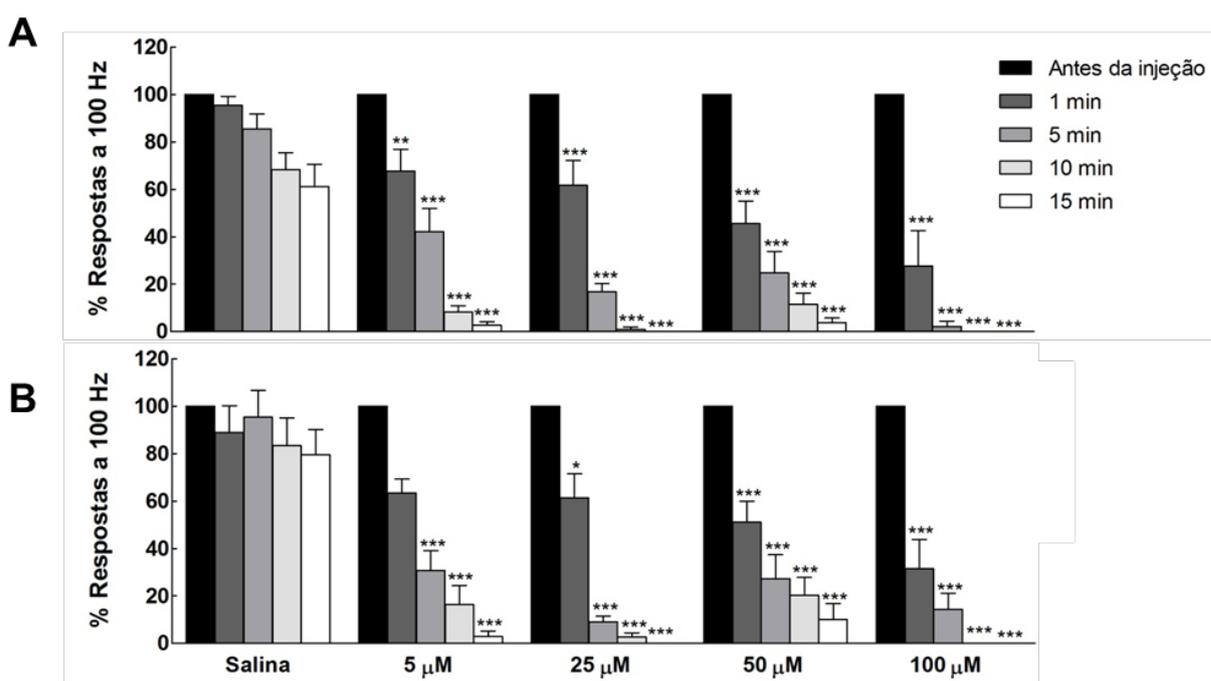


Figura 37. Efeitos da administração do peptídeo Ap1a na amplitude das respostas das vias GF-DLM (A) e GF-TTM (B) com doses crescentes de peptídeo. Os registros eletrofisiológicos (10 trens de 10 pulsos a 100 Hz) foram realizados antes da injeção de salina ou doses e 1, 5, 10 e 15 min após. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média utilizando ANOVA de dois fatores, seguido pelo pós-teste Bonferroni (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Diferenças significativas também foram vistas em relação à frequência das respostas de ambas as vias (Fig. 38). Enquanto no grupo controle a frequência das respostas se manteve constante ao longo do experimento, próxima aos 100%, reduções significativas foram observadas aos 10 e 15 min após a injeção de todas as doses na via GF-DLM (Fig. 38-A), com $p<0,001$, e também aos 5 min após a injeção das maiores doses, 50 e 100 μM , com $p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente. Na via GF-TTM (Fig. 38-B), houve redução significativa da frequência das respostas em todas as doses aos 5, 10 e 15 min após a injeção do peptídeo. A análise estatística com os resultados de frequência das respostas das vias GF-DLM e GF-TTM submetidas a doses crescentes do peptídeo também indicou diferença significativa entre doses, tempos e interação dose-tempo com $p<0,001$.

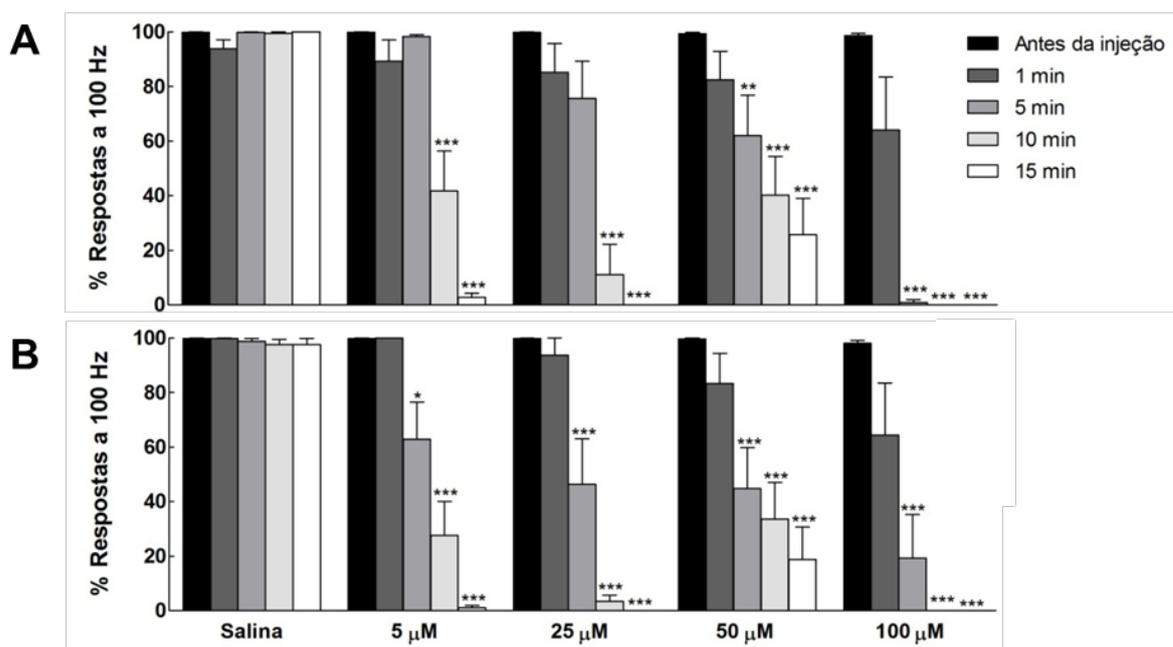


Figura 38. Efeitos da administração do peptídeo Ap1a na frequência das respostas das vias GF-DLM (A) e GF-TTM (B) com doses crescentes de peptídeo. Os registros eletrofisiológicos (10 trens de 10 pulsos a 100 Hz) foram realizados antes da injeção de salina ou doses e 1, 5, 10 e 15 min após. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média utilizando ANOVA de dois fatores, seguido pelo pós-teste Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Na dose de 100 μM , não houve mais resposta aos estímulos em ambas as vias após os 5 min da administração do peptídeo. Por outro lado, a dose de 5 μM teve um efeito mais brando, o que pode ser observado pela significância das respostas, tanto em relação à frequência quanto à amplitude. Em ambas as doses, estímulos torácicos – gerados após posicionamento dos eletrodos de estímulo na extremidade anterior do tórax, estimulando diretamente os neurônios motores – não tiveram resposta ao final dos 15 min.

Assim, nesse experimento mostrou-se o efeito dependente da dose do peptídeo Ap1a nas vias GF-DLM e GF-TTM do circuito da Fibra Gigante de *Drosophila melanogaster*, as quais foram afetadas quanto à frequência e à amplitude de suas respostas aos estímulos cerebrais.

6.2.5.3. Receptor de Acetilcolina tipo Nicotínico (nAChR)

O peptídeo Ap1a na concentração de 1 μM não bloqueou nem modulou a cinética de receptores nicotínicos na preparação com células de rabdiossarcoma (Fig. 39), não

alterando a resposta induzida por ACh. Como esperado, a α -bungarotoxina (0,1 μ M) inibiu as correntes mediadas pelos receptores nicotínicos.

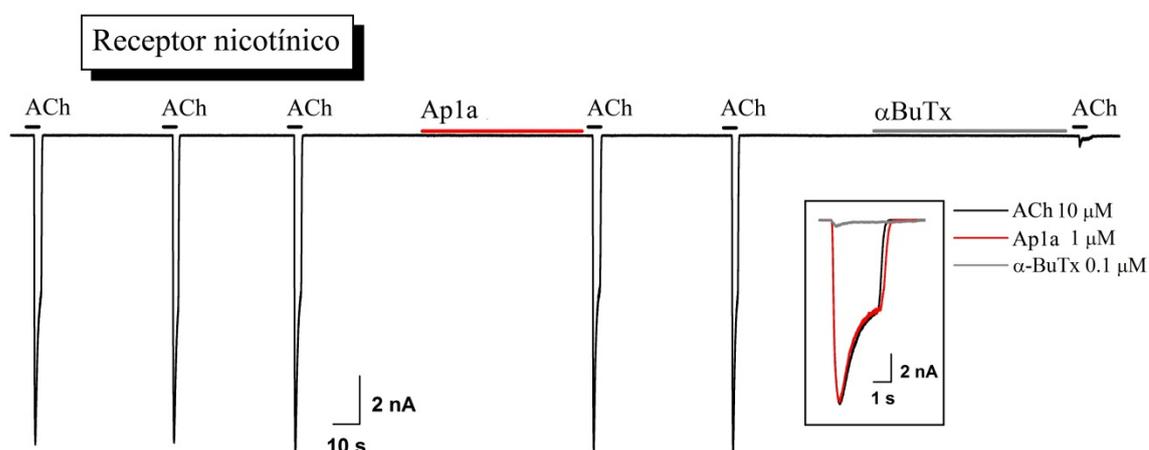


Figura 39. Registro “whole-cell” em modo contínuo da corrente gerada pela ativação dos receptores nicotínicos expressos em células de rabdiossarcoma da linhagem TE671. Foram realizadas três aplicações consecutivas de acetilcolina (ACh, 10 μ M) para controle. As aplicações das toxinas Ap1a (1 μ M) e α -BuTx (0,1 μ M) foram seguidas pela aplicação de ACh, nas mesmas condições anteriores. O detalhe à direita apresenta a sobreposição do registro de ACh (controle, Ap1a e α -BuTx).

6.2.5.4. Toxicidade em Camundongos

Durante o ensaio de toxicidade do peptídeo Ap1a (30 μ g/animal) em camundongos, foram observados aumento de micção, mioclonia, hipermotilidade com movimentos circulares e saltos (com início aos 10 min após inoculação do peptídeo), e crises generalizadas (com início aos 12 min). Entre as crises tônicas, que se repetiram continuamente até o final do experimento, caracterizando o *status epilepticus*, observou-se também hiperextensão da cauda. Os animais morreram entre 25 e 35 min por parada respiratória devido às crises tônicas generalizadas.

6.2.5.5. Ação em Canais de Na⁺

Nos ensaios eletrofisiológicos realizados com os canais hNa_v1.2, hNa_v1.4, hNa_v1.5 e hNa_v1.6 expressos em células HEK (Fig. 40), a Ap1a não apresentou efeitos significativos na

concentração de 1 μM , havendo apenas uma redução mínima e não estatisticamente significativa do pico máximo de corrente de sódio.

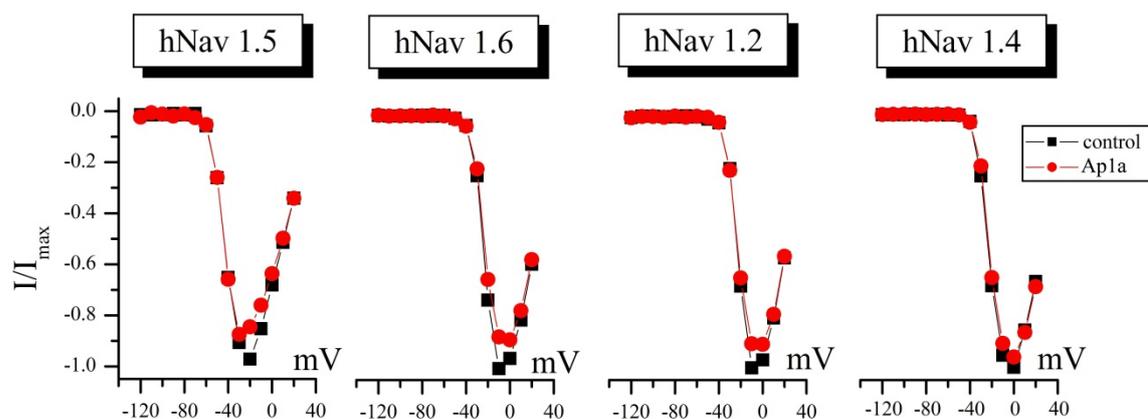


Figura 40. Relação corrente-voltagem para correntes de pico de sódio nos canais $h\text{Nav}_{1.5}$, $h\text{Nav}_{1.6}$, $h\text{Nav}_{1.2}$ e $h\text{Nav}_{1.4}$ nas condições controle (preto) ou com a aplicação de 1 μM de Ap1a (vermelho). Correntes foram induzidas por pulsos (200 ms) de -120 mV a -10 mV precedidos por um pré-pulso de 5 ms a 50 mV, seguido de uma despolarização (50 ms) a -10 mV. O potencial de manutenção foi de -120 mV.

7. DISCUSSÃO

7.1. COMPONENTES DA PEÇONHA BRUTA

Comumente, no perfil cromatográfico de aranhas obtido por RP-HPLC, as acilpoliaminas e demais compostos de baixa massa molecular eluem nas primeiras frações cromatográficas, mais hidrofílicas, sendo, muitas vezes, de difícil purificação (Estrada *et al.*, 2007). Por esse motivo, adotamos o método de eluição no qual de 0 a 10 min a porcentagem de solução B (acetonitrila e TFA 0,1%) mantém-se a 0%, permitindo uma melhor separação dos compostos hidrofílicos, ainda que isso tenha sido observado apenas no perfil cromatográfico obtido por separação em coluna analítica (Fig. 12) e não por coluna semipreparativa (Fig. 11). Os peptídeos moduladores de canais iônicos eluem em uma hidrofobicidade intermediária e, posteriormente, são eluídos os compostos de maior massa molecular, como proteínas, dentre as quais enzimas (Estrada *et al.*, 2007; Guette *et al.*, 2006; Horni *et al.*, 2001). Por esse motivo, e com base na massa molecular das frações cromatográficas da peçonha, para o ensaio em fatias isoladas de ventrículo, optou-se pela coleta da fração de baixa massa molecular (FBMM) dos 10 a 45 min (0 a 35% B), e dos 45 e 74 min (35 a 64% B) para a fração protéica (FP).

O perfil de distribuição das massas moleculares dos componentes da peçonha bruta de *A. paulensis* foi distinto daquele perfil bimodal obtido por MALDI-TOF MS da peçonha de 55 espécies de aranhas caranguejeiras por Escoubas e Rash (2004), no qual a maior parte dos compostos (57,8%) possuía entre 3.500 e 4.500 Da, e uma menor quantidade (6,9%) se encontrava em uma distribuição secundária, de 6.500 a 7.000 Da. Na peçonha de *A. paulensis*, 38% dos compostos estiveram entre 3.500 e 5.999 Da, 30% foram compostos de baixa massa molecular, entre 500 e 1.999 Da, e 21% estiveram entre 6.500 e 7.999 Da.

Os íons m/z 601,4 e 729,6 – detectados em abundância e com alta intensidade em modo refletido na maioria das frações hidrofílicas – tiveram equivalentes detectados na peçonha de *Lasiadora parahybana* (m/z 601,38 e 729,35), tanto nos exemplares jovens (4 anos de idade), como nos adultos (8 anos) e nos mais velhos (14 anos), sendo considerados como biomarcadores (Guette *et al.*, 2006). Compostos com massas moleculares muito semelhantes a essas foram também identificados na peçonha das aranhas caranguejeiras *Lasiadora* sp. (Vizzotto, 2009) e *Nhandu coloratovillosus* (Rego, 2010).

Skinner e colaboradores (1990) caracterizaram parcialmente duas acilpoliaminas da peçonha da caranguejeira *Aphonopelma chalcodes*. Esses dois compostos eluíram em frações cromatográficas hidrofílicas bem proeminentes e, após purificados e analisados por LMSI-MS, tiveram determinadas as massas moleculares protonadas $[M+H^+] = 601$ e 729 , sendo assim denominados Apc_{600} e Apc_{728} . A análise dessas acilpoliaminas mostrou a presença de espermina e 1,3-diaminopropano em ambos os componentes, sem aminoácidos encontrados em sua estrutura. Posteriormente, McCormick e Meinwald (1993) sugeriram uma estrutura ainda não completamente elucidada para essas duas acilpoliaminas (Fig. 41).

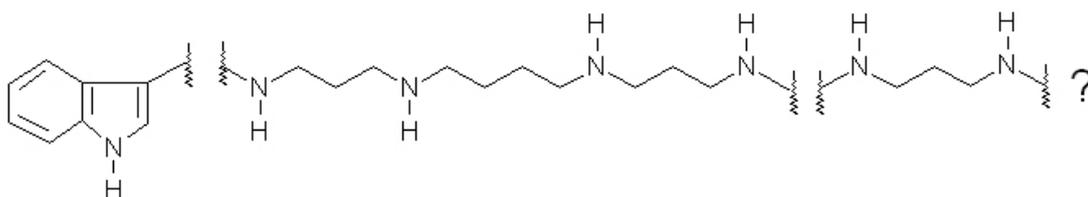


Figura 41. Estrutura parcial proposta para as acilpoliaminas Apc_{600} e Apc_{728} . Adaptado de McCormick e Meinwald (1993).

Devido à difícil purificação de poliaminas e acilpoliaminas da peçonha de aranhas e a sua relativa falta de seletividade, poucos estudos têm sido realizados com sua caracterização química e biológica (Estrada *et al.*, 2007). Todavia, estudos têm mostrado que a síntese de análogos pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de moléculas mais seletivas a determinados receptores ionotrópicos glutamatérgicos e também receptores nicotínicos colinérgicos (Strømgaard *et al.*, 2005; Strømgaard e Mellor, 2004), facilitando o estudo de seu papel neuroprotetor e seu potencial uso no tratamento de doenças crônicas, cânceres e de várias doenças neurodegenerativas (Estrada *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos validam a peçonha de *A. paulensis* como uma fonte potencial para a purificação de novas acilpoliaminas e o estudo de sua função. Além disso, vários componentes de maior massa molecular, incluindo peptídeos e proteínas, dentre as quais possíveis enzimas, ainda aguardam purificação e caracterização química e biológica.

7.2. ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA COM A PEÇONHA BRUTA

7.2.1. Toxicidade em Camundongos

Apesar da reputação das aranhas caranguejeiras, há poucos relatos de picadas por essas aranhas. A maioria das picadas resulta em dor média a severa, prurido e aumento de sensibilidade, os quais podem persistir por várias horas após a picada, edema, eritema, rigidez articular e inchaço dos membros, queimação e cólicas. Em casos mais severos, cólicas severas e espasmos musculares, os quais podem durar várias horas, também foram observados. A dor após a picada pode ser devido a uma combinação de lesão mecânica devido às grandes quelíceras, baixo pH da peçonha (geralmente próximo a 5) e efeito das aminas biogênicas (serotonina e histamina), adenosina e ATP (Escoubas e Rash, 2004).

No Brasil, não se tem registros de acidentes letais em humanos com a peçonha de caranguejeiras (Lucas *et al.*, 2003). Nos 91 casos de picadas com aranhas migalomorfas registrados entre 1966 e 1991 pelo Hospital Vital Brazil (Instituto Butantan, SP), os quais representam menos de 1% do total de picadas de aranhas, relatou-se envenenamento do tipo médio, tendo como sintoma principal dor local, e, em menos casos, edema ou eritema (Lucas *et al.*, 1994).

Em um estudo de casos com picadas das aranhas caranguejeiras dos gêneros *Phlogellius* e *Selenocosmia* na Austrália, mostrou-se que os principais efeitos clínicos das picadas em humanos foram dor local moderada a severa, com inchaço e aumento da sensibilidade em alguns casos, e, geralmente, com as marcas das quelíceras presentes, sendo incomuns efeitos sistêmicos, como náuseas. Por outro lado, a picada foi letal para todos os casos registrados de envenenamento em cães (Isbister *et al.*, 2003).

Na Ásia, acidentes com a caranguejeira *Haplopelma lividum* produziram dor severa inicial e inflamação em um paciente, os quais duraram apenas poucas horas após tratamento sintomático, e rigidez de artrite em outro paciente, a qual durou por poucas semanas após a picada, sem danos permanentes (Takaoka *et al.*, 2001).

Além das picadas, outro efeito clínico que tem sido reportado de danos causados por aranhas caranguejeiras é a lesão oftalmológica causada por seus pelos urticantes (Choi e Rauf, 2003; Hung *et al.*, 1996; Sheth *et al.*, 2009), além de dermatite de contato (Castro *et*

al., 1995), problemas que têm crescido devido à popularidade dessas aranhas como animais de estimação (*pets*), e que são mais danosos que a própria picada (Isbister *et al.*, 2003).

Há poucos estudos relatando quantitativamente a toxicidade da peçonha de caranguejeiras. Um estudo comparativo com injeções via i.c.v. da peçonha bruta de 55 espécies de caranguejeiras em camundongos (20 g) revelou grandes diferenças de atividade, com tempo para morte variando de 3 min a mais de 2 h e sintomas envolvendo paralisia rígida ou flácida, piloereção, lacrimação e salivação excessivas, hiperextensão da cauda e convulsão, ou a combinação destes (Escoubas e Rash, 2004). A toxicidade da peçonha foi maior em espécies da Ásia e África, e de espécies arborícolas, como *Heteroscodra*, *Stromatopelma* e *Poecilotheria*. Dentre as 20 espécies estudadas da América do Sul, 12 delas, incluindo *Grammostola spatulata* e *Acanthoscurria* sp, apresentaram maior toxicidade da peçonha, com morte em menos de 30 min após início do experimento. *Lasiodora parahybana* e *Vitalius platyomma* estiveram entre as demais com menor toxicidade (Escoubas e Rash, 2004).

A DL₅₀ calculada neste estudo para a peçonha da aranha *Acanthoscurria paulensis*, injetada em camundongos via i.p., foi de 25,45 ± 2,42 mg/kg (Fig. 15), havendo um evidente efeito dependente da dose e mortes em aproximadamente duas horas após o início do experimento nas maiores doses testadas. Doses letais mínimas (DL₁₀₀) de 0,21 a 0,95 mg de peçonha bruta de caranguejeiras por camundongo de 20 g são reportados (Bücherl, 1971 *apud* Escoubas e Rash, 2004), o equivalente a 10,5 – 47,5 mg/kg, embora esse seja o valor mínimo letal a 100% dos animais testados. Bem abaixo da dose de *A. paulensis*, a DL₅₀ calculada após injeção via intravenosa da peçonha da caranguejeira *Stromatopelma griseipes* (= *Scodra griseipes*) foi de 8,1 mg/kg para aranhas fêmeas jovens e de 9,5 mg/kg para os machos adultos (Celerier *et al.*, 1993). Todavia, a comparação quantitativa com outros estudos é dificultada, visto que a análise de toxicidade varia dependendo da via de administração da peçonha e do tempo considerado. É importante notar que, no presente estudo, a análise de toxicidade em camundongos foi realizada apenas com a peçonha de espécimes machos de *A. paulensis*, devido à sua maior disponibilidade no momento, podendo haver diferenças em relação à peçonha de fêmeas.

Não se examinou o mecanismo de ação responsável pelos efeitos da peçonha em camundongos observados neste estudo, embora os sintomas envolvendo paralisia flácida

generalizada e estágios pré-convulsivos ou convulsões médias possam ser correlacionados com a presença de acilpoliaminas e outros compostos de baixa massa molecular (Escoubas e Rash, 2004; Savel-Niemann, 1989).

Considerando o alto valor da DL_{50} calculada para a peçonha de *A. paulensis* e a ausência de relatos de acidentes graves ocorridos com sua picada, presume-se que essa aranha não tenha maiores efeitos de importância clínica para humanos. Todavia, vale salientar que, apesar dos ensaios em camundongos e outros animais não humanos serem ferramentas essenciais para estudos toxicológicos, há casos de toxicidade diferencial em mamíferos que podem levar a extrapolações incorretas. A picada de aranhas australianas do gênero *Atrax* (Hexathelidae), por exemplo, é altamente tóxica e potencialmente letal para primatas, mas não para outros mamíferos, enquanto as picadas das aranhas caranguejeiras australianas *Phlogellius* spp. e *Selenocosmia* spp. são fatais para cães, mas causam pouco efeito em humanos (Isbister *et al.*, 2003).

7.2.2. Atividade em Coração

A atividade em tecido cardíaco da peçonha bruta de *A. paulensis* e suas duas frações cromatográficas, FBMM e FP, foi testada por meio de dois ensaios: coração *in situ* e fatias isoladas de ventrículo. No primeiro ensaio, mostrou-se uma parada cardíaca transiente produzida pelo estímulo vagal e após administração da peçonha (Fig. 16). No segundo ensaio, observou-se uma diminuição na contração do coração na presença de acetilcolina, peçonha bruta e na fração FBMM, somente (Fig. 17). Em ambos os ensaios, na presença de atropina, um antagonista de receptor muscarínico, esses efeitos foram parcial ou completamente bloqueados na presença de atropina.

Tanto em anfíbios quanto em mamíferos, o estímulo vagal causa bradicardia, a qual é mediada pela liberação de acetilcolina (ACh) de axônios parassimpáticos pós-ganglionares. Em estudos com registros em células marcapasso, estímulos vagais de alta frequência causaram a cessação dos batimentos cardíacos e o potencial de membrana estabilizou-se em um valor positivo do potencial diastólico máximo. Sugere-se que a ACh liberada pelo vago reduza a frequência cardíaca pela supressão do fluxo de corrente entrante durante a diástole (Bywater *et al.*, 1989; Campbell *et al.*, 1989). A cessação do batimento ocorreria quando a corrente entrante durante a diástole fosse insuficiente para levar o potencial de

membrana ao limiar para a iniciação do potencial de ação, responsável pela despolarização espontânea das células marcapasso. A ACh exógena adicionada às células marcapasso também reduz a taxa de descarga dos potenciais de ação dessas células, porém, embora ambas ajam causando a hiperpolarização da membrana, sugere-se uma ação em diferentes receptores muscarínicos.

Em um estudo realizado por Kalapothakis e colaboradores (2003) com a peçonha da aranha caranguejeira *Lasiadora* sp. em coração isolado de rato, observou-se que a peçonha bruta (10-100 µg) causou uma bradicardia dependente da dose, com parada cardíaca transiente e distúrbios de ritmo. A análise do eletrocardiograma mostrou uma redução da frequência cardíaca devido à bradicardia sinusal, parada sinusal e bloqueio A-V parcial ou completo. Todos os efeitos da peçonha foram reversíveis após lavagem com solução Ringer. O efeito da peçonha foi potencializado com a droga anticolinesterásica neostigmina (3,3 µM), suprimido por atropina (1,4 µM), inibido por vesamicol (10 µM), um inibidor do transporte de ACh vesicular, e não foi inibido por TTX (200 nM), sugerindo que a peçonha bruta de *Lasiadora* sp. promove a liberação de ACh dos terminais nervosos parassimpáticos pela ativação de canais de Na⁺ resistentes à TTX.

Há relatos de peçonhas ou toxinas de outras aranhas e escorpiões que também produzem efeitos semelhantes aos produzidos por estímulos vagal ou simpático em coração isolado de rato, pela indução da liberação de neurotransmissores dos terminais nervosos autônomos. Como exemplos, tem-se a peçonha de *T. serrulatus* e sua toxina Ts-gamma (Couto *et al.*, 1992; Silveira *et al.*, 1991), as peçonhas dos escorpiões *Mesobuthus tamulus*, *M. martensii* e *Androctonus crassicauda* (Foucart *et al.*, 1994; Ismail *et al.*, 1994; Rowan *et al.*, 1992) e a peçonha das aranhas *Steatoda capensis* e *Phoneutria nigriventer* (Costa *et al.*, 1998; Korszniak e Story, 1994).

O efeito produzido pela peçonha de *P. nigriventer* em coração isolado de rato foi distinto do obtido neste estudo. A peçonha da aranha armadeira produziu efeitos inotrópico e cronotrópico positivos na dose de 50 µg, e bradicardia, parada cardíaca temporária e distúrbio de ritmo na maior dose (100 µg). Corações tratados com antagonistas β-adrenérgicos ficaram protegidos do efeito dessa peçonha, enquanto o tratamento com atropina potencializou o efeito na dose de 50 µg, indicando a liberação de norepinefrina dos terminais nervosos simpáticos (Costa *et al.*, 1998). Em um estudo anterior com essa mesma

peçonha, em uma preparação de átrios isolados do coração de cobaia, foram mostrados efeitos cronotrópico e inotrópico negativos, os quais foram abolidos por atropina, estando esses efeitos relacionados com a liberação de ACh. Além disso, mostraram-se alterações geradas pela liberação de noradrenalina. Ambos os efeitos são decorrentes da provável ação da peçonha em canais de Na^+ na membrana das terminações nervosas (Vital Brazil *et al.*, 1988). Os autores do estudo mais recente (Costa *et al.*, 1998) sugerem que a ausência de efeitos relacionados à liberação de ACh em coração de rato pode ser devido às diferentes preparações cardíacas utilizadas e também ao tratamento diferencial da peçonha, que passou por diálise no ensaio em coração de rato, diferentemente do ensaio em coração de cobaia. Os efeitos nas fibras parassimpáticas podem ser devido à presença de histamina e serotonina na peçonha não dialisada, substâncias conhecidas por afetar as respostas inotrópicas e cronotrópicas cardíacas (Endou *et al.*, 1994; Molderings *et al.*, 1996), além de outros compostos de baixa massa molecular (Costa *et al.*, 1998).

No ensaio de fatias isoladas de ventrículo com a peçonha de *A. paulensis* (Fig. 17), observou-se que tanto a peçonha bruta (50 μg) quanto a fração contendo compostos de baixa massa molecular (FBMM – 12,5 μg) tiveram efeito semelhante ao produzido pelo estímulo vagal, corroborando o sugerido por Costa e colaboradores (1998). O suave efeito inotrópico positivo observado após administração de atropina na fatia de ventrículo deve-se ao bloqueio dos receptores muscarínicos, potencializando, assim, a ação simpática no tecido cardíaco. No ensaio de coração *in situ* (Fig. 16), ao adicionar peçonha bruta (500 μg em 200 μL de solução Ringer) no coração atropinizado, houve uma breve desestabilização no registro mecânico, o que pode ser atribuído à capacidade intrínseca do coração de se adaptar a volumes crescentes de fluxo sanguíneo, conhecida como mecanismo de Frank-Starling (Guyton e Hall, 2006). Segundo esse mecanismo, quando uma quantidade de sangue adicional chega aos ventrículos, o músculo cardíaco é mais distendido e, por isso, contrai-se com maior força, bombeando mais sangue para as artérias. Portanto, apesar da alteração no registro mecânico visto durante este ensaio, o registro elétrico manteve-se inalterado, sugerindo o bloqueio total por atropina.

Por fim, os resultados obtidos indicam que os compostos de baixa massa molecular são os responsáveis pelos efeitos observados com a peçonha bruta de *A. paulensis* nos ensaios de coração *in situ* e de fatias isoladas de ventrículo, e que, devido à ação semelhante

a do estímulo vagal, e à inibição dos efeitos produzida por atropina, essa atividade possa estar relacionada à liberação de acetilcolina dos terminais nervosos parassimpáticos, semelhante ao ocorrido com a peçonha bruta de *Lasiodora* sp. (Kalapothakis *et al.*, 2003). Alternativamente, é possível que a FBMM possua algum agonista colinérgico que afete diretamente a atividade cardíaca. Estudos posteriores podem ser realizados a fim de se isolar, da fração de baixa massa molecular, o(s) composto(s) responsável(eis) pela atividade em coração observada em ambos os ensaios.

7.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO PEPTÍDEO AP1A

Nesse estudo realizou-se a caracterização química e biológica do peptídeo de maior representatividade da peçonha da aranha *A. paulensis*. Denominado Ap1a, esse composto eluiu aos 51,0 min (41% de acetonitrila) quando submetido a um sistema RP-HPLC em coluna semipreparativa Phenomenex C18, e, após subseqüentes cromatografias para obtenção do peptídeo puro, apresentou $[M+H^+] = 5457,79$. Por meio de diferentes estratégias complementares, sua estrutura primária foi completamente elucidada, contendo 48 resíduos de aminoácidos e seis resíduos de cisteínas, as quais se ligam formando três pontes dissulfeto.

O precursor do peptídeo Ap1a, obtido por meio de análises transcriptômicas, apresentou um peptídeo sinal contendo 23 resíduos de aminoácidos, um pró-peptídeo contendo 27 resíduos e um peptídeo maduro contendo 48 resíduos. Tanto o peptídeo sinal quanto o pró-peptídeo dessa sequência putativa apresentaram similaridade considerável com os de outras sequências putativas de diferentes aranhas caranguejeiras, como mostrado na Figura 23. O peptídeo sinal e o pró-peptídeo das sequências putativas de *Lasiodora* sp. foram os que apresentaram maior porcentagem de identidade com seus respectivos em Ap1a: 70 e 74%, respectivamente. O peptídeo sinal das U1-TRTX-Lsp1a e U1-TRTX-Lsp1b apresentaram porcentagem de identidade ainda maior com o de Ap1a: 87%. As demais sequências putativas utilizadas no alinhamento possuem essas duas regiões com menor quantidade de resíduos de aminoácidos e porcentagens de identidade variando de 48 a 52% na região do peptídeo sinal, e 37 a 55% no pró-peptídeo. Visto que *Lasiodora* é um gênero encontrado no Brasil (Motta e Bertani, 2010), e que essas últimas sequências

pertencem às aranhas *Chilobrachys jingzhao* e *Haplopelma schmidtii*, ambas encontradas no território da China (Chen *et al.*, 2008; Liang, 2004), é bem possível que a maior porcentagem de identidade entre peptídeo sinal e pró-peptídeo das sequências de *Lasiodora* sp. com o peptídeo de *A. paulensis* reflita a maior proximidade evolutiva entre essas espécies.

O peptídeo Ap1a apresentou de 60 a 84% de identidade com toxinas isoladas da peçonha de aranhas caranguejeiras pertencentes à família da HWTX-II (U1-TRTX-Hh1a) (Fig. 24). A U1-TRTX-Bs1a (TxP1) é uma peptídeo de 39 resíduos de aminoácidos, isolada da peçonha da aranha *Brachypelma smithi* (Kaiser *et al.*, 1994), e idêntica à U1-TRTX-Asp1b (ESTx2), da aranha *Aphonopelma californicum* (Savel-Niemann, 1989). A U1-TRTX-Asp1a (ESTx1), também isolada da peçonha de *A. californicum*, difere da U1-TRTX-Asp1b por apenas um resíduo de aminoácido, na posição 26 (Savel-Niemann, 1989). As três não possuem atividade biológica descrita até o momento e apresentaram 84 a 82% de identidade com a Ap1a. A U1-TRTX-Ba1a (Ba1) e U1-TRTX-Ba1b (Ba2) apresentaram ambas 82% de identidade com a Ap1a. Essas duas toxinas de 39 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto foram isoladas da peçonha da aranha *Brachypelma ruhnaui* (= *B. albiceps*) e apresentam atividade inseticida (Corzo *et al.*, 2009). As LpTxs (U1-TRTX-Lp1a e U1-TRTX-Lp1b), da peçonha da caranguejeira *Lasiodora parahybana*, possuem 49 resíduos de aminoácidos e, diferentemente das demais, são estruturadas por quatro pontes dissulfeto, sendo tóxicas apenas para camundongos e não para insetos (Escoubas *et al.*, 1997).

A HWTX-II, isolada da peçonha da aranha *Haplopelma schmidtii*, é um peptídeo com atividade inseticida, composto por 37 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto (Shu e Liang, 1999). Essa toxina possui um efeito paralítico dependente da dose em baratas, com DE₅₀ de 127 ± 54 µg/g, além de bloquear a transmissão neuromuscular em preparação de nervo frênico isolado de camundongo (Shu e Liang, 1999). A HWTX-VII, isolada da mesma peçonha, é um peptídeo de 36 resíduos de aminoácidos e seis cisteínas, e difere da HWTX-II por apenas um resíduo na região N-terminal. A HWTX-VIII (U1-TRTX-Hh1f), contendo 35 resíduos de aminoácidos e seis cisteínas, difere da HWTX-II por apenas sete resíduos. Tanto a HWTX-VII quanto a HWTX-VIII induzem efeito paralítico em gafanhotos e são letais a camundongos (injeção via i.c.v.), além de bloquear a transmissão neuromuscular em preparação de nervo frênico isolado de camundongo, semelhante à HWTX-II, e agir cooperativamente com a HWTX-I (Liang, 2004).

Assim como muitos peptídeos moduladores de canais iônicos da peçonha de aranhas (Escoubas e Rash, 2004), a estrutura da Ap1a possui um alto conteúdo (29%) de resíduos de aminoácidos básicos, principalmente Lys, e apresenta um ponto isoelétrico teórico de 9,3. Semelhante a esses peptídeos, a superfície molecular da U1-TRTX-Ba1b possui grande anisotropia eletrostática devido a um *cluster* formado pelos resíduos básicos K₁₁, K₁₂, K₁₅, R₃₀, K₃₂ e K₃₄ (Corzo *et al.*, 2009), os quais apresentam alto grau de conservação com as posições correspondentes das toxinas da família da HWTX-II.

Diferentemente da maioria das toxinas de aranhas descritas até o momento, a HWTX-II possui o motivo estrutural tipo DDH (*disulfide-directed β-hairpin*), com o pareamento das pontes dissulfeto conforme o arranjo C_I-C_{III}, C_{II}-C_V, C_{IV}-C_{VI} (Shu *et al.*, 2001). Sua estrutura tridimensional apresenta duas voltas-β (Cys₄-Ser₇ e Lys₂₄-Trp₂₇) e dois segmentos em folha-β antiparalela (Trp₂₇-Cys₂₉ e Cys₃₄-Lys₃₆), não possuindo o nó de cisteína característico do motivo ICK (*Inhibitory Cystine Knot*) (Shu *et al.*, 2002).

Autores têm sugerido que, devido à alta similaridade primária entre as toxinas da família da HWTX-II, estas provavelmente teriam o motivo DDH (Diego-García *et al.*, 2010; Escoubas e Rash, 2004; Shu *et al.*, 2002). De fato, análises estruturais da U1-TRTX-Ba1b revelaram que essa toxina apresenta conectividade das pontes dissulfeto consistente com o motivo DDH. No entanto, diferente da HWTX-II, a U1-TRTX-Ba1b apresenta três segmentos de folha-β antiparalelas (Lys₁₅-Cys₁₇, Trp₂₉-Lys₃₂, Leu₃₅-Lys₃₈), sendo as estruturas de ambas bem distintas e não passíveis de sobreposição (Corzo *et al.*, 2009). No banco de dados público (SwissProt), o arranjo das pontes dissulfeto C_I-C_{IV}, C_{II}-C_V, C_{III}-C_{VI}, característico do motivo ICK, está reportado para as toxinas U1-TRTX-Ba1a e U1-TRTX-Ba1b. No entanto, ambas possuem o arranjo estrutural característico do motivo DDH (Corzo *et al.*, 2009 e comunicação pessoal). Por outro lado, a toxina U1-TRTX-Bs1a apresenta padrão das pontes dissulfeto típico do motivo ICK (Kaiser *et al.*, 1994). Por meio de digestões da U1-TRTX-Bs1a com tripsina e quimotripsina e posterior redução dos fragmentos obtidos, determinou-se a massa molecular dos fragmentos contendo C_I e C_{IV} (e sua ligação) e C_{III} e C_{VI} (e sua ligação), restando a ligação C_{II}-C_V, por eliminação.

Neste estudo, mostramos que a Ap1a apresenta a disposição C_I-C_{IV}, C_{II}-C_V, C_{III}-C_{VI}, semelhante à toxina U1-TRTX-Bs1a e às demais caracterizadas como motivo ICK (Norton e Pallaghy, 1998; Vassilevski *et al.*, 2009; Ferrat e Darbon, 2005). Porém, diferente da sequência consensual do motivo ICK (C_IX₂₋₇-C_{II}X₃₋₁₁-C_{III}X₀₋₇-C_{IV}X₁₋₁₇-C_VX₁₋₁₉-C_{VI}), a Ap1a

apresentou sequência $C_I X_3 - C_{II} X_{13} - C_{III} X_{11} - C_{IV} X_5 - C_V X_4 - C_{VI}$, com maior número de resíduos de aminoácidos entre C_{II} e C_{III} e entre C_{III} e C_{IV} . Além disso, é comum nas toxinas que adotam o motivo ICK a presença de duas cisteínas adjacentes ($C_{III}C_{IV}$) (Norton e Pallaghy, 1998; Vassilevski *et al.*, 2009; Escoubas e Rash, 2004), ausentes em Ap1a e U1-TRTX-Bs1a. Portanto, apesar de estas apresentarem pareamento das pontes dissulfeto semelhante ao motivo ICK, isso não necessariamente significa que elas apresentam conformidade estrutural com o mesmo. Isso é comum também em outras toxinas cujas estruturas primárias assemelham-se ao motivo ICK, mas que não apresentam o nó de cisteína (Vassilevski *et al.*, 2009). Conforme determinação dos pares de Cys e a predição da estrutura secundária, a Ap1a provavelmente possui dois segmentos de folha- β conectando a porção N-terminal à porção C-terminal do peptídeo. Uma possibilidade é apresentada na Figura 42. Para determinação desambígua da estrutura tridimensional do peptídeo Ap1a, sugerimos sua posterior análise por cristalografia ou ressonância nuclear magnética.

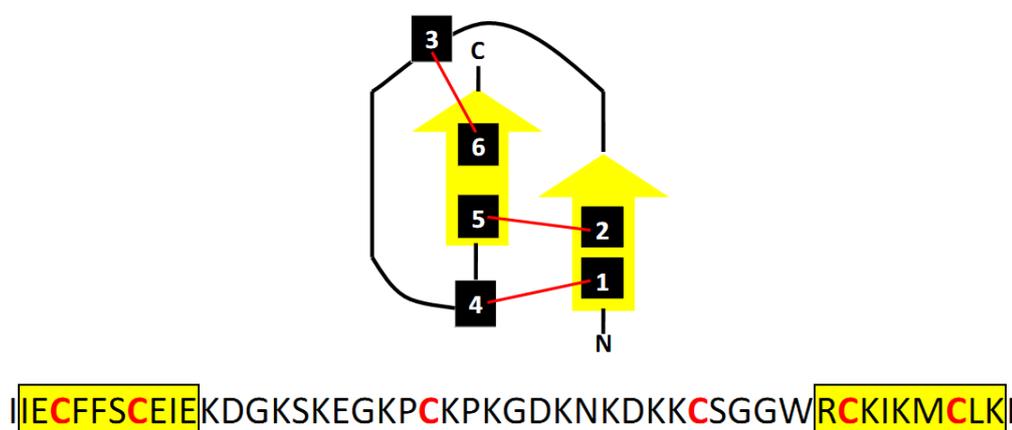


Figura 42. Possível estrutura secundária da Ap1a. Folhas- β representadas em amarelo. Pontes dissulfeto representadas em vermelho. Os números se referem aos resíduos Cys.

Sugeriu-se que as LpTxs (U1-TRTX-Lp1a e U1-TRTX-Lp1b) poderiam também adotar a conformação DDH, modificada pelo segmento extra “CKCXDKDNKD”, contendo uma ponte dissulfeto adicional (Diego-García *et al.*, 2010; Escoubas e Rash, 2004). Entretanto, devido à atividade biológica distinta em relação às demais toxinas dessa família (Escoubas *et al.*, 1997) e devido à carência de informações quanto à conectividade de suas pontes ou sua estrutura tridimensional, ainda pode ser cedo para gerar conclusões sobre seu motivo

estrutural (Escoubas e Rash, 2004). Posteriormente, postulou-se que esse segmento extra atuaria na seletividade a mamíferos dessas toxinas (Diego-García *et al.*, 2010).

Apesar de apresentar muitos resíduos conservados em relação às demais sequências da análise de similaridade, dois fragmentos extras foram também evidentes na estrutura primária do peptídeo Ap1a. O primeiro fragmento é formado pelos resíduos Asp₁₃-Lys₁₇, no longo segmento entre C_{II} e C_{III}; e o segundo é formado pelos resíduos Asp₂₇-Lys₃₀, entre C_{III} e C_{IV}. Embora não idêntico, esse segundo fragmento assemelha-se ao fragmento extra das LpTxS. Assim, devido às peculiaridades desse peptídeo da peçonha de *A. paulensis*, possuindo peptídeo sinal, pró-peptídeo e tamanho semelhante aos das LpTxS, mas com apenas seis resíduos de cisteína; apresentando dois fragmentos extras na sua estrutura primária; e possuindo conectividade das pontes dissulfeto de acordo com o motivo ICK, sugere-se que esse peptídeo seja uma molécula potencial para o estudo dessa família de peptídeos. É possível que, com a caracterização de mais uma toxina com motivo ICK dentro da família da HWTX-II (além da U1-TRTX-Bs1a), novas análises sejam realizadas a fim de compreender quais mecanismos levam às diferentes ligações de cisteínas, e se há uma explicação evolutiva para isso, visto que o motivo ICK pode ser considerado como uma evolução molecular do motivo DDH (Smith *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000).

7.4. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DO PEPTÍDEO AP1A

Essa seção será apresentada com tópicos separados apenas para os ensaios em que a Ap1a apresentou resultado positivo, sendo os demais ensaios discutidos junto a esses.

7.4.1. Atividade Inseticida

O peptídeo Ap1a produziu um efeito paralítico dependente da dose em lagartas *S. frugiperda* com DE₅₀ de 13,01 ± 4,21 µg/g (2,38 ± 0,77 nmol/g). O efeito foi máximo 8 h após a inoculação do peptídeo, havendo reversão total na menor dose e parcial nas demais em 48 h de observação.

Comparada à HWTX-II, com a qual apresentou 67% de identidade, a dose paralítica da Ap1a foi consideravelmente menor, ainda que tenham sido utilizados diferentes modelos biológicos. Como dito anteriormente, em baratas *P. americana*, a HWTX-II produziu um efeito paralítico dependente da dose com DE₅₀ de 127 ± 54 µg/g. Esse efeito teve início em

10 min e durou cerca de 6 h. Além disso, doses maiores (200 µg/g) podem levar à morte dos animais (Shu e Liang, 1999).

Por outro lado, as toxinas U1-TRTX-Ba1a (Ba1) e U1-TRTX-Ba1b (Ba2), as quais apresentaram 82% de identidade com a Ap1a, foram letais a grilos *A. domestica* com DL₅₀ de 10,8 ± 1,4 e 9,2 ± 0,9, respectivamente, considerando 15 min de observação após injeção. Nenhuma delas modificou correntes de canais de sódio de inseto *para/tipE*, sendo sugerida sua ação em outros canais iônicos ou diferentes subtipos de canais Na_v (Corzo *et al.*, 2009).

A Ap1a apresentou também uma DE₅₀ ligeiramente menor que a toxina HWTX-V (ω-TRTX-Hh2a). Isolada da peçonha da aranha *Haplopelma schmidtii*, esse peptídeo de 35 resíduos de aminoácidos foi primeiramente sequenciado a partir de seu precursor (Diao *et al.*, 2003), e foi isolado da peçonha junto com seu mutante natural, denominado mHWTX-V (Zhang *et al.*, 2003). A HWTX-V pode paralisar gafanhotos e baratas por várias horas (DE₅₀ = 16 ± 5 µg/g para gafanhotos) e é letal em doses maiores. Seu mutante natural, porém, não foi tóxico a esses insetos, indicando que os últimos resíduos da região C-terminal (Phe₃₄ e Ser₃₅), os quais estão ausentes no mutante, são essenciais para a atividade biológica (Zhang *et al.*, 2003). Estudos eletrofisiológicos mostraram que a HWTX-V inibe especificamente canais de cálcio ativados por alta voltagem (HVA) em neurônios DUM (*dorsal unpaired median*) de baratas (IC₅₀ ~ 219 nM), sem efeitos em canais K_v ou Na_v a 1 µM (Deng *et al.*, 2008). Essa toxina não apresentou efeito tóxico a camundongos após injeção i.c.v. ou intra-abdominal (Zhang *et al.*, 2003).

O fato de a Ap1a não ter sido letal para as lagartas de *S. frugiperda* com as doses testadas dificulta um pouco a comparação com outras toxinas inseticidas de aranhas, visto que a maioria delas tem sua toxicidade expressa em valores de LD₅₀ (ver Tabela 2 na seção 1.4.2.5). Entretanto, apesar de sua dose efetiva média relativamente alta – em especial quando comparada a peptídeos específicos para insetos, como as ω-atracotoxinas, as quais atuam em canais Ca_v de insetos – se considerarmos que doses maiores de Ap1a, como 100 µg/g, podem ser letais, é possível que sua DL₅₀ seja próxima a de muitas toxinas inseticidas de aranhas, ou ainda menor.

As µ-agatoxinas, por exemplo, isoladas da peçonha da aranha *Agelenopsis aperta* (Agelenidae), possuem DL₅₀ entre 28 e 75 µg/g em lagartas de *M. sexta*. Durante os ensaios, os primeiros sintomas de intoxicação (lentidão e paralisia) tiveram início 2-3 h após injeção

(Skinner *et al.*, 1989). Estudos eletrofisiológicos mostraram que essas toxinas afetam canais Na_v pré-sinápticos, levando-os a abrir no potencial de repouso normal do nervo, o que gera disparos repetitivos nos ramos terminais de axônios motores de insetos e leva à liberação espontânea de neurotransmissor (Adams *et al.*, 1989). Dessa mesma família de peptídeos, a curtatoxina I (μ -AGTX-Hc1a), da peçonha de *Hololena curta* (Agelenidae), produziu paralisia imediata e irreversível em grilos *A. domestica*, que resultaram em dissecação e morte em 24-48 h, com DL_{50} de 20 $\mu\text{g/g}$ (Stapleton *et al.*, 1990). Esse efeito é consistente com bloqueio neuromuscular pré-sináptico irreversível, porém mais estudos são requeridos para confirmar sua ação em canais Na_v (Quistad *et al.*, 1991; Stapleton *et al.*, 1990).

As δ -palutoxinas (δ -PaluITs) 2 e 4, ou δ -AMATX-PI1b e δ -AMATX-PI1d, respectivamente, também apresentaram valores relativamente elevados de DL_{50} em larvas de *S. litura*: $24,7 \pm 11,18 \mu\text{g/g}$ e $>44,8 \mu\text{g/g}$, respectivamente (Corzo *et al.*, 2000). Isoladas da peçonha da aranha *Pireneitega luctuosa* (Amaurobiidae), as δ -PaluITs retardam a inativação de correntes entrantes de Na^+ em axônios de baratas de forma semelhante às toxinas com ação no sítio 3 de canais Na_v , como as toxinas α -escorpiônicas (Corzo *et al.*, 2000), embora essas toxinas tenham deslocado a toxina β -escorpiônica Bj-xtrIT da ligação em membranas de barata e tenham falhado em deslocar a ligação da Lqh α IT (Corzo *et al.*, 2005). Dessa forma, essas toxinas representam as primeiras toxinas de aranhas a se ligar ao sítio 4 de canais Na_v , embora modulem a inativação dos mesmos. Análises estruturais da δ -PaluIT2 e também da δ -PaluIT1 mostraram que ambas adotam o motivo estrutural ICK, apresentando folhas- β antiparalelas de três ou dois segmentos, respectivamente (Ferrat *et al.*, 2005). Das quatro δ -PaluITs descritas, apenas a δ -PaluIT2 foi tóxica a camundongos à dose de 2 μg por animal (injeção via i.c.v.), induzindo paralisia reversível de suas pernas esquerdas (Corzo *et al.*, 2000).

As toxinas Magi-2 a Magi-6, da aranha migalomorfa *Macrothele gigas* (Hexathelidae), também apresentam atividade inseticida (Corzo *et al.*, 2003). Magi-2 (μ -HXTX-Mg1a), Magi-3 (μ -HXTX-Mg2a), Magi-4 (δ -HXTX-Mg1a), Magi-5 (β -HXTX-Mg1a) e Magi-6 (U7-HXTX-Mg1a) causaram paralisia às larvas de *S. litura* com valores de DL_{50} de 17,6, 10,3, 1,2, 8,6 e 3,1 nmol/g, respectivamente. Enquanto Magi-2 e Magi-3 não foram tóxicas a camundongos a 20 pmol/g, as três outras toxinas foram letais a camundongos (DL_{50} de 0,15 a 0,74 pmol/g). Magi-1, 2, 3 e 4 parecem se ligar ao sítio 3 de canais Na_v de sinaptossomas de baratas, não

competindo com outras toxinas para a ligação em sinaptossomas cerebrais de ratos. Apenas Magi-5 liga-se tanto ao sítio 3 em insetos quanto ao sítio 4 em ratos, sem afinidade por sítio 3 de mamíferos ou sítio 4 de insetos. O modo de ação da Magi-6 permanece desconhecido (Corzo *et al.*, 2003).

Apesar de pouco reportados, há também relatos de peptídeos inseticidas de aranhas que agem afetando a neurotransmissão glutamatérgica. Figueiredo e colaboradores (1995) isolaram da peçonha da aranha *P. nigriventer* a fração peptídica PhTx4, a qual inibe a captação de glutamato de maneira dependente da dose de sinaptossomas corticais de ratos. Essa fração causou paralisia em moscas domésticas e apenas foi tóxica a camundongos a doses maiores que 9,5 µg/animal, via i.c.v. (Mafra *et al.*, 1999). Essa fração foi posteriormente fracionada, gerando as frações referidas como PnTx4(1-7).

Isolada dessa fração, a toxina PnTx4-3 (δ-CNTX-Pn1b) é um peptídeo de 48 resíduos de aminoácidos que também parece reduzir a captação de glutamato de sinaptossomas corticais de ratos (Oliveira *et al.*, 2003). Quando injetada via intratorácica em moscas domésticas e baratas, a PnTx4-3 produziu efeitos excitatórios imediatos, com DL₅₀ de 20 ng/mosca, sem efeitos aparentes de intoxicação em camundongos (30 µg/animal via i.c.v.) (Oliveira *et al.*, 2003).

Também da fração PhTx4, a toxina PnTx4(5-5) (γ-CNTX-Pn1a), composta por 47 resíduos de aminoácidos e cinco pontes dissulfeto, inibe reversivelmente correntes geradas por receptores NMDA em neurônios hipocampais de ratos. Essa toxina é altamente tóxica a moscas domésticas (DL₅₀ de 9,3 ng/mosca), baratas e grilos, sem efeitos macroscópicos em camundongos (30 µg/animal via i.c.v.) (de Figueiredo *et al.*, 2001). A toxina Tx4(6-1) (δ-CNTX-Pn1a), composta por 48 resíduos e cinco pontes dissulfeto, é também altamente tóxica a moscas domésticas (DL₅₀ de 3,8 ng/mosca), causando sintomas excitatórios imediatamente após a injeção intratorácica, e também a baratas (0,5 a 2,5 mg/kg), mas não a camundongos (30 µg/animal via i.c.v.) (Figueiredo *et al.*, 1995; Penaforte *et al.*, 2000). Essa toxina, que age seletivamente no sítio 3 de canais Na_v de insetos, afeta a o sistema nervoso periférico de insetos através da estimulação da liberação de glutamato na junção neuromuscular (de Lima *et al.*, 2002).

Assim, diversas são as possibilidades de mecanismo de ação de peptídeos inseticidas isolados da peçonha de aranhas. O peptídeo Ap1a, da peçonha de *A. paulensis*, apresentou

uma atividade inseticida considerável. Assim que maiores quantidades de peptídeo puro forem obtidas, mais ensaios serão realizados para determinação de sua dose letal média em insetos, a fim de melhorar os parâmetros para comparação com os demais peptídeos inseticidas descritos na literatura.

7.4.2. Circuito da Fibra Gigante de *Drosophila melanogaster*

Nesse estudo, o efeito do peptídeo Ap1a em um circuito neuronal bem caracterizado, o Sistema da Fibra Gigante (GFS) de *Drosophila melanogaster*, foi avaliado.

Fibras nervosas gigantes são uma característica do sistema nervoso de muitos invertebrados e alguns vertebrados mais primitivos, e tipicamente estão associadas a respostas de escape. As fibras gigantes (GF) de *D. melanogaster* são os dois maiores interneurônios desses animais, e possuem de 6 a 8 µm de diâmetro, o que, considerando-se o pequeno tamanho corpóreo de *Drosophila*, pode ser comparado à magnitude das fibras gigantes de lulas (0,5-1 mm de diâmetro), as quais são um modelo experimental para estudos eletrofisiológicos (Allen *et al.*, 2006).

Cada GF bilateral se estende do cérebro ao gânglio torácico, onde forma conexões sinápticas com dois neurônios ipsilaterais: um grande motoneurônio (TTMn) que estende seu axônio até o músculo do tergotrocâter (TTM), e o interneurônio sináptico periférico (PSI), o qual forma sinapses com alguns ou todos os cinco axônios motores maiores (DLMn) que inervam o músculo dorso longitudinal (DLM) (conforme ilustrado na Fig. 10) (ver revisão por Allen *et al.*, 2006). A iniciação do voo em *Drosophila* envolve uma série de eventos estereotipados de movimentos das asas e pernas, sendo os músculos DLM, TTM e DVM (músculo dorsoventral), essenciais para essa iniciação (Trimarchi e Schneiderman, 1995b). Mostrou-se que a via neural que ativa esses músculos varia de acordo com o estímulo. Estímulos visuais evocam esse comportamento pela mediação do GFS, sendo este um reflexo de escape. Voos voluntários ou induzidos por estímulo olfatório, em contrapartida, parecem não ser mediados pela GF (Trimarchi e Schneiderman, 1995a).

A GF estabelece sinapses elétricas e químicas com os neurônios ipsilaterais TTMn e PSI. O PSI, por sua vez, forma sinapses químicas com os neurônios DLMn (Allen *et al.*, 2006). Ambas as junções neuromusculares (JNMs) do TTM e DLM são sinapses químicas, o que foi confirmado por dois critérios principais: a elevada latência (aproximadamente 0,7-0,8 ms) do

estímulo à resposta nos músculos; e o fato de essas sinapses não se alterarem com mutações em genes das junções comunicantes (Blagburn *et al.*, 1999; Tanouye e Wyman, 1980).

Apesar de muitos neurônios no cérebro de *Drosophila* serem passíveis de ativação pelos eletrodos de estímulo na preparação do GFS, a única via de ativação dos músculos TTM e DLM a partir do cérebro parece ser via GF (Allen e Godenschwege, 2010). Isso é sugerido pelo fato de que a ablação genética das GFs ou a aniquilação das sinapses eletroquímicas entre GF e TTMn e PSI resultam na perda total das respostas dos músculos TTM e DLM após estímulo cerebral (Allen e Murphey, 2007; Allen *et al.*, 2000). Todavia, tanto o TTMn e os DLMns possuem outras vias de ativação ainda não caracterizadas, uma das quais é desencadeada por um estímulo iminente, como a aproximação de um objeto/predador, sendo essa uma outra via de escape de *Drosophila* (Fotowat *et al.*, 2009).

As junções comunicantes (*GAP junctions*) presentes nas sinapses elétricas GF-TTMn e GF-PSI são dependentes do gene *shaking-B* de *Drosophila* (Phelan *et al.*, 1998), o qual codifica proteínas transmembrana pertencentes à família das inexinas. As inexinas são proteínas de invertebrados análogas às conexinas, os componentes estruturais exclusivos das junções comunicantes de vertebrados (Baranova *et al.*, 2004; Panchin *et al.*, 2000; Phelan *et al.*, 2008). Homólogos de inexinas foram descritos em diversos grupos taxonômicos, incluindo vertebrados, sugerindo-se, assim, o nome “panexinas” (Baranova *et al.*, 2004).

Estudos com mutações sensíveis a temperatura do gene da colina acetiltransferase (*cha*), o qual codifica a enzima que catalisa a síntese de acetilcolina (ACh), demonstraram que as sinapses PSI-DLMn são colinérgicas (Gorczyca e Hall, 1984). Posteriormente, mostrou-se que essas sinapses são mediadas pelo receptor nicotínico colinérgico (nAChR) *Dα7* (Fayyazuddin *et al.*, 2006). Em *Drosophilas* mutantes para *Dα7*, ocorreram falhas no registro do DLM após estímulo da fibra gigante a 1, 10 e 100 Hz, não havendo nenhuma resposta no alelo mutante com fenótipo mais acentuado. Esse efeito foi explicado por defeitos nas sinapses PSI-DLMn dado a duas observações: (i) o TTM mostrou-se capaz de seguir adequadamente o estímulo da GF a 100 Hz em todos os alelos mutantes; (ii) possíveis defeitos nas junções neuromusculares foram descartados, visto que o estímulo direto no DLMn através de eletrodos localizados na cavidade torácica levaram a registros do DLM sem

falhas a 100 Hz. Após a reintrodução do transgene *Da7* tipo “selvagem” nos mutantes, recuperou-se a resposta do DLM à estimulação da GF (Fayyazuddin *et al.*, 2006). Dos dez nAChRs do genoma de *Drosophila*, três deles (*Da5*, *Da6* e *Da7*) são mais homólogos a receptores $\alpha 7$ de vertebrados que a outros receptores nicotínicos de insetos, sendo o gene $\alpha 7$ de *Drosophila* (*Da7*) homólogo ao gene *CHRNA7* de humanos (Grauso *et al.*, 2002).

O componente químico da sinapse GF-TTMn também utiliza acetilcolina como seu neurotransmissor. Porém, diferentemente da via PSI-DLMn, essas sinapses parecem não depender do nAChR *Da7* (Allen e Murphey, 2007). Estudos com microscopia eletrônica e biologia celular têm demonstrado que a sinapse GF-PSI também possui, além do componente elétrico, um componente químico. Todavia, diferentemente da via GF-TTMn, a qual leva a respostas no músculo TTM mesmo em mutantes do gene *shaking-B*, parece que o componente químico da sinapse GF-PSI é incapaz de funcionar por conta própria, não havendo resposta nesses mutantes (Allen e Murphey, 2007; Baird *et al.*, 1990; Thomas e Wyman, 1984).

Como dito, ambas as junções neuromusculares do TTM e DLM são sinapses químicas e, diferente de vertebrados, o principal neurotransmissor da JNM de insetos é o glutamato (Jan e Jan, 1976). As sinapses glutamatérgicas neuromusculares de *Drosophila* expressam receptores pós-sinápticos que são homólogos aos receptores não-NMDA de vertebrados. Até o momento, cinco subunidades de receptores ionotrópicos foram descritos nas JNMs de *Drosophila*: DGluRIIA, DGluRIIB, DGluRIIC/III, DGluRIID e DGluRIIE (Marrus *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 2005; Schuster *et al.*, 1991). A sequência do receptor DGluRIIA é idêntica a canais de vertebrados na região putativa do poro permeável a Ca^{2+} , enquanto a sequência do receptor DGluRIIB é divergente (Petersen *et al.*, 1997).

Dessa forma, se a ação da Ap1a fosse na via PSI-DLMn, mediada por receptores nicotínicos colinérgicos *Da7*, a resposta seria restrita a essa via, visto que, como observado por Fayyazuddin e colaboradores (2006), com seu bloqueio, o TTM manteve suas respostas ao estímulo da GF. Porém, dado que no experimento realizado com o peptídeo Ap1a houve redução de frequência e amplitude em ambas as vias (GF-TTM e GF-DLM) e que o estímulo torácico dado nas moscas injetadas com o peptídeo após os 15 min de experimento foi incapaz de gerar resposta muscular, sua ação restringe-se às junções neuromusculares do circuito da fibra gigante (TTMn-TTM e DLMn-DLM). A ausência de efeito em receptores

colinérgicos pode ser ainda corroborada com os resultados obtidos em outros ensaios deste estudo: (1) no ensaio de fatia isolada de ventrículo de rã, a fração protéica (FP, 50 μg) – a qual contém o peptídeo Ap1a como composto mais abundante – não apresentou efeito semelhante ao estímulo vagal; (2) na preparação com células de rabdiossarcoma, a Ap1a (1,0 μM) não alterou a resposta induzida por ACh.

O formato incomum do registro do TTM, com dois picos adjacentes mostrados na Figura 36, deve-se ao fato de o microeletrodo estar registrando o sinal de mais de uma célula muscular. Isso pode ocorrer em registros de ambos os músculos, mas é mais comum em registros do TTM, visto que esse músculo é composto por muitas fibras pequenas e manter a posição do eletrodo após várias contrações musculares é problemático. Todavia, esse formato não altera os dados, uma vez que a latência e a frequência de continuidade são preservadas durante o experimento (Allen e Godenschwege, 2010).

7.4.3. Toxicidade em Camundongos

Para verificar se a Ap1a era também tóxica a mamíferos, 30 μg (5,50 nmol) do peptídeo foram injetados intracranialmente em camundongos. Dentre os efeitos obtidos, observou-se que os animais tiveram *status epilepticus* (SE), definido como uma convulsão que persiste por um período de tempo, geralmente considerado como mais de 5 min, ou uma série de duas ou mais convulsões sem recuperação de consciência entre elas (Nair *et al.*, 2011; Tejeiro e Gómez Sereno, 2003). O SE é o suposto resultado da falha dos mecanismos normais que finalizam uma crise isolada. Essa falha pode ocorrer devido a uma excitação excessiva persistente ou ao recrutamento ineficiente da inibição. Os mecanismos propostos de SE são constante ativação do hipocampo, perda da transmissão sináptica inibitória mediada por GABA no hipocampo e transmissão sináptica excitatória glutamatérgica, sendo esta importante para a sustentação do SE.

Sugere-se que nos primeiros segundos de SE, há fosforilação protéica, alterando a abertura e fechamento de canais iônicos, seguida da liberação de neurotransmissores e moduladores e dessensibilização de receptores. Nos minutos iniciais, o tráfego de receptores resulta na mobilização dos receptores da membrana sináptica para endossomas, ou de sítios de armazenamento para a membrana sináptica. Devido a esse processo, o número de receptores excitatórios e inibitórios disponíveis na fenda sináptica é alterado, causando

mudanças drásticas na excitabilidade neuronal (Nair *et al.*, 2011). De minutos a horas, foi relatada uma redução funcional do número de receptores GABA_A pós-sinápticos e a internalização por endocitose acentuada de subunidades de receptor GABA_A, que explicam parcialmente a redução da inibição sináptica GABAérgica e consequente estado elevado de excitabilidade (Naylor *et al.*, 2005). Outros mecanismos, como o acúmulo intracelular de cloreto e bicarbonato, podem também atuar na redução da inibição mediada por GABA (Kaila e Voipio, 1987; Staley *et al.*, 1995).

Ao mesmo tempo, subunidades dos receptores AMPA e NMDA movem-se para a membrana sináptica, onde formam receptores excitatórios adicionais, aumentando a excitabilidade durante as crises generalizadas e persistentes do SE. Após despolarização intensa do neurônio pós-sináptico, o íon Mg²⁺ é removido do canal iônico do receptor glutamatérgico, permitindo o influxo dos cátions Na⁺ e Ca²⁺ no neurônio. Ocorre então uma cascata de eventos citotóxicos mediada por Ca²⁺ que acarretam em lesão neuronal e lise celular, podendo levar à destruição da célula caso o SE dure mais que uma hora (Wasterlain *et al.*, 1993). Outras complicações do SE podem ser hipóxia, acidose láctica sistêmica, narcose carbônica, hipercalcemia, hipoglicemia, choque, arritmias cardíacas, edema pulmonar, necrose tubular aguda, pneumonia por aspiração, hiperpirexia, leucocitose e pleocitose (aumento anormal no número de células no líquido) (Wasterlain *et al.*, 1993).

Por meio da utilização de modelos experimentais de SE tem sido possível obter informações importantes que expliquem os mecanismos patofisiológicos que o produzem e as causas das complicações neurológicas secundárias, além de ajudarem na busca por tratamentos efetivos que permitam reduzir a morbidez e mortalidade (Garcia Garcia *et al.*, 2010; Raol e Brooks-Kayal, 2012). Para se obter um modelo de SE, os animais são frequentemente submetidos a agentes químicos (administração sistêmica ou intracerebral de ácido caínico ou pilocarpina) ou a estímulos elétricos na amígdala ou hipocampo até que *status epilepticus* seja alcançado.

O ácido caínico (KA), um agonista de receptores tipo cainato, é um análogo não degradável de glutamato e 30 vezes mais potente em neurotoxicidade que este. Nos modelos experimentais de crises geradas pela sua administração, durante os 20-30 min iniciais os animais apresentam crises de ausência (perda momentânea de consciência), seguida de movimentos sagitais da cabeça (*head nodding*) e numerosos movimentos do tipo

wet-dog shake (movimentos circulares que se propagam da cabeça à cauda) por outros 30 min. Uma hora após a administração de KA, os animais têm crises motoras límbicas recorrentes, incluindo movimentos faciais e mastigatórios, tremores das patas dianteiras e criação e perda do controle postural. As crises tornam-se, então, progressivamente severas e 1-2 h depois, o animal apresenta *status epilepticus* (Chuang *et al.*, 2004; Mulle *et al.*, 1998; Zhang e Zhu, 2011).

Diferentemente, em camundongos tratados com injeções i.c.v. de NMDA, as convulsões desenvolvem-se através de uma sequência que inclui crises de coceira, hipermotilidade e movimentos circulares, saltos, contrações musculares involuntárias das patas dianteiras, cauda hipertônica, convulsões tônico-clônicas, *status epilepticus* e, eventualmente, morte (Antonov *et al.*, 1995; Chang-Mu *et al.*, 2010; Marganella *et al.*, 2005). Observou-se que com doses de aproximadamente 10 mM de NMDA, as crises generalizadas ocorrem 5 a 6 min após a injeção, com 75% de mortalidade após as convulsões tônicas severas (Chang-Mu *et al.*, 2010).

Os sintomas obtidos com a injeção da Ap1a em camundongos assemelharam-se bastante aos sintomas relatados em uma crise com administração de NMDA, sugerindo uma ação na neurotransmissão glutamatérgica, possivelmente pela interação com esses receptores. No entanto, até o momento, apenas receptores homólogos aos receptores não-NMDA de vertebrados foram descritos das sinapses glutamatérgicas neuromusculares do circuito da GF de *Drosophila*, provável sítio de ação da Ap1a (Marrus *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 2005; Schuster *et al.*, 1991). Pode ser que esse efeito em camundongos tenha sido devido à alta dose utilizada: enquanto 5,5 nmol (30 µg) de toxina foram utilizados em camundongos, a maior dose utilizada no ensaio com *Drosophila* foi de 4,60 pmol/mosca. Essa dose foi escolhida com base em ensaios previamente realizados com toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer*, as quais foram tóxicas a insetos, pela possível ação na neurotransmissão glutamatérgica, mas não apresentaram efeitos tóxicos em camundongos a 30 µg/animal via i.c.v. (Oliveira *et al.*, 2003; de Figueiredo *et al.*, 2001; Figueiredo *et al.*, 1995). Além dessa possível ação “generalista” devido à concentração elevada de Ap1a, há relatos de sinais de envolvimento de receptores AMPA na produção de convulsões induzida pela administração de NMDA, uma evidência da interação de diferentes receptores glutamatérgicos durante síndromes convulsivas (Lukomskaya *et al.*, 2004).

As toxinas α -KTx4.1 (tityustoxina-K α) e α -KTx7.1 (pandinustoxina-K α), isoladas da peçonha dos escorpiões *Tityus serrulatus* e *Pandinus imperator*, respectivamente, são bloqueadoras seletivas de canais de K⁺. Injeções via i.c.v. dessas toxinas em camundongos produziram crises límbicas e tônico-clônicas, culminando em *status epilepticus*, extensão tônica dos membros posteriores e, eventualmente, morte (10-60 min, dependendo da dose injetada). As doses estimadas para a produção das crises em 50% dos animais (CD₅₀) foram de 9 ng para a α -KTx4.1 e 33 ng para α -KTx7.1 (Juhng *et al.*, 1999). As crises induzidas pelas toxinas foram totalmente protegidas pela droga anticonvulsivante carbamazepina e pelo antagonista de receptor AMPA (GYKI 52466). Por outro lado, os antagonistas de receptor NMDA (dizocilpina e (R)-CPP) não protegeram as crises límbicas e clônicas induzidas pelas toxinas, mas ambos bloquearam a extensão dos membros posteriores e a letalidade. Os autores sugeriram que o efeito convulsivante pode estar relacionado ao aumento da liberação de glutamato e, no caso de crises límbicas e convulsões clônicas, ativação de receptores AMPA (Juhng *et al.*, 1999).

As toxinas inseticidas U1-TRTX-Ba1a e U1-TRTX-Ba1b, que apresentaram similaridade com a Ap1a, não foram tóxicas para camundongos com injeções via intracranial ou intraperitoneal de 3 μ g ou 20 μ g/camundongo de 20 g, respectivamente. Essas toxinas também não apresentaram efeito em canais Na_v de insetos (*para/tipE*) nem de mamíferos (Na_v1.2 e Na_v1.5) expressos em oócitos de *X. laevis* (Corzo *et al.*, 2009). Nos ensaios eletrofisiológicos realizados neste estudo com os canais hNa_v1.2, hNa_v1.4, hNa_v1.5 e hNa_v1.6 expressos em células HEK, a Ap1a (1 μ M) não apresentou efeitos significativos, indicando não ser esse seu principal alvo molecular.

Um peptídeo de 5.374 Da, denominado AnTxI, isolado da peçonha da aranha *Acanthoscurria natalensis*, teve sua sequência parcialmente caracterizada, com seus 26 resíduos da região N-terminal idênticos aos da Ap1a (Borges, 2008). Visto que os dois peptídeos apresentam diferentes massas moleculares, porém muito próximas, é possível que apenas alguns resíduos de aminoácidos sejam distintos nas duas sequências. A AnTxI foi tóxica para moscas (*Musca domestica*), causando excitação, seguida de efeito paralisante reversível após as primeiras horas de injeção. O efeito paralítico foi observado a partir de 35 ng/mosca, havendo letalidade na maior dose, de 70 ng/mosca, após 48 h. Em ensaios com neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos, a AnTxI causou inibição da corrente total

carreada por canais Ca_v a 100 nM, sendo esse efeito parcialmente reversível após lavagem. Segundo o autor, ensaios eletrofisiológicos prévios haviam mostrado baixa inibição da corrente de sódio (Borges, 2008). Visto que a fração protéica (a qual contém a Ap1a) da peçonha de *A. paulensis* não apresentou efeito no ensaio de fatia isolada de ventrículo de rã realizado neste estudo, é possível que nenhum de seus compostos atue em canais Ca_v , e, portanto, a Ap1a e a AnTxI teriam alvos moleculares distintos. Outra possibilidade é que a Ap1a atue em outros subtipos de canais de cálcio não presentes nos miócitos de rã. Dessa forma, ensaios posteriores devem ser realizados com a toxina Ap1a em canais Ca_v de diferentes subfamílias, já que uma ação em canais de Ca^{2+} pré-sinápticos presentes nas junções neuromusculares do circuito da Fibra Gigante de *Drosophila melanogaster* poderia afetar a neurotransmissão glutamatérgica.

Apesar dos avanços científicos a respeito do *status epilepticus*, ainda há muito a se esclarecer e, visto que ele representa um fator de emergência médica, com incidência anual de 18,3 a 41 por 100.000 indivíduos nos EUA e 10,3 a 17,1 por 100.000 na Europa, e que apresenta possibilidade de inúmeras complicações neuronais e sistêmicas (Nair et al., 2011), a utilização de novos agentes para modelos experimentais pode ser vantajosa no estudo do SE. Nesse sentido, sugerimos maiores investigações da atividade indutora de SE do peptídeo Ap1a visando uma possível nova ferramenta farmacológica para modelos experimentais de *status epilepticus*.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou a caracterização química e biológica da peçonha bruta da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis* e de seu peptídeo mais abundante, denominado Ap1a.

Por meio de técnicas de cromatografia e espectrometria de massa, mostrou-se a variabilidade de compostos presentes da peçonha bruta de *A. paulensis*, a qual apresentou um total de 58 frações cromatográficas e 97 massas moleculares distintas. Destacam-se os compostos de baixa massa molecular, como as prováveis acilpoliaminas m/z 601,4 e 729,6, além dos vários compostos peptídicos, visto que cerca de 60% dos compostos tiveram massa molecular entre 3.500 e 7.999 Da.

Identificou-se a dose letal média da peçonha bruta de *A. paulensis*, estando esta de acordo com os valores reportados para as peçonhas de aranhas caranguejeiras, as quais, no geral, não apresentam sintomas graves após envenenamento. Por meio dos ensaios em coração de rã, sugeriu-se que compostos presentes nas frações mais hidrofílicas dessa peçonha podem agir na liberação de acetilcolina dos terminais nervosos parassimpáticos ou, alternativamente, afetar diretamente a atividade cardíaca, atuando como agonista colinérgico.

O peptídeo Ap1a teve sua estrutura primária completamente caracterizada, apresentando 48 resíduos de aminoácidos, $[M+H]^+$ igual a 5.457,79, e seis cisteínas, as quais se ligam formando três pontes dissulfeto em um arranjo típico das toxinas que adotam o motivo estrutural ICK. Esse padrão de conectividade das cisteínas foi distinto da HWTX-II e U1-TRTX-Ba1b, com as quais apresentou similaridade, e que apresentam o motivo estrutural DDH, mas igual ao da toxina U1-TRTX-Bs1a, também integrante da família da HWTX-II. A estrutura secundária predita para a Ap1a apresenta duas folhas- β na porção N-terminal e C-terminal, as quais são unidas pelas pontes dissulfeto. É importante notar, porém, que a semelhança do arranjo das pontes dissulfeto da Ap1a com o motivo ICK não significa, necessariamente, que ela adote o motivo estrutural deste, com o nó de cisteína, o que deve ser posteriormente caracterizado por cristalografia ou ressonância nuclear magnética. O precursor da Ap1a foi também sequenciado, indicando um peptídeo sinal e pró-peptídeo

contendo 23 e 27 resíduos, respectivamente, mais conservados em relação aos equivalentes de *Lasiadora* sp., o que pode ser um indicativo da proximidade evolutiva dessas espécies.

Mostrou-se que a Ap1a induziu um efeito paralítico dependente da dose em lagartas *Spodoptra frugiperda*, com efeito máximo 8 h após a injeção. Sua ação no circuito da Fibra Gigante de *Drosophila melanogaster* – com redução de frequência e amplitude nas respostas das vias GF-TTM e GF-DLM, e ausência de resposta após estímulos torácicos – sugeriu sua interação na neurotransmissão glutamatérgica das junções neuromusculares do circuito. Além da sua atividade inseticida, mostrou-se que a Ap1a é também tóxica a camundongos, induzindo *status epilepticus* e levando à morte em menos de uma hora na dose de 30 µg/animal, via intracranial, sendo os efeitos obtidos semelhantes aos reportados com a administração via i.c.v. de NMDA, um agonista glutamatérgico. Em outros ensaios eletrofisiológicos, revelou-se que a Ap1a (1 µM) não alterou a resposta induzida por acetilcolina na preparação com células de rabdiossarcoma e que seus efeitos foram mínimos nos canais hNa_v1.2, hNa_v1.4, hNa_v1.5 e hNa_v1.6.

Dessa forma, os resultados sugerem a ação da Ap1a na neurotransmissão glutamatérgica, embora novos ensaios devam ser realizados para determinar seu sítio e modo de ação. Devido à ação da AnTxI, de *A. natalensis*, em canais Ca_v, sugere-se que a posterior caracterização da Ap1a seja realizada nesses canais. Todavia, visto que a fração protéica não teve efeito no ensaio de coração de rã, é bem provável que, caso a Ap1a tenha atividade em canais Ca_v, apenas alguns subtipos desses canais sejam afetados. Visto que a Ap1a é o principal composto peptídico da peçonha bruta de *A. paulensis* e que muitas toxinas de aranhas são promíscuas em sua atividade, não seria estranho que ela apresentasse mais de um alvo molecular. Fato esse que, evolutivamente, acarreta benefícios para a aranha, pois acelera ou facilita a paralisação da presa. A atuação na neurotransmissão glutamatérgica poderia, inclusive, ser um mecanismo de ação sinérgica às acilpoliaminas, as quais bloqueiam receptores ionotrópicos glutamatérgicos.

Por fim, o presente estudo proporcionou a caracterização parcial da diversidade molecular da peçonha da aranha caranguejeira *A. paulensis*, ainda sem relatos na literatura. Além disso, a caracterização química e biológica da Ap1a constitui-se como uma relevante contribuição para o estudo de estrutura-função da família da HWTX-II.

9. PERSPECTIVAS

Dentre a grande variedade de compostos presentes na peçonha de *Acanthoscurria paulensis* mostrados no presente estudo, apenas um deles, denominado Ap1a, foi melhor caracterizado, restando ainda elucidar a estrutura química e a atividade biológica de muitos deles. Assim como a peçonha de muitas aranhas caranguejeiras, a de *A. paulensis* mostrou-se rica em compostos de baixa massa molecular. Dentre estes, as acilpoliaminas de m/z 601,4 e 729,6, as quais já foram demonstradas na peçonha de outras caranguejeiras, podem ser futuramente isoladas dessa peçonha e caracterizadas. Da fração de baixa massa molecular pode-se também isolar e caracterizar o(s) composto(s) responsável(is) pela atividade observada no ensaio em coração de rã, testando sua ação em receptores colinérgicos e também em diferentes subtipos de canais de cálcio.

Dos compostos peptídicos de maior massa molecular, é de interesse do nosso grupo de pesquisa isolar e caracterizar aquele com atividade antinociceptiva demonstrada em estudos anteriores com a peçonha de *A. paulensis* (Araujo *et al.*, 2010), e que, devido ao tempo restrito, não pôde ser analisado no presente estudo. Outros compostos peptídicos também serão caracterizados, com destaque para aqueles com ação em canais K_v2 e K_v4 , auxiliando outros projetos de pesquisa em andamento no Laboratório de Toxinologia. Além disso, a análise dos transcritos obtidos a partir da construção da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *A. paulensis* será finalizada, gerando maiores informações sobre as estruturas primárias dos peptídeos da peçonha e corroborando com os estudos de análise proteômica.

Quanto ao peptídeo Ap1a, sua estrutura tridimensional ainda precisa ser caracterizada, sendo necessário purificar uma maior quantidade do peptídeo. Isso pode ser obtido diretamente da peçonha bruta, por meio de consecutivas etapas cromatográficas, ou, alternativamente, é possível sintetizá-lo quimicamente ou expressá-lo em sistemas heterólogos. A Ap1a deve, ainda, ter seu alvo molecular determinado, por meio de ensaios em receptores glutamatérgicos e em outros canais iônicos ainda não testados, em especial canais Ca_v pré-sinápticos da junção neuromuscular e também canais Na_v de insetos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.E. (2004). Agatoxins: ion channel specific toxins from the American funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Toxicon*, **43(5)**: 509-525.
- 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., MINTZ, I.M., REILY, M.D., THANABAL, V., BEAN, B.P. (1993). Structure and Properties of ω -Agatoxin IVB, a new antagonist of P-type calcium channels. *Molecular Pharmacology*, **44**: 681-688.
- ALLEN, M.J., GODENSCHWEGE, T.A., TANOUYE, M.A., PHELAN, P. (2006). Making an escape: development and function of the *Drosophila* giant fibre system. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **17**: 31-41.
- ALLEN, M.J., GODENSCHWEGE, T.A. (2010). Electrophysiological recordings from the *Drosophila* giant fiber system (GFS). *Cold Spring Harbor Protocols*, pdb prot5453.
- ALLEN, M.J., MURPHEY, R.K. (2007). The chemical component of the mixed GF-TTMn synapse in *Drosophila melanogaster* uses acetylcholine as its neurotransmitter. *European Journal of Neuroscience*, **26**: 439-445.
- ALLEN, M.J., SHAN, X., MURPHEY, R.K. (2000). A role for *Drosophila* Drac1 in neurite outgrowth and synaptogenesis in the giant fiber system. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **16**: 754-765.
- ANTONOV, S.M., JOHNSON, J.W., LUKOMSKAYA, N.Y., POTAPYEVA, N.N., GMIRO, V.E., MAGAZANIK, L.G. (1995). Novel adamantane derivatives act as blockers of open ligand-gated channels and as anticonvulsants. *Molecular Pharmacology*, **47**: 558-567.
- 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.
- ARAUJO, M.A.F., MOURÃO, C.B.F., Dos ANJOS, L.C., MOURÃO, C.A., COUTO, L.L., GONÇALVES, J.C., SHWARTZ, E.F., MORTARI, M.R. (2010). Atividade antinociceptiva de compostos isolados da peçonha da aranha *Acanthoscurria paulensis*. In: *Anais do II Simpósio em Biologia Animal*, Universidade de Brasília, Distrito Federal.
- ATKINSON, R.K., HOWDEN, M.E.H., TYLER, M.I., VONARX, E.J. (1998). Insecticidal toxins derived from funnel web (*Atrax* or *Hadronyche*) spiders. US Patent No. 5,763,568, Zeneca Limited, USA.

- AUGUSTIN, H., ALLEN, M. J., PARTRIDGE, L. (2011). Electrophysiological recordings from the giant fiber pathway of *D. melanogaster*. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, **47**, e2412, DOI: 10.3791/2412.
- BAIRD, D.H., SCHALET, A.P., WYMAN, R.J. (1990). The *Passover* locus in *Drosophila melanogaster*: complex complementation and different effects on the giant fiber neural pathway. *Genetics*, **126**: 1045-1059.
- BARANOVA, A., IVANOV, D., PETRASH, N., PESTOVA, A., SKOBLOV, M., KELMANSON, I., SHAGIN, D., NAZARENKO, S., GERAYMOVYCH, E., LITVIN, O., TIUNOVA, A., BORN, T.L., USMAN, N., STAROVEROV, D., LUKYANOV, S., PANCHIN, Y. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*, **83**: 706-716.
- BECHINGER, B., LOHNER, K. (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**: 1529-2539.
- BERTANI, R. (2001). Male palpal bulbs and homologous features in Theraphosinae (Araneae, Theraphosidae). *Journal of Arachnology*, **28**: 29-42.
- BICKMEYER, U., RÖSSLER, W., WIEGAND, H. (1994). Omega AGA toxin IVA blocks high-voltage-activated calcium channel currents in cultured pars intercerebralis neurosecretory cells of adult *Locusta migratoria*. *Neuroscience Letters*, **181(1-2)**: 113-116.
- BINFORD, G.J. (2001). An analysis of geographic and intersexual chemical variation in venoms of the spider *Tegenaria agrestis* (Agelenidae). *Toxicon*, **39**: 955-968.
- BLAGBURN, J.M., ALEXOPOULOS, H., DAVIES, J.A., BACON, J.P. (1999). Null mutation in *shaking-B* eliminates electrical, but not chemical, synapses in the *Drosophila* giant fiber system: a structural study. *The Journal of Comparative Neurology*, **404**: 449-458.
- BLASCHKE, M., KELLER, B.U., RIVOSECCHI, K.R., HOLLMANN, M., HEINEMANN, S., KONNERTH, A. (1993). A single amino acid determines the subunit-specific spider toxin block of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate/kainate receptor channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**: 6528-6532.
- BLEAKMAN, D., ALT, A., NISENBAUM, E.S. (2006). Glutamate receptors and pain. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **17**: 592-604.
- BONNING, B.C., HAMMOCK, B.D. (1996). Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annual Review of Entomology*, **41**: 191-210.

- BORGES, C.L.S. (2008). Purificação e caracterização biológicas parciais da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria natalensis*. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana.
- BOSMANS, F., SWARTZ, K.J. (2010). Targeting voltage sensors in sodium channels with spider toxins. *Trends in Pharmacological Sciences*, **31(4)**: 175-182.
- BOSMANS, F., TYTGAT, J. (2007). Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon*, **49**: 142-158.
- BOURINET, E., STOTZ, S.C., SPAETGENS, R.L., DAYANITHI, G., LEMOS, J., NARGEOT, J., ZAMPONI, G.W. (2001). Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of α_{1E} ($Ca_v2.3$) calcium channels. *Biophysical Journal*, **81**: 79-88.
- BOURINET, E., ZAMPONI, G.W. (2005). Voltage gated calcium channels as targets for analgesics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **5(6)**: 539-546.
- BRODGEN, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, **3**: 238-250.
- BROWN, M.R., SHEUMACK, D.D., TYLER, M.I., HOWDEN, M.E.H. (1988). Amino acid sequence of versutoxin, a lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax versutus*. *Biochemical Journal*, **250**: 401-405.
- BÜCHERL W (1971). Spiders. In: ESCOUBAS, P., RASH, L. (2004). Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, **43**: 555-574.
- BYWATER, R.A., CAMPBELL, G., EDWARDS, F.R., HIRST, G.D., O'SHEA, J.E. (1989). The effects of vagal stimulation and applied acetylcholine on the sinus venosus of the toad. *The Journal of Physiology*, **415**: 35-56.
- CALISKAN, F., GARCIA, B.I., CORONAS, F.I., BATISTA, C.V., ZAMUDIO, F.Z., POSSANI, L.D. (2006). Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes. *Toxicon*, **48**: 12-22.
- CAMPBELL, G.D., EDWARDS, F.R., HIRST, G.D., O'SHEA, J.E. (1989). Effects of vagal stimulation and applied acetylcholine on pacemaker potentials in the guinea-pig heart. *The Journal of Physiology*, **415**: 57-68.
- CANNON, S.C. (2006). Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain. *Annual Review of Neuroscience*, **29**: 387-415.

- CATTERALL, W.A., PEREZ-REYES, E., SNUTCH, T.P., STRIESSNIG, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, **57(4)**: 411-425.
- CASTRO, F.F., ANTILA, M.A., CROCE, J. (1995). Occupational allergy caused by urticating hair of Brazilian spider. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **95**: 1282-1285.
- CELERIER, M.L., PARIS, C., LANGE, C. (1993). Venom of an aggressive African Theraphosidae (*Scodra griseipes*): milking the venom, a study of its toxicity and its characterization. *Toxicon*, **31**: 577-590.
- CESTÈLE, S., CATTERALL, W.A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, **82**: 883-892.
- 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 venom of the theraphosid spider *Phrixotrichus auratus*. *Protein Science*, **13(5)**: 1197-1208.
- CHANG-MU, C., JEN-KUN, L., SHING-HWA, L., SHOEI-YN, L.S. (2010). Characterization of neurotoxic effects of NMDA and the novel neuroprotection by phytopolyphenols in mice. *Behavioral neuroscience*, **124**: 541-553.
- CHEN, J., DENG, M., HE, Q., MENG, E., JIANG, L., LIAO, Z., RONG, M., LIANG, S. (2008). Molecular diversity and evolution of cystine knot toxins of the tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**: 2431-2444.
- CHOI, J.T., RAUF, A. (2003). Ophthalmia nodosa secondary to tarantula hairs. *Eye (Lond)*, **17**: 433-434.
- CHONG, Y., HAYES, J.L., SOLLOD, B., WEN, S., WILSON, D.T., HAINS, P.G., HODGSON, W.C., BROADY, K.W., KING, G.F., NICHOLSON, G.M. (2007). The ω -atracotoxins: selective blockers of insect M-LVA and HVA calcium channels. *Biochemical Pharmacology*, **74**: 623-638.
- CHUANG, R.S.I., JAFFE, H., CRIBBS, L., PEREZ-REYES, E., SWARTZ, K.J. (1988). Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nature neuroscience*, **1(8)**: 668-674.
- CHUANG, Y.C., CHANG, A.Y., LIN, J.W., HSU, S.P., CHAN, S.H. (2004). Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced *status epilepticus* in the rat. *Epilepsia*, **45**: 1202-1209.
- CORZO, G., BERNARD, C., CLEMENT, H., VILLEGAS, E., BOSMANS, F., TYTGAT, J., POSSANI, L.D., DARBON, H., ALAGÓN, A. (2009). Insecticidal peptides from the therapsid spider *Brachypelma albiceps*: An NMR-based model of Ba2. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1794**: 1190-1196.

- CORZO, G., ESCOUBAS, P. (2003). Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **60**: 2409-2426.
- CORZO, G., ESCOUBAS, P., STANKIEWICZ, M., PELHATE, M., KRISTENSEN, C.P., NAKAJIMA, T. (2000). Isolation, synthesis and pharmacological characterization of δ -palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus*. *European Journal of Biochemistry*, **267(18)**: 5783-5795.
- CORZO, G., ESCOUBAS, P., VILLEGAS, E., KARBAT, I., GORDON, D., GUREVITZ, M., NAKAJIMA, T., GILLES, N. (2005). A spider toxin that induces a typical effect of scorpion α -toxins but competes with β -toxins on binding to insect sodium channels. *Biochemistry*, **44**: 1542-1549.
- CORZO, G., GILES, N., SATAKE, H., VILLEGAS, E., DAI, L., NAKAJIMA, T., HAUPT, J. (2003). Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venoms of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. *FEBS Letters*, **547**: 43-50.
- CORZO, G., VILLEGAS, E., GOMEZ-LAGUNAS, F., POSSANI, L.D., BELOKONEVA, O.S., NAKAJIMA, T. (2002). Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, **277(26)**: 23627-23637.
- CORY, J.S., HIRST, M.L., WILLIAMS, T., HAILS, R.S., GOULSON, D., GREEN, B.M., CARTY, T.M., POSSEE, R.D., CAYLEY, P.J., BISHOP, D.H.L. (1994). Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature*, **370**: 138-140.
- COSTA, S.K., HYSLOP, S., NATHAN, L.P., ZANESCO, A., BRAIN, S.D., DE NUCCI, G., ANTUNES, E. (1998). Activation by *Phoneutria nigriventer* spider venom of autonomic nerve fibers in the isolated rat heart. *European Journal of Pharmacology*, **363**: 139-146.
- COUTO, A.S., MORAES-SANTOS, T., AZEVEDO, A.D., ALMEIDA, A.P., FREIRE-MAIA, L. (1992). Effects of toxin Ts-gamma, purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom, on the isolated rat atria. *Toxicon*, **30**: 339-343.
- COX, J.J., REIMANN, F., NICHOLAS, A.K., THORNTON, G., ROBERTS, E., SPRINGELL, K., KARBANI, G., JAFRI, H., MANNAN, J., RAASHID, Y., AL-GAZALI, L., HAMAMY, H., VALENTE, E.M., GORMAN, S., WILLIAMS, R., McHALE, D.P., WOOD, J.N., GRIBBLE, F.M., WOODS, C.G. (2006). An *SCN9A* channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*, **444**: 894-898.
- CRAIK, D.J., DALY, N.L., WAINE, C. (2001). The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon*, **39**: 43-60.

- DAFFRE, S., MIRANDA, A., MIRANDA, M.T.M., BULET, P., SILVA JR, P.I., MACHADO, A., FOGAÇA, A.C., LORENZINI, D.M., PEREIRA, L.S., FÁZIO, M.A., ESTEVES, E., BURGIERMAN, M.R. (2001). Peptídeos antibióticos: peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, **23**: 48-55.
- de FIGUEIREDO, S.G., DE LIMA, M.E., NASCIMENTO CORDEIRO, M., DINIZ, C.R., PATTEN, D., HALLIWELL, R.F., GILROY, J., RICHARDSON, M. (2001). Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurones. *Toxicon*, **39**: 309-317.
- de LIMA, M.E., STANKIEWICZ, M., HAMON, A., DE FIGUEIREDO, S.G., CORDEIRO, M.N., DINIZ, C.R., MARTIN-EAUCLAIRE, M., PELHATE, M. (2002). The toxin Tx4(6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na⁺ current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3. *Journal of Insect Physiology*, **48**: 53-61.
- DENG, M., LUO, X., MENG, E., XIAO, Y., LIANG, S. (2008). Inhibition of insect calcium channels by huwentoxin-V, a neurotoxin from Chinese tarantula *Ornithoctonus huwena* venom. *European Journal of Pharmacology*, **582**: 12-16.
- DIAO, J., LIN, Y., TANG, J., LIANG, S. (2003). cDNA sequence analysis of seven peptide toxins from the spider *Selenocosmia huwena*. *Toxicon*, **42**: 715-723.
- DIEGO-GARCÍA, E., PEIGNEUR, S., WAELEKENS, E., DEBAVEYE, S., TYTGAT, J. (2010). Venom components from *Citharischius crawshayi* spider (Family Theraphosidae): exploring transcriptome, venomomics, and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**: 2799-2813.
- DIOCHOT, S., DRICI, M.D., MOINIER, D., FINK, M., LAZDUNSKI, M. (1999). Effects of phrixotoxins on the K_v4 family of potassium channels and implications for the role of I_{to1} in cardiac electrogenesis. *British Journal of Pharmacology*, **126(1)**: 251-263.
- EBERL, D.F., REN, D., FENG, G., LORENZ, L.J., VAN VACTOR, D., HALL, L.M. (1998). Genetic and developmental characterization of Dmca1D, a calcium channel α_1 subunit gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **148**: 1159-1169.
- EITAN, M., FOWLER, E., HERRMANN, R., DUVAL, A., PELHATE, M., ZLOTKIN, E., (1990). A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure, and mode of action. *Biochemistry*, **29(25)**: 5941-5947.
- ENDOU, M., POLI, E., LEVI, R. (1994). Histamine H₃-receptor signaling in the heart: possible involvement of Gi/Go proteins and N-type Ca⁺⁺ channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **269**: 221-229.

- ESCOUBAS, P., CÉLÉRIER, M.L., ROMI-LEBRUN, R., NAKAJIMA, T. (1997). Two novel peptide neurotoxins from the venom on the tarantula *Lasiodora parahybana*. *Toxicon*, **35**: 805-806.
- 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., RASH, L. (2004). Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, **43**: 555-574.
- 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.
- FATEHI, M., ROWAN, E.G., HARVEY, A.L., MOYA, E., BLAGBROUGH, I.S. (1997). Polyamine FTX-3.3 and polyamine amide sFTX-3.3 inhibit presynaptic calcium currents and acetylcholine release at mouse motor nerve terminals. *Neuropharmacology*, **36(2)**: 185-194.
- FAYYAZUDDIN, A., ZAHEER, M.A., HIESINGER, P.R., BELLEN, H.J. (2006). The nicotinic acetylcholine receptor Da7 is required for an escape behavior in *Drosophila*. *PLoS Biology*, **4(3)**: 420-431.
- FENG, G., DEAK, P., CHOPRA, M., HALL, L.M. (1995). Cloning and functional analysis of TipE, a novel membrane protein that enhances *Drosophila para* sodium channel function. *Cell*, **82**: 1001-1011.
- FERRAT, G., DARBON, H. (2005). An overview of the three dimensional structure of short spider toxins. *Toxin Reviews*, **24**: 359-381.
- FERRAT, G., BOSMANS, F., TYTGAT, J., PIMENTEL, C., CHAGOT, B., GILLES, N., NAKAJIMA, T., DARBON, H., CORZO, G. (2005). Solution structure of two insect-specific spider toxins and their pharmacological interaction with the insect voltage-gated Na⁺ channel. *Proteins*, **59**: 368-379.
- FERRY, N., EDWARDS, M.G., GATEHOUSE, J., CAPELL, T., CHRISTOU, P., GATEHOUSE, A.M.R. (2006). Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. *Transgenic Research*, **15**: 13-19.
- FIGUEIREDO, S.G., GARCIA, M.E., VALENTIM, A.C., CORDEIRO, M.N., DINIZ, C.R., RICHARDSON, M. (1995). Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon*, **33**: 83-93.

- FINNEY, D.J. (1971). Probit analysis. 3rd. Edition. London: *Cambridge University Press*.
- FLETCHER, J.I., CHAPMAN, B.E., MACKAY, J.P., HOWDEN, M.E., KING, G.F. (1997). The structure of versutoxin (δ -atracotoxin-Hv1) provides insights into the binding of site 3 neurotoxins to the voltage-gated sodium channel. *Structure*, **5**: 1525-1535.
- FLETCHER, J.I., SMITH, R., O'DONOGHUE, S.I., NILGES, M., CONNOR, M., HOWDEN, M.E.H., CHRISTIE, M.J., KING, G.F. (1997). The structure of a novel insecticidal neurotoxin, ω -atracotoxin-Hv1, from the venom of an Australian funnel web spider. *Nature Structural Biology*, **4(7)**: 559-566.
- FOELIX, R.F. (1996). Biology of spiders. 2. ed. New York: *Oxford University Press*.
- FOTOWAT, H., FAYYAZUDDIN, A., BELLEN, H.J., GABBIANI, F. (2009). A novel neuronal pathway for visually guided escape in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurophysiology*, **102**: 875-885.
- FOUCART, S., WANG, R., MOREAU, P., SAUVE, R., DE CHAMPLAIN, J., YAMAGUCHI, N., BAI, L., LU, X.R. (1994). Effects of *Buthus martensii* Karsch scorpion venom on the release of noradrenaline from *in vitro* and *in vivo* rat preparations. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **72**: 855-861.
- FRANKENHUYZEN, K. van (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, **101**: 1-16.
- GARCIA GARCIA, M.E., GARCIA MORALES, I., MATÍAS GUIU, J. (2010). Experimental models in epilepsy. *Neurología*, **25**: 181-188.
- GEORGE Jr. A.L. (2005) Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *The Journal of Clinical Investigation*, **115**: 1990-1999.
- GEORGESCU, P., ZHANG, H. (2010). An impulsively controlled predator-pest model with disease in the pest. *Nonlinear Analysis: Real World Applications*, **11**: 270-287.
- GERSHBURG, E., STOCKHOLM, D., FROY, O., RASHI, S., GUREVITZ, M., CHEJANOVSKY, N. (1998). Baculovirus-mediated expression of a scorpion depressant toxin improves the insecticidal efficacy achieved with excitatory toxins. *FEBS Letters*, **422**: 132-136.
- GILLES, N., HARRISON, G., KARBAT, I., GUREVITZ, M., NICHOLSON, G.M., GORDON, D. (2002). Variations in receptor site-3 on rat brain and insect sodium channels highlighted by binding of a funnel-web spider δ -atracotoxin. *European Journal of Biochemistry*, **269(5)**: 1500-1510.
- GOGAS, K.R. (2006). Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists. *Current Opinion in Pharmacology*, **6**: 68-74.

- GORCZYCA, M., HALL, J.C. (1984). Identification of a cholinergic synapse in the giant fiber pathway of *Drosophila* using conditional mutations of acetylcholine synthesis. *Journal of Neurogenetics*, **1**: 289-313.
- GRATZ, N.G. (1999). Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annual Review of Entomology*, **44**: 51-75.
- GRAUSO, M., REENAN, R.A., CULETTO, E., SATTELLE, D.B. (2002). Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, *Da5*, *Da6* and *Da7*, in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing. *Genetics*, **160**: 1519-1533.
- GRIBKOFF, V.K. (2006). The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **17**: 555-564.
- GRISHIN, E.V., VOLKOVA, T.M., ARSENIIEV, A.S., RESHETOVA, O.S., ONOPRIENKO, V.V., MAGAZNIK, L.G., ANTONOV, S.M., FEDOROVA, I.M. (1986). Structural-functional characteristics of argiopine-an ion channel blocker from the venom of the spider *Argiope lobata*. *Bioorganicheskaya khimiya*, **12(8)**: 1121-1124.
- GU, H., O'DOWD, D.K. (2006). Cholinergic synaptic transmission in adult *Drosophila* Kenyon cells *in situ*. *Journal of Neuroscience*, **26**: 265-272.
- GUETTE, C., LEGROS, C., TOURNOIS, G., GOYFFON, M., CÉLÉRIER, M.L. (2006). Peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of the *Lasiodora parahybana* tarantula venom gland. *Toxicon*, **47(6)**: 640-649.
- GUNNING, S.J., MAGGIO, F., WINDLEY, M.J., VALENZUELA, S.M., KING, G.F., NICHOLSON, G.M. (2008). The Janus-faced atracotoxins are specific blockers of invertebrate K_{Ca} channels. *FEBS Journal*, **275**: 4045-4059.
- GURR, G.M., KVEDARAS, O.L. (2010). Synergizing biological control: Scope for sterile insect technique, induced plant defenses and cultural techniques to enhance natural enemy impact. *Biological Control*, **52**: 198-207.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. (2006). *Tratado de fisiologia médica*. Ed. 11. São Paulo: Elsevier. 1115 p.
- HANSEN, J.D., HEIDT, M.L., NEVEN, L.G., MIELKE, E.A., BAI, J., CHEN, P.M., SPOTTS, R.A. (2006). Effect of high-pressure hot-water washing treatment on fruit quality, insects, and disease in apples and pears: Part III. Use of silicone-based materials and mechanical methods to eliminate surface pests. *Postharvest Biology and Technology*, **40(3)**: 221-229.

- HAUPT, J. (2003). The Mesothelae – a monograph of an exceptional group of spiders (Araneae: Mesothelae). *Zoologica (Stuttgart)*, **154**: 1-100.
- HAUPT, J. (2005). Taxonomy of spiders. *Toxin reviews*, **24**: 249-256.
- HERNÁNDEZ-CAMPUZANO, B., SUÁREZ, R., LINA, L., HERNÁNDEZ, V., VILLEGAS, E., CORZO, G., ITURRIAGA, G. (2009). Expression of a spider venom peptide in transgenic tobacco confers insect resistance. *Toxicon*, **53**: 122-128.
- HERZIG, V., HODGSON, W.C. (2009). Intersexual variations in the pharmacological properties of *Coremiocnemis tropix* (Araneae, Theraphosidae) spider venom. *Toxicon*, **53**: 196-205.
- HERZIG, V., WOOD, D.L.A., NEWELL, F., CHAUMEIL, P.A., KAAS, Q., BINFORD, G.J., NICHOLSON, G.M., GORSE, D., KING, G.F. (2011). ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic Acids Research*, **39**: 653-657.
- HODGKIN, A.L., HUXLEY A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to induction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, **117**: 500-544.
- HORNI, A., WEICKMANN, D., HESSE, M. (2001). The main products of the low molecular mass fraction in the venom of the spider *Latrodectus menavodi*. *Toxicon*, **39**: 425-428.
- HUGHES, P.R., WOOD, H.A., BREEN, J.P., SIMPSON, S.F., DUGGAN, A.J., DYBAS, J.A. (1997). Enhanced bioactivity of recombinant baculoviruses expressing insect-specific spider toxins in lepidopteran crop pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, **69**: 112-118.
- HUNG, J.C., PECKER, C.O., WILD, N.J. (1996). "Tarantula eyes". *Archives of Disease in Childhood*, **75**: 462-463.
- INCEOGLU, A.B., KAMITA, S.G., HINTON, A.C., HUANG, Q., SEVERSON, T.F., KANG, K., HAMMOCK, B.D. (2001). Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Management Science*, **57**: 981-987.
- INCEOGLU, B., LANGO, J., JING, J., CHEN, L., DOYMAZ, F., PESSAH, I.N., HAMMOCK, B.D. (2003). One scorpion, two venoms: pre venom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**: 922-927.
- ISBISTER, G.K., SEYMOUR, J.E., GRAY, M.R., RAVEN, R.J. (2003). Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. *Toxicon*, **41**: 519-524.
- ISBISTER, G.K., WHITE, J. (2004). Clinical consequences of spider bite: recent advances in our understanding. *Toxicon*, **43**: 477-492.

- ISMAIL, M., ABD-ELSALAM, M.A., al-AHAIDIB, M.S. (1994). *Androctonus crassicauda* (Olivier), a dangerous and unduly neglected scorpion--I. Pharmacological and clinical studies. *Toxicon*, **32**: 1599-1618.
- JACKSON, H., PARKS, T.N. (1989). Spider toxins: recent applications in neurobiology. *Annual Review of Neuroscience*, **12**: 405-414.
- JAN, L.Y., JAN, Y.N. (1976). L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, **262**: 215-236.
- JOHNSON, J.H., BLOOMQUIST, J.R., KRAPCHO, K.J., KRAL, R.M.J., TROVATO, R., EPPLER, K.G., MORGAN, T.K., DELMAR, E.G. (1998). Novel insecticidal peptides from *Tegenaria agrestis* spider venom may have a direct effect on the insect central nervous system. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **38(1)**: 19-31.
- JUHNG, K.N., KOKATE, T.G., YAMAGUCHI, S., KIM, B.Y., ROGOWSKI, R.S., BLAUSTEIN, M.P., ROGAWSKI, M.A. (1999). Induction of seizures by the potent K⁺ channel-blocking scorpion venom peptide toxins tityustoxin- α and pandinustoxin- α . *Epilepsy Research*, **34**: 177-186.
- KAILA, K., VOIPIO, J. (1987). Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature*, **330**: 163-165.
- KAISER, I.I., GRIFFIN, P.R., AIRD, S.D., HUDIBURG, S., SHABANOWITZ, J., FRANCIS, B., JOHN, T.R., HUNT, D.F., ODELL, G.V. (1994). Primary structures of two proteins from the venom of the Mexican red knee tarantula (*Brachypelma smithii*). *Toxicon*, **32(9)**: 1083-1093.
- KALAPOTHAKIS, E., KUSHMERICK, C., GUSMAO, D.R., FAVARON, G.O., FERREIRA, A.J., GOMEZ, M.V., PINTO de ALMEIDA, A. (2003). Effects of the venom of a Mygalomorph spider (*Lasiodora* sp.) on the isolated rat heart. *Toxicon*, **41**: 23-28.
- KAWASAKI, F., COLLINS, S.C., ORDWAY, R.W. (2002). Synaptic calcium-channel function in *Drosophila*: analysis and transformation rescue of temperature-sensitive paralytic and lethal mutations of cacophony. *Journal of Neuroscience*, **22**: 5856-5864.
- KHAN, S.A., ZAFAR, Y., BRIDDON, R.W., MALIK, K.A., MUKHTAR, Z. (2006). Spider venom toxin protects plants from insect attack. *Transgenic Research*, **15**: 349-357.
- KING, G.F. (2007). Modulation of insect Ca_v channels by peptidic spider toxins. *Toxicon*, **49**: 513-530.
- KING, G.F., GENTZ, M.C., ESCOUBAS, P., NICHOLSON, G.M. (2008). A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon*, **52**: 264-276.

- KING, G.F., McFARLAND, B.S., NICHOLSON, G.M., GUNNING, S.J. Insecticidal polynucleotides and methods of use thereof. *United States Patent Application 7,880,060*, 01 fev. 2011.
- KING, G.F., SOLLOD, D.L. Insecticidal compounds and methods for selection thereof. *United States Patent Application 7,951,929*, 31 mai. 2011.
- KORSZNIAK, N.V., STORY, D.F. (1994). Effects of the venom of the theridiid spider, *Steatoda capensis* Hann, on autonomic transmission in rat isolated atria and caudal artery. *Toxicon*, **32**: 85-96.
- KOZLOV, S., MALYAVKA, A., McCUTCHEN, B., LU, A., SCHEPERS, E., HERRMANN, R., GRISHIN, E. (2005). A novel strategy for the identification of toxinlike structures in spider venom. *Proteins*, **59(1)**: 131-140.
- KOZLOV, S.A., VASSILEVSKI, A.A., FEOFANOV, A.V., SUROVOY, A.Y., KARPUNIN, D.V., GRISHIN, E.V. (2006). Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**: 20983-20992.
- KUHN-NENTWIG, L., SCHALLER, J., NENTWIG, W. (1994). Purification of toxic peptides and the amino acid sequence of CSTX-1 from the multicomponent venom of *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Toxicon*, **32**: 287-302.
- LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., McGETTIGAN, P.A., McWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**: 2947-2948.
- LI, D., XIAO, Y., HU, W., XIE, J., BOSMANS, F., TYTGAT, J., LIANG, S. (2003). Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. *FEBS Letters*, **555**: 616-622.
- LIANG, S. (2004). An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)]. *Toxicon*, **43**: 575-585.
- LITTLETON, J.T., GANETZKY, B. (2000). Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron*, **26**: 35-43.
- LIU, M., NAKAZAMA, K., INQUE, K., OHNO, Y. (1997). Potent and voltage-dependent block by philanthotoxin-343 of neuronal nicotinic receptor/channels in PC12 cells. *British Journal of Pharmacology*, **122**: 379-385.

- LI-SMERIN Y., SWARTZ K.J. (1998) Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca²⁺ and K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 8585-8589.
- LOUGHNEY, K., KREBER, R., GANETZKY, B. (1989). Molecular analysis of the *para* locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell*, **58(6)**: 1143-1154.
- LOURENÇO, W.R. (1978). Notas sobre a biologia de *Acanthoscurria atrox* Vellard 1924 (Araneae, Theraphosidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **38(1)**: 161-164.
- LUCAS, S.M. (2003) Aranhas de interesse médico no Brasil. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O., WEN, F.H., SANT'ANA MÁLAQUE, C.M., HADDAD, V. (Eds). Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: *Sarvier Editora*, pp. 141- 149.
- LUCAS, S.M., DA SILVA JUNIOR, P.I., BERTANI, R., CARDOSO, J.L. (1994). Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of São Paulo, Brazil. *Toxicon*, **32**: 1211-1215.
- LUCAS, S.M., PAULA, F.S., GONZALEZ FILHO, H.M.O., BRESOVIT, A.D. (2010). Redescription and new distribution records of *Acanthoscurria paulensis* (Araneae: Mygalomorphae: Theraphosidae). *Zoologia*, **27(4)**: 563-568.
- LUKOMSKAYA, N.Y., RUKOYATKINA, N.I., GORBUNOVA, L.V., GMIRO, V.E., BOL'SHAKOV, K.V., MAGAZANIK, L.G. (2004). Comparison of the anticonvulsive activities of organic mono- and dications with their abilities to inhibit NMDA and AMPA glutamate receptors. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, **34**: 181-187.
- MAFRA, R.A., FIGUEIREDO, S.G., DINIZ, C.R., CORDEIRO, M.N., CRUZ, J.D., de LIMA, M.E. (1999). PhTx4, a new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom, inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes. *Brain Research*, **831**: 297-300.
- MAGGIO, F., KING, G.F. (2002). Scanning mutagenesis of a Janus-faced atracotoxin reveals a bipartite surface patch that is essential for neurotoxic function. *The Journal of Biological Chemistry*, **277(25)**: 22806-22813.
- MARGANELLA, C., BRUNO, V., MATRISCIANO, F., REALE, C., NICOLETTI, F., MELCHIORRI, D. (2005). Comparative effects of levobupivacaine and racemic bupivacaine on excitotoxic neuronal death in culture and N-methyl-D-aspartate-induced seizures in mice. *European Journal of Pharmacology*, **518**: 111-115.
- MARRUS, S.B., PORTMAN, S.L., ALLEN, M.J., MOFFAT, K.G., DIANTONIO, A. (2004). Differential localization of glutamate receptor subunits at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience*, **24**: 1406-1415.

- MATTHEWS, E.A., BEE, L.A., STEPHENS, G.J., DICKENSON, A.H. (2007). The Ca_v2.3 calcium channel antagonist SNX-482 reduces dorsal horn neuronal responses in a rat model of chronic neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience*, **25(12)**: 3561-3569.
- MCCORMICK, K.D., MEINWALD, J. (1993). Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. *Journal of Chemical Ecology*, **19(10)**: 2411-1451.
- MCCUTCHEN, B.F., CHOUDARY, P.V., CRENSHAW, R., MADDOX, D., KAMITA, S.G., PALEKAR, N., VOLRATH, S., FOWLER, E., HAMMOCK, B.D., MAEDA, S. (1991). Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: potential for pest control. *Biotechnology*, **9**: 848-852.
- MCDONOUGH, S.I., LAMPE, R.A., KEITH, R.A., BEAN, B.P. (1997). Voltage-dependent inhibition of N- and P-type calcium channels by the peptide toxin omega-grammotoxin-SIA. *Molecular Pharmacology*, **52**: 1095-1104.
- MCINTOSH, J.M., SANTOS, A.D., OLIVERA, B.M. (1999). *Conus* peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annual Review of Biochemistry*, **68**: 59-88.
- MEJIA, M., HEGHINIAN, M.D., BUSCH, A., ARMISHAW, C.J., MARI, F., GODENSCHWEGE, T.A. (2010). A novel approach for *in vivo* screening of toxins using the *Drosophila* Giant Fiber circuit. *Toxicon*, **56**: 1398-1407.
- MELLO-LEITÃO, C.F. de (1923). Theraphosideas do Brasil. In: LUCAS, S.M., PAULA, F.S., GONZALEZ FILHO, H.M.O., BRESCOVIT, A.D. (2010). Redescription and new distribution records of *Acanthoscurria paulensis* (Araneae: Mygalomorphae: Theraphosidae). *Zoologia*, **27(4)**: 563-568.
- MELLOR, I.R., USHERWOOD, P.N.R. (2004). Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins. *Toxicon*, **43**: 493-508.
- MIDDLETON R.E., WARREN V.A., KRAUS R.L., HWANG J.C., LIU C.J., DAI G., BROCHU, R.M., KOHLER, M.G., GAO, Y.D., GARSKY, V.M., BOGUSKY, M.J., MEHL, J.T., COHEN, C.J., SMITH, M.M. (2002) Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. *Biochemistry*, **41(50)**: 14734-14747.
- MILJANICH, G.P., RAMACHANDRAN, J. (1995). Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function and therapeutic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **35**: 707-734.
- MINTZ, I.M., ADAMS, M.E., BEAN, B.P. (1992a). P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron*, **9**: 85-95.

- MINTZ, I.M., VENEMA, V.J., SWIDEREK, K.M., LEE, T.D., BEAN, B.P., ADAMS, M.E. (1992b). P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Aga-IVA. *Nature*, **355**: 827-829.
- MOLDERINGS, G.J., FROLICH, D., LIKUNGU, J., GOTHERT, M. (1996). Inhibition of noradrenaline release via presynaptic 5-HT_{1D α} receptors in human atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **353**: 272-280.
- MOSCARDI, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, **44**: 257-289.
- MOSCARDI, F., SOUZA, M.L. (2002). Baculovirus para o controle de pragas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, **24**: 22-29.
- MOSER, B., BECNEL, J., WHITE, S., AFONSO, C., KUTISH, G., SHANKER, S., ALMIRA, E. (2001). Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family Baculoviridae. *Journal of General Virology*, **82**: 283-297.
- MOTTA, P.C., BERTANI, R. Registros de aranhas (Araneae: Araneidae, Theraphosidae) e escorpiões (Scorpiones) do Cerrado. In: DINIZ, I.R., MARINHO-FILHO, J., MACHADO, R.B., CAVALCANTI, R.B., (Org.) (2010). Cerrado: conhecimento quantitativo como subsídio para as ações de conservação. Brasília: Thesaurus. Cap. 4, p. 149-185.
- MOURÃO, C.B.F., OLIVEIRA, N.B., OLIVEIRA, L.F.B., MORTARI, M.R., SCHWARTZ, C.A., SCHWARTZ, E.F. (2009). Neuroactive component from *Acanthoscurria atrox* (Theraphosidae) spider venom. In: *Anais do XVI World Congress of the IST and X Congresso da SBTx*, Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco.
- MOURÃO, C.B.F., PIRES JUNIOR, O.R., SILVA, L.P., BLOCK JR, C., SCHWARTZ, E.F. (2008). Caracterização química de peptídeos presentes na peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria atrox*. In: *Anais do XIV Congresso de Iniciação Científica da UnB & 5º Congresso de Iniciação Científica do DF*. Brasília, DF.
- MULLE, C., SAILER, A., PEREZ-OTANO, I., DICKINSON-ANSON, H., CASTILLO, P.E., BUREAU, I., MARON, C., GAGE, F.H., MANN, J.R., BETTLER, B., HEINEMANN, S.F. (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature*, **392**: 601-605.
- NAGAI, K., YANO, E. (2000). Predation by *Orius sauteri* (Poppius) (Heteroptera: Anthocoridae) on *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae): Functional response and selective predation. *Applied Entomology and Zoology*, **35(4)**: 565-574.
- NAIR, P.P., KALITA, J., MISRA, U.K. (2011). *Status epilepticus*: why, what, and how. *Journal of Postgraduate Medicine*, **57**: 242-252.

- NAYLOR, D.E., LIU, H., WASTERLAIN, C.G. (2005). Trafficking of GABA_A receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in *status epilepticus*. *Journal of Neuroscience*, **25**: 7724-7733.
- NEWCOMB, R., SZOKE, B., PALMA, A., WANG, G., CHEN, X., HOPKINS, W., CONG, R., MILLER, J., URGE, L., TARCZY-HORNOCH, K., LOO, J.A., DOOLEY, D.J., NADASDI, L., TSIEN, R.W., LEMOS, J., MILJANICH, G. (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry*, **37**: 15353-15362.
- NICHOLSON, G.M. (2007). Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon*, **49**: 490-512.
- NICHOLSON, G.M., LITTLE, M.J., TYLER, M., NARAHASHI, T. (1996). Selective alteration of sodium channel gating by Australian funnel-web spider toxins. *Toxicon*, **34**: 1443-1453.
- NIKONENKO, I., BANCILA, M., BLOC, A., MULLER, D., BIJLENGA, P. (2005). Inhibition of T-type calcium channels protects neurons from delayed ischemia-induced damage. *Molecular Pharmacology*, **68**: 84-89.
- NORTON, R.S., PALLAGHY, P.K. (1998). The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon*, **36(11)**: 1573-1583.
- OERKE, E.C., DEHNE, H.W. (2004). Safeguarding production - losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, **23**: 275-285.
- OLIVEIRA, L.C., de LIMA, M.E., PIMENTA, A.M., MANSUELLE, P., ROCHAT, H., CORDEIRO, M.N., RICHARDSON, M., FIGUEIREDO, S.G. (2003). PnTx4-3, a new insect toxin from *Phoneutria nigriventer* venom elicits the glutamate uptake inhibition exhibited by PhTx4 toxic fraction. *Toxicon*, **42**: 793-800.
- OLIVEIRA, N.B., OLIVEIRA, L.F.B., MOURÃO, C.B.F., MORTARI, R.M., SCHWARTZ, E.F., SCHWARTZ, C.A. (2009). Anticonvulsant effect of a compound isolated from the venom of the spider *Acanthoscurria atrox* (Theraphosidae). In: *Anais do XVI World Congress of the IST and X Congresso da SBTx*, Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco.
- OSBORNE, R.H. (1996). Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, **69**: 117-142.
- OZAWA, S., KAMIYA, H., TSUZUKI, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, **54**: 581-618.

- PANCHIN, Y., KELMANSON, I., MATZ, M., LUKYANOV, K., USMAN, N., LUKYANOV, S. (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Current Biology*, **10**: R473-474.
- PAYANDEH, J., SCHEUER, T., ZHENG, N., CATTERALL, W.A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, **475**: 353-358.
- PENAFORTE, C.L., PRADO, V.F., PRADO, M.A., ROMANO-SILVA, M.A., GUIMARÃES, P.E., DE MARCO, L., GOMEZ, M.V., KALAPOTHAKIS, E. (2000). Molecular cloning of cDNAs encoding insecticidal neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, **38**: 1443-1449.
- PENG, K., SHU, Q., LIU, Z., LIANG, S. (2002). Function and solution structure of Huwentoxin-IV, a potent neuronal tetrodotoxin (TTX)-sensitive sodium channel antagonist from Chinese Bird spider *Selenocosmia huwena*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 47564-47571
- PETERSEN, S.A., FETTER, R.D., NOORDERMEER, J.N., GOODMAN, C.S., DIANTONIO, A. (1997). Genetic analysis of glutamate receptors in *Drosophila* reveals a retrograde signal regulating presynaptic transmitter release. *Neuron*, **19**: 1237-1248.
- PHELAN, P., GOULDING, L.A., TAM, J.L., ALLEN, M.J., DAWBER, R.J., DAVIES, J.A., BACON, J.P. (2008). Molecular mechanism of rectification at identified electrical synapses in the *Drosophila* giant fiber system. *Current Biology*, **18**: 1955-1960.
- PHELAN, P., STEBBINGS, L.A., BAINES, R.A., BACON, J.P., DAVIES, J.A., FORD, C. (1998). *Drosophila Shaking-B* protein forms gap junctions in paired *Xenopus* oocytes. *Nature*, **391**: 181-184.
- PISER, T.M., LAMPE, R.A., KEITH, R.A., THAYER, S.A. (1995). Omega-grammotoxin SIA blocks multiple, voltage-gated, Ca²⁺ channel subtypes in cultured rat hippocampal neurons, *Molecular Pharmacology*, **48(1)**: 131-139.
- PLATNICK, N.I. (2011). The world spider catalog, version 12.0. *American Museum of Natural History*. Disponível online em: < <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>. DOI: 10.5531/db.iz.0001>. Acesso em: 17/01/2012.
- PRIEST, B.T., BLUMENTHAL, K.M., SMITH, J.J., WARREN, V.A., SMITH, M.M. (2007). ProTx-I and ProTx-II: Gating modifiers of voltage-gated sodium channels. *Toxicon*, **49(2)**: 194-201.
- PRIESTLEY, T., WOODRUFF, G.N., KEMP, J.A. (1989). Antagonism of responses to excitatory amino acids on rat cortical neurones by the spider toxin, argiotoxin636. *British Journal of Pharmacology*, **97**: 1315-1323.
- PRIKHOD'KO, G.G., POPHAM, H.J.R., FELCETTO, T.J., OSTLIND, D.A., WARREN, V.A., SMITH, M.M., GARSKY, V.M., WARMKE, J.W., COHEN, C.J., MILLER, L.K. (1998). Effects of simultaneous

- expression of two sodium channel toxin genes on the properties of baculoviruses as biopesticides. *Biological Control*, **12**: 66-78.
- PRIKHOD'KO, G.G., ROBSON, M., WARMKE, J.W., COHEN, C.J., SMITH, M.M., WANG, P., WARREN, V., KACZOROWSKI, G., VAN DER PLOEG, L.H.T., MILLER, L.K. (1996). Properties of three baculovirus expressing genes that encode insect-selective toxins: μ -Aga-IV, As II, and Sh I. *Biological Control*, **7**: 236-244.
- QIN, G., SCHWARZ, T., KITTEL, R.J., SCHMID, A., RASSE, T.M., KAPPEI, D., PONIMASKIN, E., HECKMANN, M., SIGRIST, S.J. (2005). Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, **25**: 3209-3218.
- QUINTANA, P., ALBERI, S., HAKKOUM, D., MULLER, D. (2006). Glutamate receptor changes associated with transient anoxia/hypoglycaemia in hippocampal slice cultures. *European Journal of Neuroscience*, **23(4)**: 975-983.
- QUISTAD, G.B., SKINNER, W.S. (1994). Isolation and sequencing of insecticidal peptides from the primitive hunting spider, *Plectreurys tristis* (Simon). *Journal of Biological Chemistry*, **269**: 11098-11101.
- QUISTAD, G.B., REUTER, C.C., SKINNER, W.S., DENNIS, P.A., SUWANRUMPHA, S., FU, E.W. (1991). Paralytic and insecticidal toxins from the funnel web spider, *Hololena curta*. *Toxicon*, **29**: 329-336.
- RAOL, Y.H., BROOKS-KAYAL, A.R. (2012). Experimental models of seizures and epilepsies. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, **105**: 57-82.
- RASH, L.D., HODGSON, W.C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, **40**: 225-254.
- REGEV, A., RIVKIN, H., INCEOGLU, B., GERSHBURG, E., HAMMOCK, B.D., GUREVITZ, M., CHEJANOVSKY, N. (2003). Further enhancement of baculovirus insecticidal efficacy with scorpion toxins that interact cooperatively. *FEBS Letters*, **537**: 106-110.
- REGO, S.C. (2010). Caracterização química e biológica de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira *Nhandu coloratovillosus* (Smidth, 1998). Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília.
- RICHARDS, A., MATTHEWS, M., CHRISTIAN, P. (1998). Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides. *Annual Review of Entomology*, **43**: 493-517.

- RIECKHOF, G.E., YOSHIHARA, M., GUAN, Z., LITTLETON, J.T. (2003). Presynaptic N-type calcium channels regulate synaptic growth. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 41099-41108.
- RODRIGUES, J.C.A. (2009). Morfologia e comportamento reprodutivo de *Acanthoscurria atrox* Vellard 1924 (Araneae:Theraphosidae). Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília.
- ROHL, C.A., BOECKMAN, F.A., BAKER, C., SCHEUER, T., CATTERALL, W.A., KLEVIT, R.E. (1999). Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry*, **38**: 855-861.
- ROHRMANN, G.F. (2011). Baculovirus Molecular Biology. Baculoviruses as insecticides: three examples. 2. ed. Bethesda: *National Center for Biotechnology Information*.
- ROWAN, E.G., VATANPOUR, H., FURMAN, B.L., HARVEY, A.L., TANIRA, M.O., GOPALAKRISHNAKONE, P. (1992). The effects of Indian red scorpion *Buthus tamulus* venom *in vivo* and *in vitro*. *Toxicon*, **30**: 1157-1164.
- 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.
- SAVEL-NIEMANN, A. (1989). Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multicomponent system. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, **370**: 485-498.
- SCHOEPFER, R., LUTHER, M., LINDSTROM, J. (1988). The human medulloblastoma cell line TE671 expresses a muscle-like acetylcholine receptor. Cloning of the α -subunit cDNA. *FEBS Letters*, **226**: 235-240.
- SCHROEDER, F.C., TAGGI, A.E., GRONQUIST, M., MALIK, R.U., GRANT, J.B., EISNER, T., MEINWALD, J. (2008). NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105(38)**: 14283-14287.
- SCHUSTER, C.M., ULTSCH, A., SCHLOSS, P., COX, J.A., SCHMITT, B., BETZ, H. (1991). Molecular cloning of an invertebrate glutamate receptor subunit expressed in *Drosophila* muscle. *Science*, **254**: 112-114.
- SHAI, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1462**: 55-70.

- SHETH, H.G., PACHECO, P., SALLAM, A., LIGHTMAN, S. (2009). Pole to pole intraocular transit of tarantula hairs-an intriguing cause of red eye. *Case Reports in Medicine*, 159097.
- SHEUMACK, D.D., CLAASSENS, R., WHITELEY, N.M., HOWDEN, M.E.H. (1985). Complete amino acid sequence of a new type of lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax robustus*. *FEBS Letters*, **181**: 154-156.
- SHU, Q., HUANG, R., LIANG, S. (2001). Assignment of the disulfide bonds of huwentoxin-II by Edman degradation sequencing and stepwise thiol modification. *European Journal of Biochemistry*, **268**: 2301-2307.
- SHU, Q., LU, S.Y., GU, X.C., LIANG, S.P. (2002). The structure of spider toxin huwentoxin-II with unique disulfide linkage: evidence for structural evolution. *Protein Science*, **11**: 245-252.
- SHU, Q., LIANG, S.P. (1999). Purification and characterization of huwentoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *Journal of Peptide Research*, **53**: 486-491.
- SIDACH, S.S., MINTZ, I.M. (2002). Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels. *The Journal of Neuroscience*, **22(6)**: 2023-2034.
- SILVA-Jr, P.I., DAFFRE, P., BULET, P., (2000). Isolation and 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. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 33464-33470.
- SILVEIRA, N.P., MORAES-SANTOS, T., AZEVEDO, A.D., FREIRE-MAIA, L. (1991). Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and one of its purified toxins (toxin gamma) on the isolated guinea-pig heart. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, **98**: 329-336.
- SKERRA, A. (2000). Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*, **13**: 167-187.
- SKINNER, W.S., ADAMS, M.E., QUISTAD, G.B., KATAOKA, H., CESARIN, B.J., ENDERLIN, F.E., SCHOOLEY, D.A. (1989). Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Journal of Biological Chemistry*, **264**: 2150-2155.
- SKINNER, W.S., DENNIS, P.A., LUI, A., CARNEY, R.L., QUISTAD, G.B. (1990). Chemical characterization of acylpoliamine toxins from venom of a trap-door spider and two tarantulas. *Toxicon*, **28(5)**: 541-546.

- SMITH, J.J., HILL, J.M., LITTLE, M.J., NICHOLSON, G.M., KING, G.F., ALEWOOD, P.F. (2011). Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**: 10478-10483.
- SODERLUND, D.M., KNIPPLE, D.C. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **33**: 563-577.
- SOLETTI, R.C., Del BARRIO, L., DAFFRE, S., MIRANDA, A., BORGES, H.L., MOURA-NETO, V., LOPEZ, M.G., GABILAN, N.H. (2010). Peptide gomesin triggers cell death through L-type channel calcium influx, MAPK/ERK, PKC and PI3K signaling and generation of reactive oxygen species. *Chemico-Biological Interactions*, **186**: 135-143.
- STALEY, K.J., SOLDI, B.L., PROCTOR, W.R. (1995). Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science*, **269**: 977-981.
- STAPLETON, A., BLANKENSHIP, D.T., ACKERMANN, B.L., CHEN, T.M., GORDER, G.W., MANLEY, G.D., PALFREYMAN, M.G., COUTANT, J.E., CARDIN, A.D. (1990). Curtatoxins: Neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from the funnel-web spider *Hololena curta*. *Journal of Biological Chemistry*, **265**: 2054-2059.
- STEVENS, M., PEIGNEUR, S., TYTGAT, J. (2011). Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Frontiers in Pharmacology*, **2**: 71.
- STEWART, L.M.D., HIRST, M., FERBER, M.L., MERRYWEATHER, A.T., CAYLEY, P.A., POSSEE, R.D. (1991). Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature*, **352**: 85-88.
- STOSCHECK, C.M. Quantification of protein. In: DEUTSCHER, M.P. (Ed.) (1990). *Methods in Enzymology*, New York: Academic Press Inc., Vol. 182, p. 50-68.
- STRØMGGAARD, K., JENSEN, L.S., VOGENSEN, S.B. (2005). Polyamine toxins: development of selective ligands for ionotropic receptors. *Toxicon*, **45**: 249-254.
- STRØMGGAARD, K., MELLOR, I. (2004). AMPA receptor ligands: synthetic and pharmacological studies of polyamines and polyamine toxins. *Medicinal Research Reviews*, **24**: 589-620
- SUCKAU, D., RESEMANN, A., SCHUERENBERG, M., HUFNAGEL, P., FRANZEN, J., HOLLE, A. (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **376**: 952-965.

- SUN, X., CHEN, X., ZHANG, Z., WANG, H., BIANCHI, F.J.J.A., PENG, H., VLAK, J.M., HU, Z. (2002). Bollworm responses to release of genetically modified *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedroviruses in cotton. *Journal of Invertebrate Pathology*, **81**: 63-69.
- SWARTZ, K.J. (2007). Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon*, **49**: 213-230.
- 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.
- SZEWCZYK, B., HOYOS-CARVAJAL, L., PALUSZEK, M., SKRZECZ, I., LOBO de SOUZA, M. (2006). Baculoviruses – re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*, **24**: 143-160.
- TAN, J., LIU, Z., WANG, R., HUANG, Z.Y., CHEN, A.C., GUREVITZ, M., DONG, K. (2005). Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding. *Molecular Pharmacology*, **67**: 513-522.
- TANOUE, M.A., WYMAN, R.J. (1980). Motor outputs of giant nerve fiber in *Drosophila*. *Journal of Neurophysiology*, **44**: 405-421.
- TAKAOKA, M., NAKAJIMA, S., SAKAE, H., NAKAMURA, T., TOHMA, Y., SHIONO, S., TABUSE, H. (2001). [Tarantulas bite: two case reports of finger bite from *Haplopelma lividum*]. *Chudoku Kenkyu*, **14**: 247-250.
- TEDFORD, H.W., SOLLOD, B.L., MAGGIO, F., KING, G.F. (2004). Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. *Toxicon*, **43**: 601-618.
- TEJEIRO, J., GÓMEZ SERENO, B. (2003). *Status epilepticus*. *Revista de Neurologia*, **36**: 661-679.
- THOMAS, J.B., WYMAN, R.J. (1984). Mutations altering synaptic connectivity between identified neurons in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, **4**: 530-538.
- TRIMARCHI, J.R., SCHNEIDERMAN, A.M. (1995a). Flight initiations in *Drosophila melanogaster* are mediated by several distinct motor patterns. *Journal of Comparative Physiology A*, **176**: 355-364.
- TRIMARCHI, J.R., SCHNEIDERMAN, A.M. (1995b). Initiation of flight in the unrestrained fly, *Drosophila melanogaster*. *Journal of Zoology*, **235**: 211–222.
- VASSILEVSKI, A.A., KOZLOV, S.A., GRISHIN, E.V. (2009). Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry (Moscow)*, **74(13)**: 1505-1534.
- VASSILEVSKI, A.A., KOZLOV, S.A., SAMSONOVA, O.V., EGOROVA, N.S., KARPUNIN, D.V., PLUZHNIKOV, K.A., FEOFANOV, A.V., GRISHIN, E.V. (2008). Cyto-insectotoxins, a novel class of cytolytic and insecticidal peptides from spider venom. *Biochemical Journal*, **411(3)**: 687-696.

- VIEIRA, A.L.G., MOURA, M.B., BABÁ, E.H., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C., KALAPOTHAKIS, E., CASTRO, I.M. (2004). Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiadora* sp. *Toxicon*, **44(8)**: 949-952.
- VILLEGAS, E., CORZO, G. (2005). Pore forming peptides from spiders. *Toxin Reviews*, **24**: 347-350.
- VITAL BRAZIL, O., LEITE, G.B., FONTANA, M.D. (1988). Modo de ação da peçonha da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaia. *Ciência e Cultura (São Paulo)*, **40**: 181-185.
- VIZZOTTO, C.S. (2009). Isolamento e caracterização de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira *Lasiadora* sp. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília.
- 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.
- WANG, X., SMITH, R., FLETCHER, J.I., WILSON, H., WOOD, C.J., HOWDEN, M.E., KING, G.F. (1999). Structure-function studies of ω -atracotoxin, a potent antagonist of insect voltage-gated calcium channels. *European Journal of Biochemistry*, **264**: 488-494.
- WANG, X.H., CONNOR, M., WILSON, D., WILSON, H.I., NICHOLSON, G.M., SMITH, R., SHAW, D., MACKAY, J.P., ALEWOOD, P.F., CHRISTIE, M.J., KING, G.F. (2001). Discovery and structure of a potent and highly specific blocker of insect calcium channels. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 40306-40312.
- WARMKE, J.W., REENAN, R.A.G., WANG, P., QIAN, S., ARENA, J.P., WANG, J., WUNDERLER, D., LIU, K., KACZOROWSKI, G.J., VAN DER PLOEG, L.H., GANETZKY, B., COHEN, C.J. (1997). Functional expression of *Drosophila para* sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. *The Journal of General Physiology*, **110**: 119-133.
- WASTERLAIN, C.G., FUJIKAWA, D.G., PENIX, L., SANKAR, R. (1993). Pathophysiological mechanisms of brain damage from *status epilepticus*. *Epilepsia*, **34(1)**: S37-53.
- WATKINS, J.C., JANE, D.E. (2006). The glutamate story. *British Journal of Pharmacology*, **147**:100-108.
- WICHER, D., PENZLIN, H. (1997). Ca^{2+} currents in central insect neurons: electrophysiological and pharmacological properties. *Journal of Neurophysiology*, **77(1)**: 186-199.
- WINDLEY, M.J., ESCOUBAS, P., VALENZUELA, S.M., NICHOLSON, G.M., 2011. A novel family of insect-selective peptide neurotoxins targeting insect large-conductance calcium-activated K^+ channels

- isolated from the venom of the theraphosid spider *Eucratoscelus constrictus*. *Molecular Pharmacology*, **80**: 1-13.
- WULLSCHLEGER, B., NENTWIG, W., KUHN-NENTWIG, L. (2005). Spider venom: enhancement of venom efficacy mediated by different synergistic strategies in *Cupiennius salei*. *The Journal of Experimental Biology*, **208**: 2115-2121.
- XIAO, Y., BINGHAM, J.P., ZHU, W., MOCZYDLOWSKI, E., LIANG, S., CUMMINS, T.R. (2008). Tarantula Huwentoxin-IV inhibits neuronal sodium channels by binding to receptor site 4 and trapping the domain II voltage sensor in the closed configuration. *The Journal of Biological Chemistry*, **283(40)**: 27300-27313.
- XIAO, Y., BLUMENTHAL, K., JACKSON II, J.O., LIANG, S., CUMMINS, T.R. (2010). The tarantula toxins ProTx-II and Huwentoxin-IV differentially interact with human Na_v1.7 voltage sensors to inhibit channel activation and inactivation. *Molecular Pharmacology*, **78(6)**: 1124-1134.
- YAN, L., ADAMS, M.E. (1998). Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the Wolf spider *Lycosa carolinensis*. *The Journal of Biological Chemistry*, **273(4)**: 2059-2066.
- YU, F.H., CATTERALL, W.A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, **4(3)**: 207.1-207.7.
- ZASLOFF, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**: 389-395.
- ZHANG, P.F., CHEN, P., HU, W.J., LIANG, S.P. (2003). Huwentoxin-V, a novel insecticidal peptide toxin from the spider *Selenocosmia huwena*, and a natural mutant of the toxin: indicates the key amino acid residues related to the biological activity. *Toxicon*, **42**: 15-20.
- ZHANG, X.M., ZHU, J. (2011). Kainic Acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. *Current Neuropharmacology*, **9**: 388-398.
- ZLOTKIN, E., EITAN, M., BINDOKAS, V.P., ADAMS, M.E., MOYER, M., BURKHART, W., FOWLER, E. (1991). Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. *Biochemistry*, **30(19)**: 4814-4821.
- ZUO, X.P., HE, H.Q., HE, M., LIU, Z.R., XU, Q., YE, J.G., JI, Y.H. (2006). Comparative pharmacology and cloning of two novel arachnid sodium channels: exploring the adaptive insensitivity of scorpion to its toxins. *FEBS Letters*, **580**: 4508-4514.