



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

**Efeitos da toxina Ap1a isolada da peçonha da caranguejeira
Acanthoscurria paulensis sobre a condutância de canais de cálcio
dependentes de voltagem**

Autor: Jonathan Martins do Nascimento

Brasília
2026

JONATHAN MARTINS DO NASCIMENTO

**Efeitos da toxina Ap1a isolada da peçonha da aranha caranguejeira
Acanthoscurria paulensis sobre a condutância de canais de
cálcio dependentes de voltagem**

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

Orientadora: Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni
Coorientador: Dr. Diogo Vieira Tibery

Brasília
2026

Agradecimentos

Gostaria de iniciar meus agradecimentos à minha orientadora, Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni, pela oportunidade, confiança e orientação ao longo de todo este percurso, acolhendo-me em seu laboratório desde 2018. Sua condução científica, disponibilidade para o diálogo e rigor acadêmico foram determinantes para o desenvolvimento deste trabalho e para minha consolidação como pesquisador

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Diogo Vieira Tibery, por ter me recebido como estagiário desde a época da iniciação científica, acompanhando de perto minha formação e sendo responsável por grande parte do aprendizado técnico que adquiri. Sua forma clara e tranquila de ensinar, aliada à constante disposição para esclarecer dúvidas, foi essencial para que eu aprendesse desde técnicas básicas, como cultura celular e extração de DNA plasmidial, até abordagens mais complexas, como o *patch clamp*, contribuindo de maneira decisiva para minha formação científica.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Adolfo Carlos Barros de Souza, Felipe de Pina Cavalcanti, Isaías Pereira Dias Filho, Israel Flor Silva de Araújo, Marcella Alarcon Izaias Pitel e Manuella Paiva Batista Martins, pelo apoio, pela troca de conhecimentos e pela ajuda em diferentes etapas deste trabalho.

Expresso minha mais profunda gratidão à minha mãe. Seu apoio incondicional e incentivo constante foram essenciais ao longo de toda essa trajetória. Foi o suporte que me ofereceu, especialmente nos momentos mais desafiadores, que me permitiu seguir adiante e me dedicar integralmente à pesquisa. Agradeço também à minha família como um todo, pelo carinho, compreensão e apoio ao longo dessa jornada.

Agradeço imensamente à Ana Luiza, minha namorada, por compartilhar comigo cada etapa deste percurso. Seu cuidado, apoio e compreensão foram fundamentais, trazendo leveza aos meus dias e força para seguir adiante.

Agradeço à Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular pela oportunidade e pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho. Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa, bem como ao CNPq e à FAPDF pelo apoio financeiro.

Resumo

Peçonhas de aranhas constituem uma rica fonte de peptídeos com elevado potencial biotecnológico, especialmente pela capacidade de modular canais iônicos dependentes de voltagem. Entre esses alvos, os canais de cálcio (Cav) exercem funções centrais na transmissão sináptica, na contração muscular e na regulação de diversos processos celulares. A toxina Apl1a, isolada da peçonha da aranha *Acanthoscurria paulensis*, é um peptídeo cuja ação farmacológica ainda não está completamente elucidada. Evidências prévias demonstram que a Apl1a provoca paralisia dose-dependente em *Spodoptera frugiperda*, interfere na transmissão do circuito da Fibra Gigante de *Drosophila melanogaster*, sugerindo atuação em junções neuromusculares, e induz convulsões e insuficiência respiratória em camundongos, quadro compatível com disfunções na liberação de neurotransmissores. Considerando que esses processos dependem criticamente do influxo de Ca^{2+} mediado por canais Cav, alvos recorrentes de toxinas de aranhas, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a atividade eletrofisiológica da Apl1a sobre diferentes subtipos desses canais Cav. A peçonha foi obtida por eletroestimulação, fracionada e purificada por RP-HPLC, e a identidade do peptídeo foi confirmada por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF. Ensaios de *patch clamp* na configuração *whole-cell* foram realizados em células HEK293T expressando os canais Cav1.2, Cav2.1, Cav2.2, Cav2.3 e Cav3.1, utilizando protocolos de ativação, inativação (apenas Cav3.1) e análise de inibição de correntes. A Apl1a apresentou massa monoisotópica experimental de 5457,77 Da e elevado grau de pureza. Na concentração de 500 nM, a toxina reduziu a amplitude das correntes nos canais Cav2.1 em $15,34 \pm 3,29\%$ e nos canais Cav2.2 em $16,08 \pm 2,61\%$, sendo ambos os efeitos estatisticamente significativos e sem alterações relevantes na cinética de ativação. Nos canais Cav2.3, a toxina Apl1a apresentou atividade discreta, promovendo uma inibição da corrente de $2,37 \pm 0,46\%$, embora estatisticamente significativa, também sem efeitos detectáveis sobre a cinética de ativação. Em contraste, na mesma concentração, não foram observados efeitos funcionais mensuráveis sobre os canais Cav1.2 e Cav3.1. Em conjunto, os resultados demonstram que a Apl1a exerce um efeito modulador específico e moderado sobre canais da família Cav2, indicando seletividade parcial entre subtipos de canais de cálcio. Esses achados reforçam o potencial da Apl1a como ferramenta molecular para o estudo da fisiologia de canais Cav e como candidata em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos moduladores farmacológicos. Estudos adicionais serão necessários para elucidar os determinantes moleculares dessa interação e avaliar sua ação sobre outros subtipos de canais.

Abstract

Spider venoms constitute a rich source of peptides with high biotechnological potential, particularly due to their ability to modulate voltage-gated ion channels. Among these targets, voltage-gated calcium channels (Cav) play central roles in synaptic transmission, muscle contraction, and the regulation of diverse cellular processes. Apla, a toxin isolated from the venom of the spider *Acanthoscurria paulensis*, is a peptide whose pharmacological activity has not yet been fully elucidated. Previous evidence indicates that Apla induces dose-dependent paralysis in *Spodoptera frugiperda*, disrupts signal transmission in the Giant Fiber circuit of *Drosophila melanogaster*, suggesting an action at neuromuscular junctions, and causes seizures and respiratory failure in mice, a phenotype consistent with impaired neurotransmitter release. Given that these processes critically depend on Ca²⁺ influx mediated by Cav channels, recurrent targets of spider toxins, this study aimed to characterize the electrophysiological activity of Apla on different Cav channel subtypes. Venom was obtained by electrostimulation, fractionated and purified by RP-HPLC, and peptide identity was confirmed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Whole-cell patch-clamp recordings were performed in HEK293T cells expressing Cav1.2, Cav2.1, Cav2.2, Cav2.3, and Cav3.1 channels, using activation protocols, inactivation protocols (Cav3.1 only) and current inhibition analyses. Apla exhibited an experimental monoisotopic mass of 5457.77 Da and a high degree of purity. At a concentration of 500 nM, the toxin reduced current amplitude by $15.34 \pm 3.29\%$ in Cav2.1 channels and by $16.08 \pm 2.61\%$ in Cav2.2 channels, with both effects being statistically significant and not associated with relevant changes in activation kinetics. In v2.3 channels, Apla displayed modest activity, producing a $2.37 \pm 0.46\%$ inhibition of current, which, although statistically significant, was also not accompanied by detectable changes in activation kinetics. In contrast, at the same concentration, no measurable functional effects were observed on Cav1.2 or Cav3.1 channels. Taken together, these results demonstrate that Apla exerts a specific and moderate modulatory effect on Cav2 family channels, indicating partial selectivity among calcium channel subtypes. These findings reinforce the potential of Apla as a molecular tool for studying Cav channel physiology and as a candidate for research aimed at the development of new pharmacological modulators. Further studies will be required to elucidate the molecular determinants of this interaction and to evaluate its activity on other channel subtypes.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Árvore filogenética da superfamília VGL.	12
Figura 2 – Representação da estrutura dos canais de cálcio dependentes de voltagem.	16
Figura 3 - Estruturas tridimensionais e motivos estruturais de peptídeos de aranhas.	26
Figura 4 - Espécime de <i>Acanthoscurria paulensis</i>	32
Figura 5 – Protocolos de voltagem utilizados nos ensaios eletrofisiológicos em canais de cálcio dependentes de voltagem.	41
Figura 6 – Cromatograma obtido por RP-HPLC de 4 mg de peçonha bruta de <i>A. paulensis</i>	43
Figura 7 – Cromatograma da purificação do peptídeo Apl1a.	44
Figura 8 – Espectro de massas do peptídeo Apl1a.	45
Figura 9 – Alinhamento múltiplo entre a sequência de aminoácidos da Apl1a e toxinas identificadas em diferentes gêneros da família Theraphosidae.	46
Figura 10 – Correntes normalizadas registradas em diferentes subtipos de canais Cav ao longo do tempo, na ausência e presença do peptídeo Apl1a (500 nM).	47
Figura 11 – Traços de registros obtidos em Canais Cav HVA na presença do peptídeo Apl1a (500 nM).	48
Figura 12 – Ativação dos canais Cav HVA na presença do peptídeo Apl1a (500 nM). ...	49
Figura 13 – Traços de registros obtidos em Canais Cav3.1 na presença do peptídeo Apl1a (500 nM).	51
Figura 14 – Ativação e inativação do canal Cav3.1 na presença do peptídeo Apl1a (500 nM).	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Nomenclatura e propriedades de canais Cav.	15
Tabela 2 – Nomenclatura de toxinas baseadas na função farmacológica.	28
Tabela 3 – Valores das médias de Inibição e $\Delta V_{1/2}$ obtidos para os canais de cálcio na presença da toxina Apl1a 500nM.	53
Tabela 4 – Efeitos da toxina Apl1a sobre diferentes canais iônicos dependentes de voltagem e receptores ionotrópicos.	58

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABS: Absorbância
ACN: Acetonitrila
AID: *Alpha Interaction Domain*
BgNav1: Canal de sódio dependente de voltagem de *Blattella germanica* 1
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
Ca_v: Canais de cálcio dependentes de voltagem
DDH: *Disulfide-Directed β -Hairpin*
DRH: *Disulfide-Reined Hairpin*
ED₅₀: Dose efetiva média
GF: *Giant Fiber*
GF-DLM: *Giant Fiber – Dorsal Longitudinal Muscle*
GF-TTM: *Giant Fiber – Tergotrochanteral Muscle*
GK: *Guanylate kinase*
GluCl: Canais de cloreto ativados por glutamato
G_{max}: Condutância máxima
GPI: Glicosilfosfatidilinositol
HEK: Células embrionárias de rim humano
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HVA: *High Voltage Activated*
HWTX: Huwentoxina
ICK: *Inhibitor Cystine Knot*
IGluRs: Receptores ionotrópicos de glutamato
K_v: Canais de potássio dependentes de voltagem
LVA: *Low Voltage Activated*
MALDI: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (Dessorção/Ionização a laser assistida por matriz)
Na_v: Canais de sódio dependentes de voltagem
PD: *Pore Domain*
PD₅₀: Dose paralisante média
PDB: *Protein Data Bank*
SH3: *Src Homology 3*
SSI: *Steady-State Inactivation*
TFA: Ácido trifluoracético
TRTX: *Theraphotoxin*
VdNav1: Canal de sódio dependente de voltagem de *Varroa destructor* 1
VGL: *Voltage-Gated Like*
VSD: *Voltage Sensor Domain*
VWA: *Von Willebrand Factor A*

Sumário

Agradecimentos	3
Resumo.....	4
Abstract.....	5
Lista de Ilustrações.....	6
Lista de Tabelas.....	7
Lista de Siglas e Abreviaturas	8
1. Introdução	11
1.1. Canais iônicos dependentes de voltagem.....	11
1.1.1. Canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v).....	13
1.2. Toxinas como moduladores de canais iônicos de cálcio dependentes de voltagem.....	18
1.3. Aranhas.....	21
1.4. Composição bioquímica da peçonha de aranhas.....	23
1.4.1. Compostos peptídicos.....	24
1.4.1.1. Peptídeos Lineares.....	24
1.4.1.2. Peptídeos estabilizados por ligações dissulfeto	24
1.5. Nomenclatura para toxinas.....	27
1.6. Peçonha de aranha e seus potenciais farmacológicos.....	29
1.7. Peptídeos de aranhas com ação em canais Ca_v	30
1.8. <i>Acanthoscurria paulensis</i>	31
1.9. Estudos prévios com a peçonha de <i>A. paulensis</i>	32
3. Objetivos.....	37
4. Material e métodos.....	38
4.2. Cromatografia Líquida de Alta eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC).....	38
4.3. Espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF)	39
4.4. Quantificação dos peptídeos (Colorimetria BCA-Cobre).....	39
4.5. Busca por similaridade.....	39
4.7. Eletrofisiologia – <i>Setup</i> experimental para <i>Patch Clamp</i>	40
4.7.2. Análise de dados	42
5. Resultados	43

5.1.	Purificação.....	43
5.2.	Alinhamento de sequências.....	45
5.3.	Eletrofisiologia em canais de cálcio dependentes de voltagem	46
6.	Discussão	54
7.	Conclusão.....	68
8.	Perspectivas.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70

1. Introdução

1.1. Canais iônicos dependentes de voltagem

Os canais iônicos são proteínas transmembranares, capazes de permitir a translocação seletiva de íons através de membranas biológicas hidrofóbicas em resposta a diferentes estímulos, um processo essencial para a sinalização elétrica e para o funcionamento adequado das células excitáveis (Hille, 2001). Embora tenham sido historicamente associados aos animais, em razão da sinalização elétrica rápida em sistemas neuromusculares, evidências genômicas e evolutivas indicam que as origens dos canais iônicos antecedem o surgimento dos sistemas nervosos ou mesmo da multicelularidade animal (Chiu et al., 1999; Liebeskind; Hillis; Zakon, 2011).

Em procariotos, por exemplo, bactérias são capazes de sustentar sinais elétricos semelhantes a potenciais de ação, os quais participam da comunicação social em biofilmes (Humphries et al., 2017). Canais de sódio bacterianos, como o NaChBac, oriundo de *Bacillus halodurans*, são considerados ancestrais evolutivos diretos dos canais mais complexos encontrados em vertebrados (Charalambous; Wallace, 2011; Ren et al., 2001). Em eucariotos unicelulares, organismos como *Paramecium sp.* utilizam redes de excitação de membrana para respostas de fuga, enquanto algas verdes do gênero *Chlamydomonas* empregam canais iônicos para converter o estímulo luminoso em uma resposta motora (Martinac; Saimi; Kung, 2008). Em plantas, esses canais desempenham papéis centrais na absorção de nutrientes, controle estomático e transporte vascular (Jegla; Busey; Assmann, 2018).

Entre os canais iônicos, existem diferentes origens evolutivas. Assim, os canais iônicos podem ser organizados em superfamílias, definidas como a coleção mais ampla de canais que pode ser representada em uma única filogenia molecular, indicando uma origem evolutiva comum (Zheng; Trudeau, 2023). Os canais iônicos dependentes de voltagem e estruturalmente relacionados compõem a chamada superfamília VGL (*Voltage-Gated-Like*) (Figura 1), representando um dos maiores e mais diversificados conjuntos de proteínas de sinalização do genoma humano, resultando em moléculas altamente versáteis, capazes de integrar sinais elétricos e intracelulares, sustentando mecanismos de sinalização que controlam grande parte da fisiologia celular (Yu; Catterall, 2004). Evidências indicam que esses canais evoluíram a partir de um ancestral simples com dois segmentos

transmembranares, semelhante ao canal bacteriano KcsA, ao qual foram incorporados domínios regulatórios intracelulares e sensores de voltagem (Booth; Edwards; Miller, 2003; Yu; Catterall, 2004).

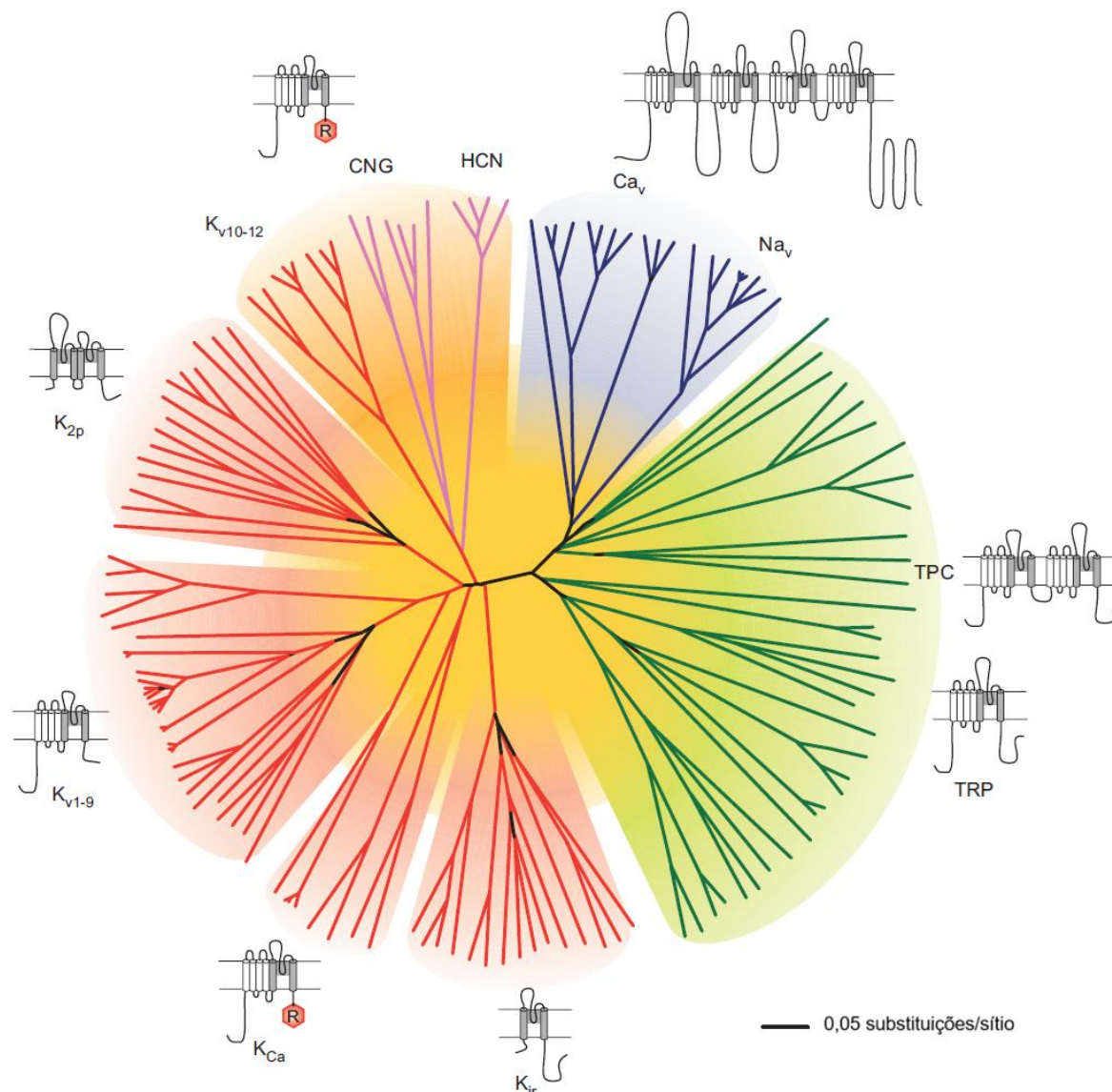


Figura 1 – Árvore filogenética da superfamília VGL. Relações evolutivas entre canais de sódio dependentes de voltagem (Nav), canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav), canais de potássio (K_v, K_{2p}, K_{Ca} e K_{ir}), canais de dois poros (TPC), canais modulados por nucleotídeos cíclicos (CNG e HCN) e canais da família TRP (*Transient Receptor Potential*). Adaptado de Yu; Catterall, 2004.

A diversificação estrutural e funcional dos canais iônicos dependentes de voltagem possibilitou o surgimento de mecanismos altamente eficientes de excitabilidade elétrica, constituindo os principais elementos responsáveis pela geração e propagação de sinais elétricos em tecidos excitáveis, como neurônios e músculos. Os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) são responsáveis pela rápida despolarização da membrana, permitindo a

propagação eficiente de sinais elétricos ao longo dos neurônios. Os canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) atuam no controle da repolarização e na estabilização do potencial de membrana, modulando a frequência e o padrão de disparo neuronal (Alexander et al., 2013; Catterall; Lenaeus; Gamal El-Din, 2020; Yu et al., 2005). Já os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), além de participarem da condução elétrica, também estão envolvidos em diversos processos fundamentais, como a contração muscular, a liberação de vesículas sinápticas, a regulação da expressão gênica, a secreção hormonal, a atividade enzimática e outros eventos bioquímicos relevantes (Bannister; Beam, 2013; Dolphin; Lee, 2020; Zamponi et al., 2015). Em conjunto, a atuação desses canais sustenta a transmissão rápida e confiável de informações entre neurônios e outras células excitáveis, tanto no sistema nervoso como em outros tecidos excitáveis (Hille, 2001).

1.1.1. Canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v)

Os canais Ca_v são complexos macromoleculares multiméricos, que permitem a passagem de Ca^{2+} através da membrana, em resposta a variação no potencial de membrana, sendo essenciais para a transdução de sinais elétricos em respostas fisiológicas. Com base em características estruturais, funcionais e farmacológicas, os canais Ca_v são classificados em três subfamílias principais, Ca_v1 , Ca_v2 e Ca_v3 (Tabela 1). Do ponto de vista funcional, esses canais também podem ser agrupados de acordo com o limiar de voltagem necessário para sua ativação e com as propriedades biofísicas das correntes que geram. Nesse contexto, os canais de cálcio dependentes de voltagem classificam-se em canais ativados por alta voltagem (*High-Voltage-Activated*, HVA), que incluem as subfamílias Ca_v1 e Ca_v2 , e canais ativados por baixa voltagem (*Low-Voltage-Activated*, LVA), representados pela subfamília Ca_v3 .

A subfamília Ca_v1 está associada a uma ampla variedade de processos fisiológicos, incluindo a contração muscular, a geração de ritmos cardíacos e a transdução de sinais sensoriais. O canal $Ca_v1.1$ é especializado no acoplamento excitação–contração do músculo estriado esquelético (Block et al., 1988), enquanto o $Ca_v1.2$ desempenha papel central na contração da musculatura cardíaca (Rios; Brum, 1987). Já o $Ca_v1.3$ é essencial para o funcionamento do marcapasso cardíaco e para a audição, atuando nas células ciliadas da orelha interna (Platzter et al., 2000). Por sua vez, o $Ca_v1.4$ é predominantemente expresso em células fotorreceptoras da retina, sendo crucial para a visão (Mansergh et al., 2005).

Os canais da subfamília Cav2 permitem a entrada de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico, fornecendo o gatilho bioquímico necessário para a fusão de vesículas sinápticas e a liberação de neurotransmissores. Dessa forma, desempenham papel central na comunicação sináptica entre neurônios e na regulação de órgãos efetores periféricos (Dolphin; Lee, 2020). Em contraste com os demais canais Cav, os canais da subfamília Cav3 formam canais funcionais compostos apenas pela subunidade $\alpha 1$ formadora de poro. Esses canais são amplamente expressos em diferentes tecidos, incluindo neurônios, coração, rins, sistema endócrino, músculo liso e espermatozoides (Perez-Reyes, 2003).

Tabela 1 – Nomenclatura e propriedades de canais Cav. Adaptado de Dolphin; Lee, 2020.

Gene	Proteína	Nome da subunidade $\alpha 1$	Fisiologia (Tipo de corrente)	Distribuição principal
<i>CACNAIS</i>	Cav1.1	$\alpha 1S$		Músculo esquelético
<i>CACNAIC</i>	Cav1.2	$\alpha 1C$		Músculo cardíaco e diversos outros tecidos
<i>CACNAID</i>	Cav1.3	$\alpha 1D$	Tipo L	Nó sinoatrial do coração e células ciliadas internas da cóclea
<i>CACNAIF</i>	Cav1.4	$\alpha 1F$		Sinapses da retina
<i>CACNAIA</i>	Cav2.1	$\alpha 1A$	Tipo P/Q	Sinapses centrais e junção neuromuscular
<i>CACNAIB</i>	Cav2.2	$\alpha 1B$	Tipo N	Sinapses centrais e periféricas
<i>CACNAIE</i>	Cav2.3	$\alpha 1E$	Tipo R	Sinapses centrais e periféricas (liberação assíncrona)
<i>CACNAIG</i>	Cav3.1	$\alpha 1G$		Diversas células excitáveis, incluindo aquelas envolvidas em funções de marcapasso e em oscilações subliminares
<i>CACNAIH</i>	Cav3.2	$\alpha 1H$	Tipo T	
<i>CACNAII</i>	Cav3.3	$\alpha 1I$		

Do ponto de vista estrutural, os canais Cav são constituídos por uma subunidade principal $\alpha 1$ e, no caso dos canais HVA, por subunidades auxiliares, especificamente $\alpha 2\delta$, β e, em determinados tecidos, a subunidade γ (Figura 2) (Catterall, 2011). A subunidade $\alpha 1$ representa o componente central do canal, abrigando o poro de condução iônica, o sensor de voltagem e os principais sítios de modulação por fármacos (Zamponi et al., 2015). Sua organização molecular é caracterizada por quatro domínios homólogos (DI–DIV), cada um composto por seis segmentos transmembranares helicoidais (S1–S6). Em cada domínio, os segmentos S1 a S4 formam o domínio sensor de voltagem (VSD), sendo o segmento S4

particularmente relevante por conter resíduos de aminoácidos carregados positivamente, que possibilitam mudanças conformacionais associadas às variações do campo elétrico durante a despolarização da membrana. Por outro lado, os segmentos S5 e S6, juntamente com a alça reentrante formada entre esses segmentos (loop P), constituem o domínio do poro (PD), onde se localiza o filtro de seletividade. Nos canais Cav, esse filtro é tipicamente formado por resíduos de aminoácidos ácidos (Catterall, 2011; Wu et al., 2015).

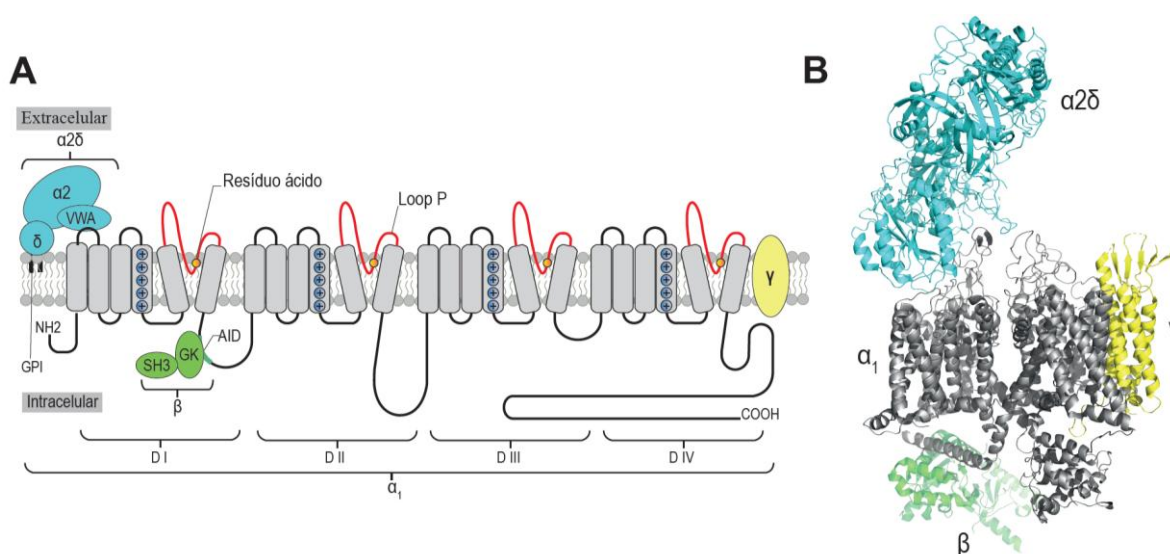


Figura 2 – Representação da estrutura dos canais de cálcio dependentes de voltagem. (A) Esquema da conformação aberta do canal, adaptado de Dolphin; Lee, 2020. (B) Estrutura tridimensional do complexo Cav1.1, estrutura visualizada usando o Software PyMOL (PDB: 5GJV).

O filtro de seletividade dos canais Cav confere elevada preferência por íons Ca^{2+} em relação a cátions monovalentes, como Na^+ . Em canais HVA, essa região é composta por quatro resíduos conservados de ácido glutâmico, formando o motivo EEEE, como demonstrado por estudos de microscopia crioeletrônica do Cav1.1 (Wu et al., 2015). A alta densidade de cargas negativas associada a esse motivo estabiliza preferencialmente íons divalentes, explicando a elevada seletividade por Ca^{2+} , apesar de seu raio iônico semelhante ao do Na^+ (Sather; McCleskey, 2003). Como consequência, o Ca^{2+} liga-se ao poro com maior afinidade e bloqueia de maneira eficaz a permeação de Na^+ , mesmo quando este se encontra em concentrações extracelulares mais elevadas (Hess; Tsien, 1984; Yang et al., 1993).

A importância funcional do motivo EEEE é corroborada por estudos de mutagênese, nos quais mutações neutralizantes reduzem drasticamente a afinidade por Ca^{2+} . Em particular, mutações duplas nesse motivo resultam em uma diminuição da afinidade por Ca^{2+} de até três ordens de magnitude no canal Cav1.2 (Yang et al., 1993). De forma consistente,

a introdução de resíduos de glutamato no poro de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) é suficiente para conferir seletividade por Ca^{2+} , evidenciando o papel determinante desses resíduos ácidos na seletividade iônica (Heinemann et al., 1992).

Os canais da subfamília Cav3, por sua vez, apresentam um filtro de seletividade que difere parcialmente daquele observado nos demais canais Cav. Nesses canais, o motivo clássico EEEE é substituído pelo motivo EEDD, refletindo uma variação estrutural no poro (Zhao et al., 2019). Ainda assim, o conjunto permanece composto exclusivamente por resíduos ácidos, preservando a elevada densidade de carga negativa necessária para a coordenação preferencial de íons divalentes. Essa variação estrutural está associada a particularidades funcionais, como menor condutância para Ba^{2+} , menor sensibilidade ao bloqueio por Cd^{2+} e alterações nas propriedades de *gating*, contribuindo para a ativação desses canais em potenciais de membrana mais negativos (Talavera et al., 2001).

Além da subunidade $\alpha 1$, as subunidades auxiliares dos canais Cav HVA desempenham papel fundamental na regulação do tráfego de íons, da expressão na membrana plasmática e das propriedades funcionais do canal. As subunidades β são proteínas citosólicas que se ligam com alta afinidade a uma região conservada localizada no loop intracelular entre os domínios I e II da subunidade $\alpha 1$, conhecida como domínio de interação com $\alpha 1$ (AID) (Buraei; Yang, 2010). Estruturalmente, essas subunidades possuem dois domínios conservados, SH3 (*src homology 3*) e GK (*guanylate kinase*) (Chen et al., 2004; Van Petegem et al., 2004). Funcionalmente, modulam o tráfego da subunidade $\alpha 1$ até a membrana e influenciam as propriedades de ativação e inativação do canal (Buraei; Yang, 2010).

As subunidades $\alpha 2\delta$ são sintetizadas como proteínas precursoras que sofrem clivagem pós-traducional no retículo endoplasmático, originando os peptídeos $\alpha 2$ e δ , ligados entre si por ligações dissulfeto. A porção $\alpha 2$ é predominantemente extracelular e contém domínios associados à adesão e interação proteica, incluindo um domínio do tipo *Von Willebrand factor A* (VWA) e múltiplos domínios cache organizados em tandem. A subunidade δ , por sua vez, ancora o complexo à membrana plasmática por meio de uma âncora do tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Dolphin, 2013). Essas subunidades interagem com regiões extracelulares dos domínios DI, DII e DIII da subunidade $\alpha 1$ (Wu et al., 2016), aumentando a eficiência do tráfego para a membrana e modulando a cinética de abertura e fechamento do canal (Dolphin, 2013).

A subunidade γ foi inicialmente identificada como um componente do complexo do

canal Cav1.1 no músculo esquelético (Takahashi et al., 1987). Estruturalmente, apresenta quatro segmentos transmembranares, com extremidades N- e C-terminais localizadas no citosol, compartilhando uma arquitetura de membrana semelhante à das claudinas, proteínas integrais envolvidas na formação de junções de oclusão (Simske, 2013). No canal Cav1.1, a subunidade γ interage com o VSD do DIV da subunidade $\alpha 1$ (Wu et al., 2016). Funcionalmente, essa subunidade contribui para a estabilização do estado inativado do canal, influenciando sua disponibilidade durante a atividade elétrica celular (Singer et al., 1991).

Dada a importância central dos canais Cav em múltiplos processos fisiológicos, a desregulação dessas proteínas — seja por mutações genéticas ou por alterações nas condições celulares que afetam sua expressão e função — está diretamente associada a uma ampla gama de patologias humanas, conhecidas como canalopatias. Essas incluem dores crônicas, enxaqueca, epilepsias, hipertensão arterial e diversas arritmias cardíacas (Jen, 1999). Na subfamília Cav1, exemplos clássicos incluem a Paralisia Periódica Hipocalêmica tipo 1 (Cav1.1), que compromete a excitabilidade muscular, e a Síndrome de Timothy (Cav1.2), uma condição multissistêmica que afeta o ritmo cardíaco e o desenvolvimento neurológico (Flucher, 2020; Splawski et al., 2004).

De forma semelhante, os canais da subfamília Cav2 desempenham papéis críticos na patogênese de distúrbios do sistema nervoso. Mutações no canal Cav2.1, por exemplo, estão implicadas em diversas doenças neurológicas, incluindo encefalopatias epiléticas, enxaqueca hemiplégica familiar tipo 1, ataxia episódica tipo 2, ataxia espinocerebelar tipo 6 e deficiência intelectual (Pietrobon, 2010). Por fim, os canais da subfamília Cav3, responsáveis por disparos rítmicos neuronais, também estão associados a condições patológicas. Mutações no canal Cav3.2 têm sido relacionadas à epilepsia generalizada idiopática, ao transtorno do espectro autista e ao hiperaldosteronismo (Weiss; Zamponi, 2020). Em conjunto, essa diversidade de fenótipos patológicos reforça o papel crítico dos canais Cav na fisiopatologia humana. Assim, a compreensão aprofundada dos mecanismos moleculares e funcionais subjacentes às canalopatias torna-se fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas à restauração da homeostase celular.

1.2. Toxinas como moduladores de canais iônicos de cálcio dependentes de voltagem

A farmacologia dos canais Cav evidencia uma distinção marcante entre suas

subfamílias, baseada tanto em diferenças estruturais quanto na sensibilidade a agentes químicos. A caracterização inicial das correntes de cálcio do tipo HVA foi impulsionada pela identificação de moduladores clássicos, como as di-hidropiridinas, fenilalquilaminas e benzotiazepinas, que exibem elevada seletividade pelos canais da subfamília Cav1 (Hockerman et al., 1997). Esses compostos interagem predominantemente com sítios localizados nos segmentos S6 da subunidade $\alpha 1$, o que fundamenta seu amplo uso clínico no tratamento de condições cardiovasculares, como hipertensão e arritmias (Triggle, 1991). Em contraste, nos canais Cav2 esses fármacos produzem efeitos inibitórios relevantes apenas em concentrações substancialmente mais elevadas, refletindo a ausência de determinantes moleculares específicos para essa interação, apesar da arquitetura do poro ser globalmente conservada entre as subfamílias (Diochot et al., 1995; Hockerman et al., 1997).

Esse cenário impulsionou a identificação de peptídeos derivados de peçonhas animais como os principais e mais potentes moduladores da subfamília Cav2. Entre os moduladores mais proeminentes destacam-se as ω -conotoxinas, isoladas de caracóis marinhos do gênero *Conus*, e as ω -agatoxinas, provenientes de peçonhas de aranhas (Olivera et al., 1994).

A ω -conotoxina GVIA é um peptídeo composto por 27 aminoácidos, derivado da peçonha do caracol marinho *Conus geographus*, se destacando por sua capacidade excepcional de se ligar aos canais de cálcio Cav2.2 de forma altamente seletiva e quase permanente (Boland; Morrill; Bean, 1994). Através de estudos com canais modificados, foi demonstrado que a toxina bloqueia a passagem de íons ao se fixar externamente ao poro do canal, especificamente na região do loop-P DIII (Ellinor et al., 1994). Embora a peçonha desse molusco apresente outras toxinas, como a GVIB e a GVIIA, a GVIA permanece como a referência principal para estudos eletrofisiológicos, por ser mais extensivamente documentada (Olivera et al., 1994). Dessa forma, a ω -conotoxina GVIA consolida-se como uma ferramenta indispensável tanto para desvendar a sinalização sináptica mediada pelos canais Cav2.2 quanto para fundamentar novas frentes terapêuticas (Cui et al., 2026; Leandrou et al., 2025; Wan et al., 2025).

Nesse mesmo contexto, a peçonha do caracol marinho *Conus magus* também se destaca como fonte de diversas ω -conotoxinas, incluindo MVIIA, MVIIB, MVIIC e MVIID, que apresentam elevada afinidade pelos canais de cálcio Cav2.2 (Olivera et al., 1994). A toxina MVIIC, além de inibir canais Cav2.2, também é capaz de bloquear de forma reversível os canais Cav2.1 (Grantham et al., 1994). Clinicamente, a validação dos canais Cav2.2 como alvos terapêuticos culminou no desenvolvimento da ziconotida (Prialt), uma versão sintética da MVIIA aprovada para o tratamento da dor crônica. Esse fármaco se posiciona em uma cavidade

na entrada do filtro de seletividade, bloqueando fisicamente a passagem dos íons cálcio para o interior do poro. O ancoramento da toxina ao canal envolve resíduos carregados e polares, como T643, D1345, K1372 e D1629, os quais não são conservados em outros tipos de canais de cálcio, conferindo ao fármaco sua elevada seletividade (Gao; Yao; Yan, 2021).

As ω -agatoxinas são toxinas ativas sobre canais Cav oriundas da peçonha da aranha *Agelenopsis aperta*. Dentre elas, a ω -agatoxina IVA (ω -AGTX-Aa4a) é a mais notória, consistindo em um peptídeo de 48 resíduos de aminoácidos estabilizado por quatro ligações dissulfeto. Essa toxina constitui uma ferramenta experimental crucial para a distinção entre correntes do tipo P e Q, apresentando maior sensibilidade para as do tipo P (Li et al., 2024). Ambas as correntes são mediadas por variantes dos canais Cav2.1, originadas tanto por *splicing* alternativo quanto pela interação específica com diferentes subunidades auxiliares (McDonough; Mintz; Bean, 1997). A ω -agatoxina IVA atua como uma toxina modificadora de gating, ligando-se próximo ao domínio sensor de voltagem do domínio IV, impedindo sua ativação (McDonough; Mintz; Bean, 1997). Já a ω -agatoxina IIIA (ω -AGTX-Aa3a) é uma molécula significativamente maior, com 78 resíduos de aminoácidos, e menos seletiva, atuando como um bloqueador de poro incompleto em diversos canais de cálcio HVA, especificamente os das subfamílias Cav1, Cav2.1 e Cav2.2 (Mintz, 1994).

Entre as toxinas moduladoras de canais Cav mais proeminentes está a SNX-482 (ω -TRTX-Hg1a), uma toxina composta por 41 resíduos de aminoácidos, estabilizada por quatro ligações dissulfeto, isolada da aranha caranguejeira *Hysteroecrates gigas*. Essa toxina é descrita como o inibidor mais potente e seletivo conhecido para os canais Cav2.3 (Bourinet et al., 2001). Seu mecanismo de ação envolve a interferência no processo de abertura do canal, deslocando o potencial de ativação para valores mais positivos, o que impede sua abertura em potenciais de membrana fisiológicos. Essa inibição é mediada por interações da toxina com os domínios DIII e DIV. Embora seja altamente potente contra canais do tipo R, a SNX-482 também pode inibir parcialmente e de forma reversível os canais Cav1.2, indicando que não apresenta seletividade absoluta (Bourinet et al., 2001).

A especificidade dessas toxinas é tal que a ω -conotoxina GVIA tornou-se o padrão-ouro para a identificação de canais Cav2.2 (McCleskey et al., 1987), enquanto a ω -agatoxina IVA é essencial para distinguir as correntes mediadas pelo Cav2.1 (Adams et al., 1993). A descrição e a aplicação dessas toxinas possuem importância científica e clínica imensurável, funcionando como ferramentas farmacológicas indispensáveis para a dissecação funcional dos subtipos de Cav2 nas sinapses. Do ponto de vista científico, seu uso permitiu mapear a contribuição relativa de cada subtipo de canal para a liberação de neurotransmissores,

revelando o papel predominante desses canais na maioria das sinapses do sistema nervoso (Takahashi; Momiyama, 1993; Wheeler; Randall; Tsien, 1996).

1.3. Aranhas

As aranhas, integrantes da ordem Araneae, constituem um dos grupos de predadores terrestres mais abundantes e diversos da biosfera, ocorrendo em praticamente todos os ecossistemas terrestres e em alguns ambientes aquáticos. Atualmente, são reconhecidas 53.673 espécies válidas, distribuídas em 4.502 gêneros e 139 famílias (World Spider Catalog, 2026). Registros fossilíferos indicam que esse grupo já estava presente no período Carbonífero, há aproximadamente 300 milhões de anos (Selden; Penney, 2010). As aranhas ocupam, portanto, uma posição antiga na relação com as sociedades humanas, sendo reconhecidas desde os primeiros registros de observação do mundo natural, como evidenciado por representações encontradas em paredes de cavernas (Hillyard, 1996).

A ordem Araneae encontra-se dividida em duas subordens, Mesothelae e Opisthothelae. A subordem Mesothelae compreende espécies restritas à Ásia, as quais preservam diversos caracteres morfológicos considerados plesiomórficos, incluindo a segmentação externa evidente do opistossoma e a posição ventral mediana das fiandeiras (Kulkarni; Wood; Hormiga, 2023; Xin et al., 2015). Essas aranhas, popularmente conhecidas como “aranhas-alçapão”, constroem tocas tubulares no solo, cuja abertura é fechada por um opérculo camuflado, associado a fios de seda utilizados para a detecção de presas (Bristowe, 1976).

Sob a perspectiva toxicológica, as Mesothelae foram tradicionalmente consideradas desprovidas de glândulas produtoras de peçonha (Haupt, 2005). No entanto, estudos morfológicos clássicos já haviam descrito a presença de glândulas de peçonha reduzidas em representantes da família Liphistiidae (Bristowe, 1932), evidência posteriormente confirmada por análises em microscopia eletrônica de varredura, as quais demonstraram a existência de aberturas glandulares nos ferrões e de pequenas glândulas localizadas no segmento basal das quelíceras em diferentes espécies do gênero *Liphistius* (Foelix; Erb, 2010). A presença dessas glândulas é, portanto, interpretada como um caráter plesiomórfico da ordem Araneae. Entretanto, tais glândulas são extremamente reduzidas quando comparadas às observadas em Opisthothelae e podem estar ausentes ou funcionalmente reduzidas em machos adultos (Foelix; Erb, 2010).

As demais espécies de aranhas integram a subordem Opisthothelae, a qual se subdivide nas infraordens Mygalomorphae e Araneomorphae. A infraordem Araneomorphae compreende a vasta maioria das espécies conhecidas de aranhas, apresentando elevada diversidade morfológica e comportamental, expressa na ocupação de múltiplos habitats e em adaptações que possibilitam a exploração de uma ampla gama de condições ecológicas (Turnbull, 1973). Atualmente, as araneomorfos correspondem a mais de 94% das espécies descritas, distribuídas em cerca de 122 famílias (World Spider Catalog, 2026). No contexto epidemiológico brasileiro, os gêneros responsáveis pelos acidentes humanos mais graves e potencialmente letais pertencem exclusivamente a essa infraordem, destacando-se *Phoneutria*, *Loxosceles* e *Latrodectus* (BRASIL, 2024).

As migalomorfos, aranhas pertencentes à infraordem Mygalomorphae, assim como as Mesothelae, são consideradas formas mais primitivas de aranhas, por conservarem características ancestrais, como um sistema simples de fiação de seda, dois pares de pulmões foliáceos e a disposição paraxial das quelíceras, que se articulam por movimentos paralelos ao eixo longitudinal do corpo. Em razão disso, apresentam relativa homogeneidade morfológica quando comparadas à ampla diversidade observada entre as aranhas araneomorfos (Hendrixson; Bond, 2009). Registros fósseis do grupo remontam ao período Triássico (Selden; Gall, 1992). Popularmente conhecidas como aranhas-caranguejeiras, essas aranhas são predominantemente errantes e não constroem teias para a captura de presas, utilizando a seda principalmente para fins reprodutivos. Alimentam-se majoritariamente de insetos, embora existam registros de predação sobre vertebrados (Menin; Rodrigues; Azevedo, 2005; Nyffeler; Knörnschild, 2013; Pocock, 1899; Reyes-Olivares et al., 2020). Com exceção da aranha-teia-de-funil-de-Sydney (*Atrax robustus*) e de outras espécies aparentadas (Hedin et al., 2018), a maioria das migalomorfos não apresenta toxicidade significativa para o ser humano.

A família Theraphosidae é reconhecida como a mais diversa entre as migalomorfos. No entanto, representa apenas cerca de 2% da diversidade total de Araneae, englobando aproximadamente 1.194 espécies descritas (World Spider Catalog, 2026). Assim como outras migalomorfos, as caranguejeiras da família Theraphosidae não utilizam teias para a captura de presas, dependendo exclusivamente de sua força física e da elevada eficiência de sua peçonha, o que resulta em uma ação capaz de paralisar presas grandes e robustas de forma rápida e eficaz (Escoubas; Rash, 2004). Embora raramente representem risco grave para seres humanos, a peçonha dessas aranhas constitui uma rica fonte de compostos

bioativos, cuja diversidade molecular reflete milhões de anos de evolução e tem despertado crescente interesse biotecnológico e farmacológico, incluindo o desenvolvimento de bioinseticidas e a prospecção de moléculas com potencial terapêutico para distúrbios neurológicos e cardiovasculares (Escoubas; Rash, 2004; Langenegger; Nentwig; Kuhn-Nentwig, 2019; Lüddecke et al., 2022).

1.4. Composição bioquímica da peçonha de aranhas

O sucesso evolutivo das aranhas está intimamente relacionado à complexidade bioquímica de suas peçonhas. Essas secreções constituem misturas altamente diversas de moléculas bioativas, exercendo papel central tanto na captura de presas, por meio de paralisia ou morte, quanto na defesa contra potenciais agressores (Escoubas; Rash, 2004). Sob a perspectiva bioquímica, as peçonhas de aranhas incluem sais inorgânicos, compostos orgânicos de baixo peso molecular (inferiores a 1 kDa), além de peptídeos lineares e ricos em ligações dissulfeto, com massas entre 3 e 9 kDa, bem como proteínas de maior peso molecular, variando aproximadamente de 10 a 120 kDa (Kuhn-Nentwig; Stöcklin; Nentwig, 2011). Entretanto, a eficácia dessas peçonhas não decorre da ação isolada de seus componentes, mas da elevada diversidade molecular e da atuação sinérgica entre eles, que operam de forma coordenada sobre múltiplos alvos fisiológicos, ampliando a potência, a rapidez e a especificidade dos efeitos tóxicos (Lüddecke et al., 2022).

Os principais componentes de baixa massa molecular incluem aminas biogênicas, aminoácidos livres, nucleotídeos e acilpoliaminas (Forster et al., 2020). Entre esses compostos, destacam-se as acilpoliaminas, substâncias inicialmente identificadas na década de 1980 em espécies dos gêneros *Nephila* e *Argiope*, e posteriormente reconhecidas em uma ampla diversidade de aranhas (Palma, 2012). Estruturalmente, essas moléculas são formadas por um grupo acil aromático hidrofóbico ligado a uma cadeia de poliaminas carregadas positivamente, podendo apresentar um espaçador intermediário composto por um ou dois aminoácidos, sendo a extensão da cadeia de poliaminas bastante variável (McCormick; Meinwald, 1993). O alvo molecular dessas substâncias é, predominantemente, o conjunto de receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) de invertebrados, abundantes em junções neuromusculares de insetos e outros artrópodes. Ao bloquearem esses receptores, as acilpoliaminas exercem uma potente ação inseticida, induzindo a paralisia das presas

(Palma, 2012). Além disso, em muitos casos, tais moléculas atuam sobre os homólogos desses receptores em mamíferos, o que reforça seu elevado potencial biotecnológico (Rádís-Baptista; Konno, 2024).

1.4.1. Compostos peptídicos

Peptídeos constituem a classe de compostos mais abundante e funcionalmente relevante constituintes de peçonhas de aranhas (Guo et al., 2024). A complexidade desse repertório molecular pode ser exemplificada pela peçonha da aranha *Hadronyche infensa*, na qual mais de 3.000 massas peptídicas distintas foram detectadas (Pineda et al., 2020). Enquanto as proteínas maiores geralmente desempenham papéis auxiliares — como maturação de toxinas e degradação tecidual para facilitar a difusão da peçonha —, os peptídeos são os principais responsáveis pela imobilização imediata das presas, ao interagirem com canais iônicos e receptores de membrana (Langenegger; Nentwig; Kuhn-Nentwig, 2019). Estes peptídeos podem ser categorizados em peptídeos citolíticos lineares e neurotoxinas estabilizadas por ligações dissulfeto.

1.4.1.1. Peptídeos Lineares

Os peptídeos lineares presentes na peçonha de diversas aranhas constituem uma classe caracterizada pela ausência de resíduos de cisteína e, conseqüentemente, pela falta de ligações de dissulfeto em suas sequências, adotando uma estrutura de α -hélice anfipática em proximidade com as membranas (Figura 3A) (Langenegger; Nentwig; Kuhn-Nentwig, 2019). Estes compostos apresentam frequentemente atividade membranolítica, de forma que a abundância de resíduos como arginina e lisina promove a atração eletrostática por fosfolípidios aniônicos, enquanto suas regiões hidrofóbicas permitem a inserção e permeabilização da bicamada lipídica. Como as membranas de procariotos possuem uma densidade de carga negativa superior à das células de mamíferos, a interação membranolítica é muito mais potente e direcionada a organismos bacterianos, embora efeitos em células eucarióticas possam ocorrer em concentrações elevadas. Por essa razão, são frequentemente denominados peptídeos antimicrobianos (Matsuzaki, 2009).

1.4.1.2. Peptídeos estabilizados por ligações dissulfeto

Os peptídeos estabilizados por ligações de dissulfeto constituem os principais componentes neurotóxicos da peçonha (Langenegger; Nentwig; Kuhn-Nentwig, 2019). Esses compostos formam complexos altamente estáveis com seus alvos moleculares, o que lhes confere uma notável eficácia biológica mesmo em concentrações nanomolares. Essa estabilidade permite que atuem de forma incisiva na modulação de canais iônicos dependentes de voltagem, resultando em respostas rápidas e severas, como paralisia neuromuscular e convulsões, garantindo a imobilização imediata da presa ou do agressor (Saez; Herzig, 2019).

A elevada presença de resíduos de cisteína nessas toxinas favorece a formação de estruturas compactas, que adotam conformações globulares estabilizadas por múltiplas ligações dissulfeto. Essa organização confere elevada rigidez estrutural aos peptídeos, resultando em estabilidade excepcional frente à degradação por proteases, variações de pH e altas temperaturas (Herzig; King, 2015). Existem três motivos estruturais predominantes encontrados em neurotoxinas de aranhas.

O primeiro e mais predominante motivo estrutural é o ICK, do inglês *Inhibitor Cystine-Knot*, por vezes referido como “*knottin*”. Esse motivo é definido por uma folha- β antiparalela tripla estabilizada por seis resíduos de cisteína, apresentando a sequência consenso $C_I X_{2-7} - C_{II} X_{3-11} - C_{III} X_{0-7} - C_{IV} X_{1-17} - C V X_{1-19} - C_{VI}$, em que $C_I - C_{VI}$ correspondem à ordem das cisteínas na sequência primária e X_n indica o número de resíduos entre cisteínas adjacentes. O pareamento das ligações dissulfeto ocorre entre $C_I - C_{IV}$, $C_{II} - C_V$ e $C_{III} - C_{VI}$, sendo que a terceira ligação atravessa o anel formado pelas duas primeiras, configurando um nó estrutural que dá nome ao motivo (Figura 3C) (Norton; Pallaghy, 1998).

Além disso, o motivo estrutural ICK pode se diversificar em múltiplas variações estruturais. Na peçonha de *H. infensa*, demonstrou-se que a elevada diversidade estrutural observada resulta principalmente da duplicação e diversificação de um único gene ancestral codificador de *knottins*, com variações nos loops entre as cisteínas, adição de novas ligações dissulfeto e duplicações intragênicas, mantendo-se preservado o núcleo estrutural ICK. Dessa forma, o nó central garante a integridade conformacional da molécula, enquanto as variações nos loops permitem que a toxina se adapte a diferentes alvos moleculares (Pineda et al., 2020). Um exemplo notável dessa evolução estrutural em *H. infensa* é o peptídeo Hila, que apresenta uma arquitetura de nó duplo, consistindo em dois domínios ICK independentes conectados por um ligante curto (Chassagnon et al., 2017).

Outro motivo estrutural comumente encontrado em toxinas de aranhas é o motivo DDH, do inglês *disulfide direct β -hairpin*, denominado assim devido à formação de uma estrutura de grampo- β antiparalelo estabilizado por duas ligações dissulfeto obrigatórias (Figura 3E). Sua sequência principal é descrita como CX₅₋₁₉CX₂(G/P)X₂CX₆₋₁₉C, em que a presença de resíduos de glicina ou prolina na alça central auxilia na formação de uma estrutura estável (Wang et al., 2000). O arranjo das ligações dissulfeto no motivo DDH não apresenta o nó de cisteínas característico do ICK, o que resulta em um núcleo hidrofóbico robusto, porém com topologia menos complexa. O motivo DDH é considerado por alguns autores como um possível motivo ancestral do ICK (Escoubas; Rash, 2004).

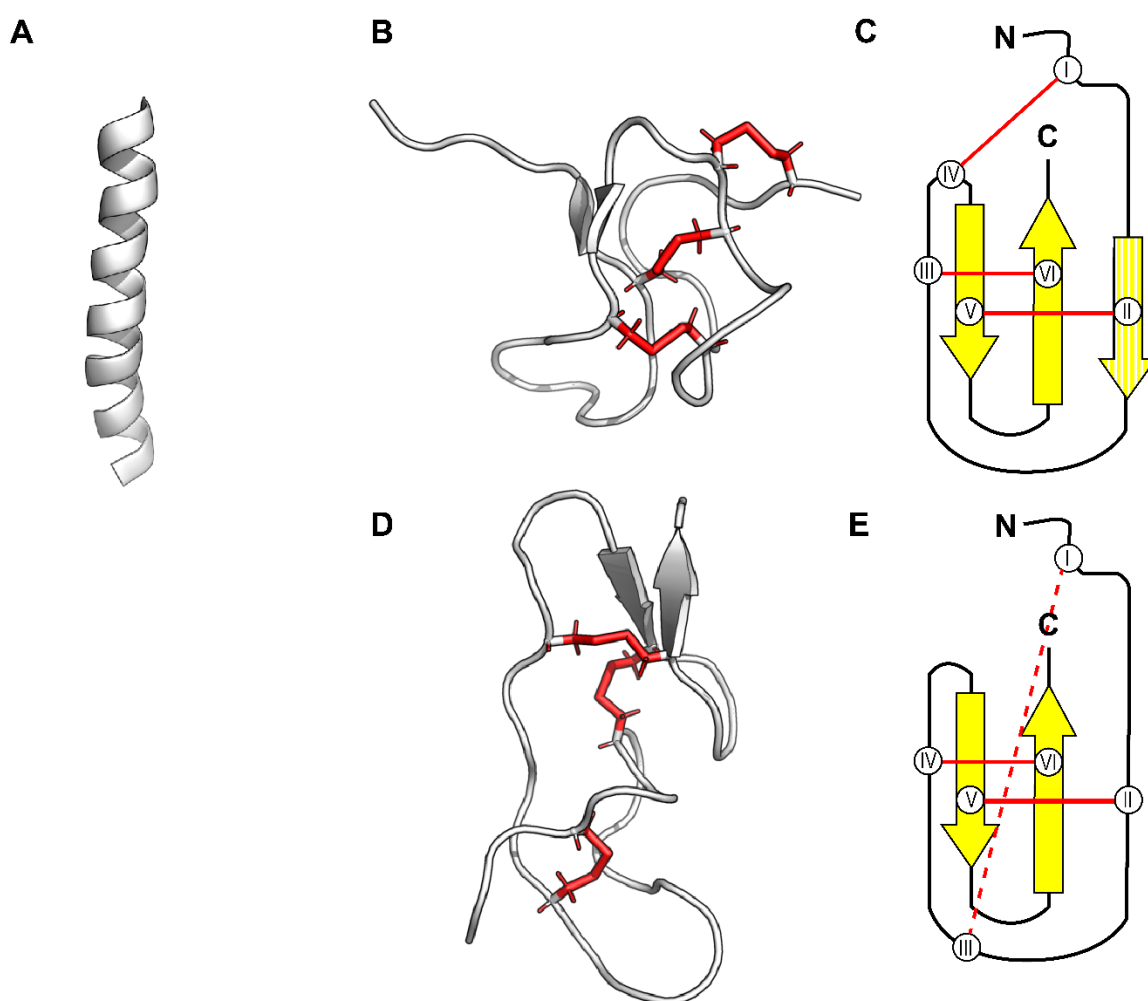


Figura 3 - Estruturas tridimensionais e motivos estruturais de peptídeos de aranhas. (A) Estrutura tridimensional do peptídeo linear antimicrobiano LyeTx-1 (UniProt: C0HJU9; PDB: 6CL3). (B) Estrutura representativa de toxina com motivo ICK, ω -GsTxSIA (UniProt: P60590; PDB: 1KOZ). (D) Estrutura representativa de toxina relacionada ao motivo DDH, Huwentoxin-II (UniProt: P82959; PDB: 1I25). As estruturas tridimensionais foram visualizadas e renderizadas no software PyMOL, com as ligações dissulfeto destacadas em vermelho. (C) Representação esquemática do motivo ICK, indicando as ligações dissulfeto (resíduos de cisteína numerados em algarismos romanos). (E) Representação esquemática do motivo estrutural DDH. Os esquemas (C) e (E) ilustram a evolução do dobramento básico DDH para o motivo ICK por meio da formação do *cystine knot* e da possível adição de uma terceira fita β ao motivo básico de β -hairpin com duas

ligações dissulfeto. A seta tracejada em (C) representa a terceira fita β , nem sempre observada em peptídeos ICK, enquanto a ligação tracejada em (E) indica a ligação dissulfeto adicional presente na Huwentoxin II como uma elaboração do motivo DDH básico. Os painéis (B–E) foram adaptados de (Escoubas; Rash, 2004)

Por último o motivo estrutural do tipo Kunitz apresenta uma conformação estabilizada por três ligações dissulfeto, com pareamento conservado entre as cisteínas C_I–C_{VI}, C_{II}–C_{IV} e C_{III}–C_V, que sustenta uma folha β -antiparalela de três fitas (Langenegger; Nentwig; Kuhn-Nentwig, 2019; Windley et al., 2012). Este motivo apresenta uma abrangência menor que os dois anteriores, sendo identificadas apenas na peçonha de duas aranhas da família Theraphosidae, *Haplopelma schmidtii* e *H. hainanum*, sendo descrita uma família de toxinas do tipo Kunitz com atividade inibitória sobre serinoproteases e efeito relativamente fraco sobre canais K_v1.1 (Peng; Lin; Liang, 2006; Yuan et al., 2008).

Além desses motivos principais, podem existir variações estruturais adicionais. Um exemplo são as murinotoxinas MnTx-1 e MnTx-2, isoladas de *Pterinophilus murinus*. Essas toxinas adotam um motivo estrutural alternativo evolutivamente distinto, denominado *Disulfide-Reined Hairpin* (DRH), algo como “grampo estabilizado por ligações dissulfeto”, não sendo variações do ICK nem do motivo DDH. A estrutura desses peptídeos segue o consenso C_IX₆–C_{II}X₅–C_{III}X₀–C_{IV}X₅–C_VX₉–C_{VI}, que se assemelha àquele encontrado em peptídeos do tipo ICK. Contudo, o pareamento das cisteínas ocorre entre C_I–C_{IV}, C_{II}–C_{VI}, e C_{III}–C_V, resultando em estruturas desprovidas do nó de cistina e da folha β antiparalela. Essas toxinas apresentam atividade como bloqueadores de poro de canais de potássio dependentes de voltagem, sendo altamente seletivas para canais da família Cav1 (Kuzmenkov et al., 2025).

1.5. Nomenclatura para toxinas

A nomenclatura racional proposta por King e colaboradores (2008) tem como objetivo padronizar a identificação de peptídeos oriundos de peçonhas animais, integrando em um único nome sistemático informações sobre a atividade farmacológica, a origem biológica e as relações evolutivas.

A estrutura do nome inicia-se com um descritor de atividade, representado por uma letra grega que indica o alvo molecular, como κ para canais de potássio ou ω para canais de cálcio

(Tabela 2). O núcleo do nome é baseado na família taxonômica do animal produtor da peçonha, como, por exemplo, “theraphotoxin” para a família Theraphosidae. Por fim, para a diferenciação específica, o sistema emprega um código de letras correspondente ao gênero e à espécie (por exemplo, Ap para *Acanthoscurria paulensis*), seguido de um numeral que distingue diferentes classes de toxinas e de uma letra minúscula final destinada à identificação de isoformas (King et al., 2008).

Tabela 2 – Nomenclatura de toxinas baseadas na função farmacológica. Adaptado de King et al., 2008

Descritor	Função biológica associada
α (alpha)	Receptor de acetilcolina
β (beta)	Desloca a dependência de voltagem da ativação de canais Nav
γ (gamma)	
δ (delta)	Retarda a inativação de canais Nav
ε (epsilon)	Canais de cloreto ClC
ζ (zeta)	Canais regulados por nucleotídeos cíclicos
η (eta)	Canais de potássio retificadores internos K _{IR}
θ (theta)	Canais de potássio de dois poros K _{2P}
ι (iota)	Agonista de canais Nav
κ (kappa)	Inibe canais K _V
λ (lambda)	Inibe canais de potássio ativados por cálcio K _{Ca}
μ (mu)	Inibe canais Nav
ν (nu)	Receptor de neurotensina
ξ (xi)	Receptor de endotelina
$\omicron$ (omicron)	Receptor de octopamina
π (pi)	Canais iônicos sensíveis a ácido ASICs
ρ (rho)	Adrenoceptor
σ (sigma)	Receptor 5-hidroxitriptamina (serotonina)
τ (tau)	Canal de potencial receptor transitório TRP
υ (upsilon)	Receptor de vasopressina/oxitocina
ϕ (phi)	Receptor de rianodina
χ (chi)	Transportador de noradrenalina
ψ (psi)	Antagonista não competitivo do receptor de acetilcolina
ω (omega)	Inibe canais de Cav
Γ (Gamma)	Receptor de glutamato
Λ (Lambda)	Receptor GABA
O (Omicron)	Receptor P2X
Σ (Sigma)	Canal CFTR
Ω (Omega)	Receptor do fator de crescimento epidérmico EGFR
Δ (Delta)	Atividade citolítica
U (<i>Unknown</i>)	Atividade desconhecida

1.6. Peçonha de aranha e seus potenciais farmacológicos

As peçonhas animais resultam de milhões de anos de seleção natural voltada à defesa e à predação, processo que levou ao surgimento de misturas complexas de compostos biologicamente ativos, caracterizadas por elevada potência e alta especificidade molecular. Entre esses compostos, os peptídeos derivados de peçonhas destacam-se pelo alto grau de seletividade por alvos fisiologicamente relevantes, uma característica altamente desejável no desenvolvimento de fármacos (Pennington; Czerwinski; Norton, 2018).

A literatura científica descreve diversas neurotoxinas oriundas de peçonhas de aranhas com elevada potência e seletividade refinada por isoformas específicas de canais iônicos. O peptídeo π -HXTX-H1a, isolado da aranha *H. infensa*, é um inibidor potente do canal iônico sensível a ácido 1a (ASIC1a), apresentando um IC₅₀ de 0,40 nM em ratos e 0,52 nM em humanos, sem afetar as isoformas ASIC2a ou ASIC3 (Chassagnon et al., 2017). Outro exemplo é a toxina β -TRTX-Cd1a, extraída da espécie *Ceratogyrus darlingi*, que inibe o canal Nav1.7 com um IC₅₀ de 16 nM, além de atuar sobre Cav2.2 (IC₅₀~3 μ M) (Sousa et al., 2017). Adicionalmente, a toxina κ -TRTX-Cg2a, também conhecida como Jingzhaotoxin-XII (JzTx-XII), proveniente da aranha *Chilobrachys jingzhao*, tem como alvo específico o canal de potássio Kv4.1, exibindo um valor de IC₅₀ de 0,363 μ M (Yuan et al., 2007). No campo dos canais de cálcio Cav, ω -TRTX-Pm1a, também conhecida como Cc1a, da espécie *Pelinobius muticus* (anteriormente *Citharischius crawshayi*), bloqueia seletivamente canais Cav do tipo L, Cav1.2 e Cav1.3, com IC₅₀ de 825 nM e 2,24 μ M, respectivamente (Klint et al., 2014).

O potencial clínico dessas neurotoxinas abrange diversas patologias neurológicas e sistêmicas. No tratamento do acidente vascular cerebral, o peptídeo H1a demonstrou capacidade de proteger o tecido neuronal mesmo quando administrado até oito horas após a lesão isquêmica (Chassagnon et al., 2017). Em distúrbios genéticos como a Síndrome de *Dravet*, uma encefalopatia epilética grave, a infusão intracerebroventricular de δ -theraphotoxin-Hm1a, uma toxina ativadora seletiva do canal Nav1.1 oriunda da aranha *Heteroscodra maculata*, mostrou-se eficaz em resgatar modelos animais de convulsões e morte prematura (Osteen et al., 2016; Richards et al., 2018). Além disso, derivados sintéticos como o PnPP-19, desenvolvido a partir da toxina PnTx2-6 (δ -CNTX-Pn2a) da peçonha da

aranha *Phoneutria nigriventer*, têm se mostrado promissores no tratamento da disfunção erétil, por modularem a via de sinalização do óxido nítrico sem a toxicidade associada à toxina nativa, encontrando-se atualmente em fase de avaliação clínica (Silva et al., 2022). Evidências pré-clínicas adicionais indicam que o PnPP-19 também reduz a pressão intraocular e preserva células ganglionares da retina em modelos experimentais de hipertensão ocular, sugerindo potencial aplicação futura no tratamento do glaucoma (Silva et al., 2020).

Além das aplicações biomédicas, neurotoxinas de aranhas apresentam elevado potencial biotecnológico como biopesticidas ecológicos. A toxina ω/κ -HXTX-Hv1a, derivada de peçonha da aranha *Hadronyche versuta*, é o princípio ativo do produto comercial *Spear T*® (*Vestaron Corporation*), atuando seletivamente sobre canais BK_{Ca} e Cav de insetos (Chong et al., 2007a; Tedford et al., 2004b). Esse bioinseticida é aplicado no controle de pragas agrícolas, apresentando eficácia contra múltiplas ordens de insetos, ao mesmo tempo em que exibe elevada seletividade filética, sendo seguro para mamíferos e abelhas (Vestaron, 2026). A seletividade filética é um aspecto central no desenvolvimento de bioinseticidas, como exemplificado pela toxina μ -TRTX-Ae1a, isolada de *Augacephalus ezendami*, cuja especificidade por insetos decorre de variações na sequência do loop S1-S2 do DII dos canais Nav . Um único resíduo nessa região é determinante para a interação com o sensor de voltagem, possibilitando o controle direcionado de pragas sem efeitos adversos sobre vertebrados (Herzig et al., 2016).

1.7. Peptídeos de aranhas com ação em canais Cav

Além das ω -agatoxinas, existem outros exemplos de ω -toxinas oriundas de peçonhas de aranhas, incluindo espécies da família Theraphosidae. Entre as mais proeminentes está a SNX-482 (ω -TRTX-Hg1a), uma toxina composta por 41 resíduos de aminoácidos, estabilizada por quatro ligações dissulfeto, isolada da aranha caranguejeira *Hysteroocrates gigas*. Essa toxina é descrita como o inibidor mais potente e seletivo conhecido para os canais $Cav2.3$ (Bourinet et al., 2001). Seu mecanismo de ação envolve a interferência no processo de abertura do canal, deslocando o potencial de ativação para valores mais positivos, o que impede sua abertura em potenciais de membrana fisiológicos. Essa inibição é mediada por interações da toxina com os domínios DIII e DIV. Embora seja altamente potente contra canais do tipo R, a SNX-482 também pode inibir parcialmente e de forma reversível os canais $Cav1.2$, indicando que não

apresenta seletividade absoluta (Bourinet et al., 2001).

Na peçonha da aranha chinesa *Ornithoctonus huwena* também foram identificadas ω -toxinas, entre as quais se destaca a μ/ω -TRTX-Hs1a, conhecida como Huwentoxin-I (HWTX-I). Essa toxina apresenta seletividade relevante, inibindo especificamente correntes de cálcio do tipo N, mediadas por canais Cav2.2, e exercendo apenas um efeito fraco sobre canais do tipo L (Cav1). A inibição é dependente da dose, com um EC₅₀ em torno de 100 nM em células diferenciadas. Em concentrações elevadas, o bloqueio ocorre de forma rápida e pode ser revertido lentamente após a remoção da toxina (Peng; Chen; Liang, 2001).

Outro exemplo de Huwentoxin com atividade sobre canais Cav é a HWTX-X, uma toxina peptídica composta por 28 resíduos de aminoácidos que atua como um bloqueador específico, potente e completamente reversível dos canais Cav2.2 em neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos, apresentando um IC₅₀ de aproximadamente 40 nM. Ensaios eletrofisiológicos de competitividade demonstraram ainda que a HWTX-X e a ω -conotoxina GVIA competem diretamente por sítios de ligação sobrepostos, ou parcialmente sobrepostos, nesses canais (Liu et al., 2006).

1.8.Acanthoscurria paulensis

A *Acanthoscurria paulensis* é uma espécie de aranha caranguejeira da família Theraphosidae, descrita originalmente por Mello-Leitão (1923) a partir de um exemplar macho coletado em Pirassununga, São Paulo. Por décadas, a compreensão taxonômica da espécie permaneceu limitada, uma vez que o holótipo original foi considerado perdido e a descrição inicial carecia de detalhes sobre características morfológicas essenciais. Posteriormente, Lucas e colaboradores (2010) realizaram uma revisão taxonômica abrangente, incluindo a redescrição do macho e, pela primeira vez, a descrição da fêmea.

A distribuição geográfica dessa aranha é ampla no território brasileiro, com registros em diversos estados, como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e Rio Grande do Sul. Caracterizada por seu grande porte, com comprimento total frequentemente superior a 50 mm, *A. paulensis* (Figura 4) apresenta carapaça de coloração marrom-escura, com bordas recobertas por pelos avermelhados, enquanto o abdômen é preto e densamente coberto por cerdas longas e avermelhadas (Lucas et al., 2010).

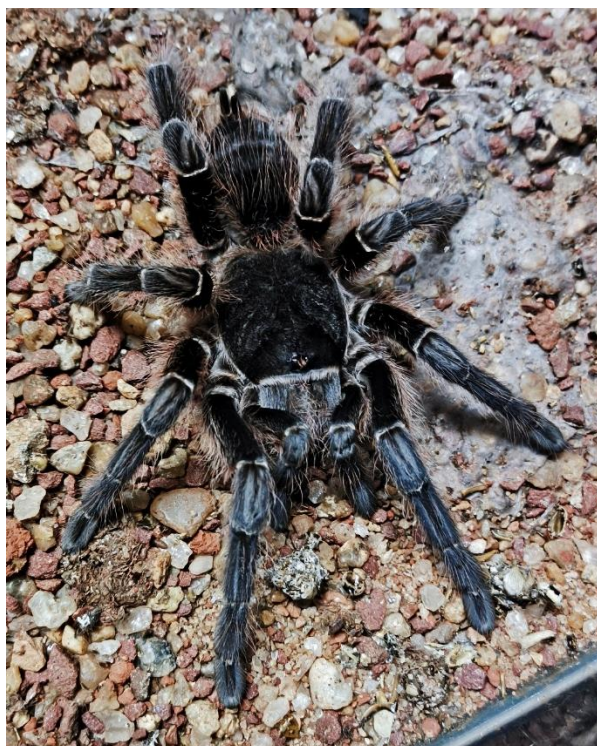


Figura 4 - Espécime de *Acanthoscurria paulensis*. Foto: Jonathan Nascimento.

1.9. Estudos prévios com a peçonha de *A. paulensis*

A peçonha da aranha caranguejeira *A. paulensis* constitui uma mistura bioquímica altamente complexa, composta por cerca de 97 componentes distintos, com massas moleculares variando entre 601,4 e 21.932,3 Da (Mourão et al., 2013a). Entre esses componentes, a fração peptídica é particularmente relevante, sendo a toxina Apl1a o componente mais expressivo e amplamente investigado, responsável por aproximadamente 8% da composição total da peçonha (Mourão et al., 2013b).

A Apl1a foi o primeiro peptídeo isolado e caracterizado a partir da peçonha de *A. paulensis*, destacando-se como o peptídeo mais abundante. Trata-se de um peptídeo composto por 48 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 5457,79 Da, que apresenta identidade sequencial entre 60% e 84% com toxinas da família da huwentoxina-II (HWTX-II). No entanto, diferentemente da HWTX-II, que adota um motivo estrutural do tipo DDH, a Apl1a apresenta um arranjo estrutural do tipo ICK (Mourão et al., 2013b).

Ensaio *in vivo* revelaram efeitos neurotóxicos robustos em diferentes modelos experimentais. Em lagartas da espécie *Spodoptera frugiperda*, a Apl1a induziu paralisia

reversível e dependente da dose, com ED_{50} de 13,01 $\mu\text{g/g}$, evidenciando seu potencial inseticida. Em experimentos utilizando o circuito de fibras gigantes (GF) de *Drosophila melanogaster*, a toxina reduziu a amplitude e a frequência das respostas musculares, sugerindo uma ação direta nas junções neuromusculares. Em mamíferos, a administração intracraniana em camundongos provocou convulsões generalizadas persistentes, evoluindo para *status epilepticus* e culminando em morte por falência respiratória (Mourão et al., 2013b).

Apesar desse conjunto consistente de efeitos fisiológicos, os mecanismos moleculares subjacentes à ação da Apl1a permaneceram por longo tempo indefinidos. Uma extensa triagem *in vitro*, envolvendo diversos ensaios eletrofisiológicos, foi realizada durante anos de investigação por este grupo de pesquisa, sem que fosse possível a identificação de um alvo molecular específico para essa toxina. A Apl1a foi testada, na concentração de 1 μM , em canais de sódio dependentes de voltagem humanos (Nav1.1 a Nav1.8), de insetos e aracnídeos (BgNav1 e VdNav1), além de canais de potássio (Shaker, Shab, Shal, Shaw, Kv1.1, rKv4.2, rKv4.3, hKv7 e KQT1), receptores nicotínicos de acetilcolina, receptores de glutamato e canais de cloreto ativados por glutamato (GluCl), sendo empregada a concentração de 10 μM especificamente para estes últimos. Contudo, nenhum efeito funcional consistente foi observado nesses alvos (Garcia et al., 2025; Mourão et al., 2013b).

Em ensaios eletrofisiológicos posteriores (Garcia et al., 2025), a aplicação de 1 μM de Apl1a inibiu significativamente canais Nav, com redução da corrente de pico em hNav1.7 ($32,28 \pm 5,96\%$), hNav1.1 ($26,14 \pm 11,84\%$), hNav1.3 ($18,09 \pm 7,15\%$) e hNav1.8 ($14,96 \pm 3,56\%$), além de promover deslocamentos da curva de ativação e da inativação em estado estacionário para potenciais mais hiperpolarizados em hNav1.1, hNav1.3 e hNav1.7, mas não em hNav1.8. Quanto aos canais de potássio, a Apl1a não apresentou atividade significativa sobre rKv1.1 e hKv7.1, mas promoveu inibição modesta dos canais da família Kv4, com $6,83 \pm 2,03\%$ em rKv4.2 e $14,76 \pm 1,56\%$ em rKv4.3. Ensaios adicionais em oócitos de *Xenopus laevis* demonstraram ausência de efeito da Apl1a sobre canais de sódio de insetos e aracnídeos (BgNav1 e VdNav1), bem como sobre canais de potássio rKv1.1, rKv4.2, rKv4.3, hKv1.1, Kv7.1 e KQT1, além de não modular canais de cloreto ativados por glutamato (GluCl). Além disso, ensaios de ligação com [^3H]-L-glutamato em sinaptossomos de rato não evidenciaram deslocamento do ligante em uma ampla faixa de concentrações (0,01–1000 μM), indicando ausência de interação direta com sítios de ligação de glutamato (Garcia et al., 2025).

Os resultados *in vivo* observados após a injeção intracraniana em camundongos, assim como aqueles obtidos no circuito de fibras gigantes de *D. melanogaster*, constituem fortes indícios de que a toxina exerce sua ação primária sobre canais Cav localizados em terminais pré-sinápticos. Em *D. melanogaster*, as junções neuromusculares utilizam majoritariamente o glutamato como neurotransmissor excitatório, de modo que a liberação sináptica depende do influxo de Ca^{2+} através de canais Cav ativados pela despolarização do terminal pré-sináptico (Ashley; Carrillo, 2025). Assim, a modulação desses canais pode comprometer diretamente a liberação de glutamato, resultando em alterações na transmissão neuromuscular compatíveis com a redução da amplitude e da frequência das respostas musculares observadas.

De forma análoga, em mamíferos, a liberação de glutamato no sistema nervoso central é fortemente regulada pela atividade de canais Cav pré-sinápticos, especialmente aqueles do subtipo Cav2, cuja modulação pode levar a desequilíbrios excitatórios severos (Dolphin; Lee, 2020). Nesse contexto, a interferência na dinâmica desses canais poderia explicar os quadros de hiperexcitabilidade neuronal, convulsões generalizadas e *status epilepticus* observados após a administração intracraniana da toxina em camundongos. Essa hipótese é adicionalmente sustentada pela identificação posterior das toxinas Ap2, Ap3 e Ap5, classificadas como ω -toxinas capazes de inibir seletivamente até 31% das correntes mediadas pelo canal Cav2.1 (tipo P/Q) (Tibery et al., 2021), reforçando a noção de que a peçonha de *A. paulensis* constitui uma fonte relevante de moduladores de canais Cav.

2. Justificativa

A investigação de peptídeos capazes de modular a atividade de canais iônicos dependentes de voltagem representa um campo de grande relevância científica, farmacológica e biotecnológica, tanto pela contribuição ao entendimento dos mecanismos moleculares que regulam a excitabilidade celular quanto pelo potencial uso dessas moléculas como ferramentas farmacológicas e protótipos terapêuticos. Nesse contexto, os peptídeos ricos em ligações dissulfeto presentes na peçonha de aranhas têm se destacado por exibirem elevada afinidade e seletividade por canais iônicos, especialmente aqueles envolvidos na transmissão sináptica e na geração de potenciais de ação.

A peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis* tem sido objeto de estudo contínuo ao longo dos últimos anos, com a identificação de diversos peptídeos bioativos. Dentre esses componentes, a toxina Apl1 destaca-se por ser um dos peptídeos mais abundantes dessa peçonha, além de apresentar atividade biológica relevante mesmo em baixas concentrações. Apesar disso, estudos prévios baseados em ensaios *in vivo* demonstraram que a Apl1 apresenta atividade neurotóxica significativa, os mecanismos moleculares subjacentes à sua ação, bem como a caracterização detalhada de seus alvos específicos, ainda permanecem incompletamente elucidados.

Cabe destacar que, ao longo dos últimos anos, a Apl1 foi submetida a uma ampla e sistemática triagem funcional envolvendo diferentes classes de canais iônicos e receptores. Apesar dessa investigação extensiva, não foram identificados efeitos consistentes que explicassem de forma satisfatória os marcantes fenótipos neurotóxicos observados *in vivo*. Em contraste, os dados fisiológicos obtidos em modelos experimentais apontam para alterações compatíveis com comprometimento da liberação sináptica dependente de Ca^{2+} , o que sugere a possível participação de canais Cav, especialmente aqueles localizados em terminais pré-sinápticos. Ainda assim, esses canais não haviam sido previamente avaliados de maneira sistemática como potenciais alvos da Apl1. Dessa forma, a escolha dos canais Cav como foco do presente estudo baseia-se tanto na exclusão experimental prévia de outros alvos clássicos quanto na coerência fisiológica entre os efeitos observados e o papel central desses canais na regulação da liberação de neurotransmissores.

Considerando que disfunções em canais iônicos dependentes de voltagem estão associadas a diversas patologias humanas, como dor crônica, epilepsias e enxaquecas, a

caracterização aprofundada de toxinas como a Ap1a é fundamental não apenas para o avanço do conhecimento básico, mas também para sua aplicação como ferramenta experimental na investigação desses alvos moleculares. Assim, ao invés de uma prospecção ampla por novos peptídeos, o presente estudo justifica-se pela necessidade de aprofundar a caracterização funcional e farmacológica da Ap1a, contribuindo para a consolidação do conhecimento sobre uma toxina abundante, biologicamente ativa e ainda insuficientemente compreendida da peçonha de *Acanthoscurria paulensis*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Realizar a caracterização da atividade eletrofisiológica da toxina Apl^a, previamente descrita da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*, em canais de cálcio dependentes de voltagem utilizando a técnica de *Patch Clamp*.

3.2. Objetivos Específicos

- Purificação do peptídeo Apl^a presente na peçonha da aranha *Acanthoscurria paulensis*
- Avaliação da ação do peptídeo Apl^a por meio de ensaios eletrofisiológicos nos canais Cav1.2, Cav2.1, Cav2.2, Cav2.3 e Cav3.1.

4. Material e métodos

4.1. Extração da Peçonha por eletroestimulação

Foram utilizados espécimes adultos da aranha *Acanthoscurria paulensis*, coletados com licença do ICMBio (24227-1) e mantidos vivos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados periodicamente e mantidos com acesso contínuo à água. A peçonha foi obtida por meio de estimulação elétrica da região basal das quelíceras, sendo coletada mensalmente em tubos de polietileno de 1,5 mL. As amostras foram ressuspensas em água Milli-Q e centrifugadas a $10.000 \times g$ por 15 minutos, visando à remoção de material particulado. O sobrenadante foi quantificado por espectrofotometria UV a 280 nm (NanoVue®, GE Healthcare), seco a vácuo em concentrador SpeedVac e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

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

4.2.1. Fracionamento da Peçonha Bruta

Alíquotas de 4,0 mg de peçonha bruta foram ressuspensas em uma solução de 0,12% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) em água. O material foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em LC10A Shimadzu Co. (Kyoto, Japão), utilizando uma coluna semi-preparativa C18 (Phenomenex, EUA). A eluição foi realizada com um gradiente binário composto por solução aquosa de TFA 0,12% (solução A) e solução de acetonitrila (ACN) contendo TFA 0,1% (solução B), sob fluxo de 1,5 mL/min, com detecção de absorvância em 216 e 280 nm. O gradiente consistiu em: 0% de solução B por 10 minutos; aumento linear de 0 a 60% de B ao longo de 60 minutos; de 60 a 100% de B em 10 minutos; manutenção em 100% de B por 10 minutos, seguida de reequilíbrio da coluna com a solução A. As frações cromatográficas foram coletadas, secas a vácuo e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a etapa de purificação.

4.2.2. Purificação do peptídeo Ap1a

A fração contendo o peptídeo Ap1a foi submetida a uma etapa adicional de purificação utilizando uma coluna analítica Synergi 4 μm Fusion-RP 80 Å (Phenomenex, EUA), sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 216 e 280 nm. Para a eluição, foram empregadas as mesmas

soluções A e B descritas anteriormente, com um gradiente de acetonitrila otimizado, representado por aumento de 20 a 25% da solução B entre 0 e 5 minutos, seguido de um gradiente linear de 25 a 32% de B entre 5 e 45 minutos. As frações correspondentes ao peptídeo Apl1a foram coletadas, secas a vácuo e armazenadas a -20°C .

4.3. Espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF MS)

O grau de pureza do peptídeo Apl1a e a determinação de sua massa molecular experimental foram avaliados por espectrometria de massa em um sistema MALDI-TOF/TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras foram solubilizadas em água deionizada e misturadas a uma matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, preparada em acetonitrila/água/TFA 3% (5:4:1, v/v/v), na proporção de 2 μL de amostra para 2 μL de matriz. A mistura foi depositada em placa de aço inox AnchorChip (600 μm) e seca à temperatura ambiente. As análises foram realizadas no modo refletido para determinação da massa monoisotópica, utilizando o software FlexAnalysis versão 3.3.

4.4. Quantificação dos peptídeos (Colorimetria BCA-Cobre)

A quantificação dos peptídeos purificados foi realizada utilizando o kit BCA Protein Assay Kit® (Thermo Fisher Scientific), seguindo o protocolo *enhanced*. As amostras foram diluídas, misturadas aos reagentes do kit na proporção 1:1 e incubadas a 60°C por 30 minutos. A absorbância foi medida a 562 nm, e as concentrações foram determinadas por interpolação em curva padrão construída com albumina sérica bovina.

4.5. Busca por similaridade

As sequências completas obtidas foram submetidas a buscas de similaridade utilizando a ferramenta BlastP, disponível online em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Os alinhamentos das sequências foram realizados utilizando a ferramenta Clustal Omega, disponível online em <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

4.6. Culturas de células expressando canais de cálcio dependentes de voltagem

Células HEK293T, derivadas de rim embrionário humano e portadoras do antígeno T

do vírus SV40, foram mantidas em cultivo em meio DMEM suplementado com glicose (4,5 g/L), soro fetal bovino (10%) e Antibiotic-Antimycotic® (1%; Gibco). As culturas foram acondicionadas em incubadora a 37 °C, sob atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. A linhagem celular foi adquirida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para a expressão heteróloga dos canais de cálcio, células cultivadas em placas de Petri de 40 × 10 mm, apresentando confluência entre 70 e 90%, foram submetidas à transfecção transiente utilizando o reagente Lipofectamine 3000® (Thermo Fisher Scientific), diluído em meio Opti-MEM® (Gibco). A transfecção foi realizada com a introdução simultânea dos plasmídeos pcDNA6-CaV α , pcDNA3.1-CaV β 3, pcDNA3.1- α 2 δ 1 e pEGFP-C1, empregando-se as quantidades relativas de 1:1:1:0,1 μ g, respectivamente.

4.7. Eletrofisiologia – *Setup* experimental para *Patch Clamp*

4.7.1. Ensaios eletrofisiológicos em canais de cálcio dependentes de voltagem

Os registros eletrofisiológicos foram realizados pela técnica de *Patch Clamp* na configuração *Whole Cell*, utilizando o amplificador EPC-10 e o *software* PatchMaster. As micropipetas foram confeccionadas e preenchidas com solução interna contendo (em mM): 126 CsCl₂, 10 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES e 4 MgATP (pH 7,3 com CsOH). As células foram banhadas em solução externa contendo (em mM): 5 BaCl₂, 135 colina-Cl, 10 HEPES e 4 MgCl₂ (pH 7,4 com CsOH). As micropipetas apresentaram resistências entre 1,5 e 3,5 M Ω . As correntes capacitivas foram compensadas por protocolo p/4, com potencial de repouso em –100 mV.

Diferentes protocolos de voltagem foram empregados de acordo com o subtipo de canal avaliado e com o parâmetro eletrofisiológico de interesse, incluindo a análise da inibição da corrente, da cinética de ativação e da inativação em estado estacionário (*steady-state inactivation*, SSI). Para a quantificação da inibição da corrente mediada pelos canais de cálcio de alta voltagem (HVA), foi utilizado um protocolo de pulso único, no qual as células foram mantidas em potencial de repouso de –80 mV e submetidas a um pulso despolarizante para +5 mV, com duração de 40 ms, seguido por um passo de retorno para –50 mV (Figura 5A). A amplitude da corrente foi medida no pico da resposta evocada, antes e após a aplicação do peptídeo, permitindo o cálculo da porcentagem de inibição.

Para o canal Cav3.1, a inibição da corrente foi avaliada utilizando um protocolo específico para canais de cálcio de baixa voltagem de ativação (LVA), no qual as células foram

mantidas a -80 mV e estimuladas com um pulso despolarizante para -15 mV, com duração de 100 ms, seguido de um passo para -50 mV (Figura 5B). A amplitude da corrente foi mensurada no pico da resposta, sendo posteriormente utilizada para o cálculo da inibição de corrente.

A cinética de ativação dos canais HVA foi investigada por meio de um protocolo de corrente-voltagem (I/V), no qual as células foram mantidas a -80 mV e submetidas a uma série de pulsos despolarizantes incrementais de 5 mV por *sweep*, variando de -60 mV até $+25$ mV (Figura 5C). As correntes evocadas foram utilizadas para a construção das curvas I/V e para a análise das propriedades de ativação dos canais.

Para a caracterização da ativação e da inativação em estado estacionário (SSI) do canal Cav3.1, foi empregado um protocolo composto por uma série de pulsos condicionantes aplicados em incrementos de 5 mV, variando de -130 mV a -20 mV, a partir de um potencial de repouso de -100 mV, seguidos por um pulso teste para -20 mV e retorno a -100 mV (Figura 5D). As correntes evocadas durante os pulsos condicionantes foram utilizadas para a construção das curvas de ativação, enquanto as correntes registradas durante o pulso teste foram empregadas para a análise da inativação em estado estacionário (SSI) do canal Cav3.1.

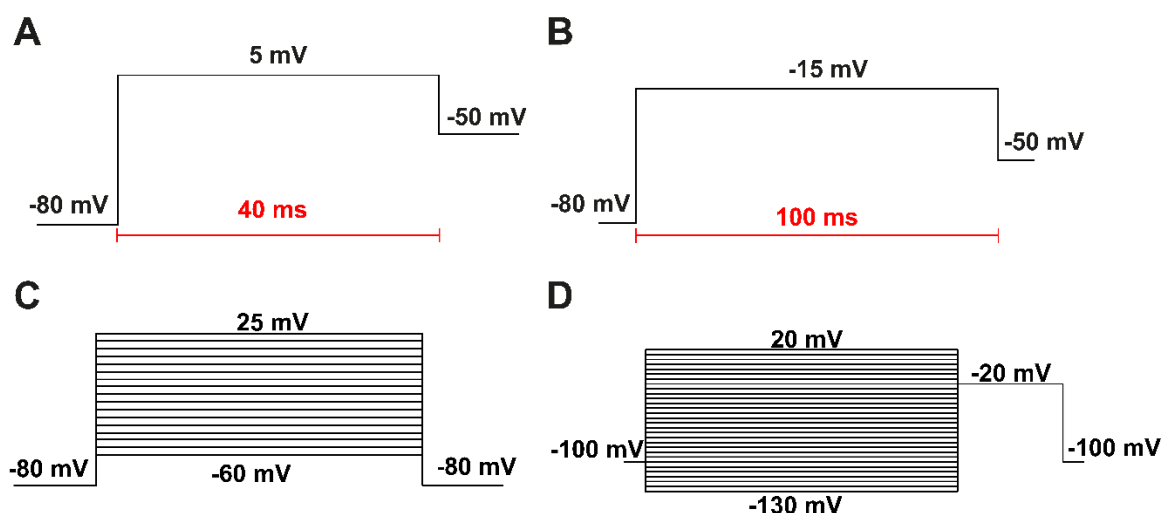


Figura 5 – Protocolos de voltagem utilizados nos ensaios eletrofisiológicos em canais de cálcio dependentes de voltagem. (A) Protocolo de pulso único empregado para o cálculo da inibição da corrente em canais de alta voltagem de ativação (HVA), a partir de um potencial de repouso de -80 mV, com pulso despolarizante para $+5$ mV (40 ms). (B) Protocolo utilizado para a avaliação da inibição da corrente do canal Cav3.1, com pulso despolarizante para -15 mV (100 ms), a partir de -80 mV. (C) Protocolo corrente-voltagem (I/V) empregado para a análise da cinética de ativação dos canais HVA, com pulsos incrementais de $+5$ mV, entre -60 mV e $+25$ mV. (D) Protocolo utilizado para a avaliação

da ativação e da inativação em estado estacionário (SSI) do canal Cav3.1, envolvendo pulsos de pré-condicionamento de 5mV, entre -130 mV e -20 mV, seguidos por pulso teste a -20 mV.

4.7.2. Análise de dados

As correntes de cálcio em *Patch Clamp* na configuração *Whole Cell* apresentam uma diminuição da amplitude da corrente conhecida como *Rundown*. Assim, para que fosse possível a avaliação da percentagem de bloqueio de um composto sobre um canal que sofre *Rundown* foi necessário estimar o valor de corrente controle (I_{Pred}) correspondente ao mesmo tempo do valor da corrente na presença do composto avaliado, assumindo a tendência linear na ausência da toxina, levando em consideração o número de *sweep* decorridos a partir da aplicação da toxina.

A corrente controle foi estipulada com a seguinte fórmula:

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

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

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

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

As diferenças entre as médias foram avaliadas estatisticamente com Teste T pareado e sendo considerados estatisticamente quando obtido o valor de $P < 0,05$. As análises foram realizadas usando o *software* GraphPad prism 5.

5. Resultados

5.1. Purificação

A purificação da toxina Ap1a ocorreu em duas etapas sucessivas de cromatografia, obtendo-se aproximadamente 90 µg de peptídeo purificado. Na primeira etapa, foi empregada uma coluna semi-preparativa C18 (*Phenomenex*), sendo selecionada a fração que eluiu em 42 % de acetonitrila, no tempo de 52 minutos (Figura 6). Essa fração foi então novamente submetida à cromatografia, utilizando uma coluna Synergi 4 µm Fusion-RP 80 Å (*Phenomenex*), com ajustes nos parâmetros experimentais visando a otimização do método e o isolamento do composto de interesse. O peptídeo alvo eluiu em 25,9% de acetonitrila, com tempo de retenção de 10,2 minutos (Figura 7).

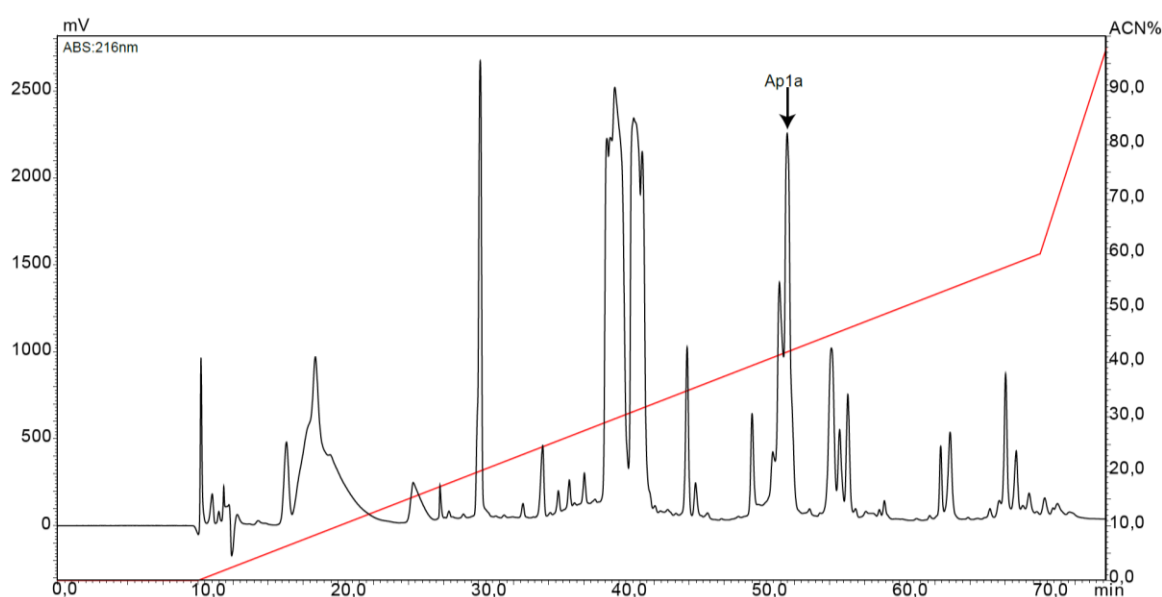


Figura 6 – Cromatograma obtido por RP-HPLC de 4 mg de peçonha bruta de *A. paulensis*. O fracionamento foi realizado com gradiente de acetonitrila indicado pela linha vermelha, fluxo de 1,5 mL/min e monitoramento da absorbância a 216 nm. A seta indica a fração cromatográfica contendo o peptídeo Ap1a.

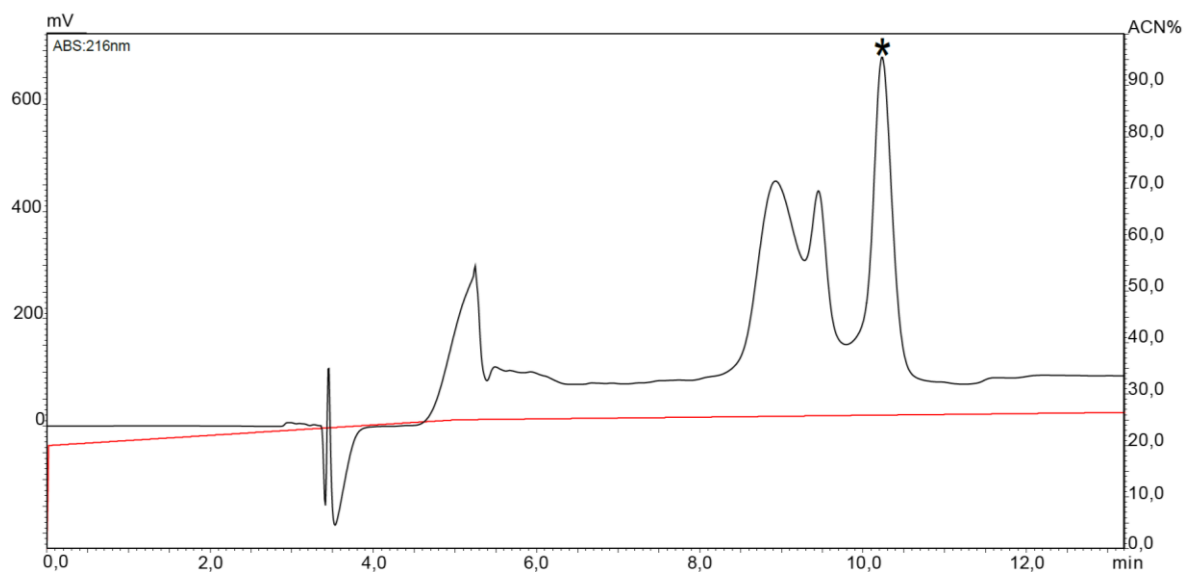


Figura 7 – Cromatograma da purificação do peptídeo Ap1a. A purificação foi realizada com gradiente de acetonitrila indicado pela linha vermelha, fluxo de 1,0 mL/min e monitoramento da absorbância a 216 nm. O asterisco representa a fração cromatográfica selecionada.

Após a segunda etapa cromatográfica, a amostra teve sua massa molecular validada por espectrometria de massas do tipo MALDI TOF/TOF, operando no modo refletido. A massa monoisotópica experimental do peptídeo Ap1a foi de 5.457,77 Da (Figura 8).

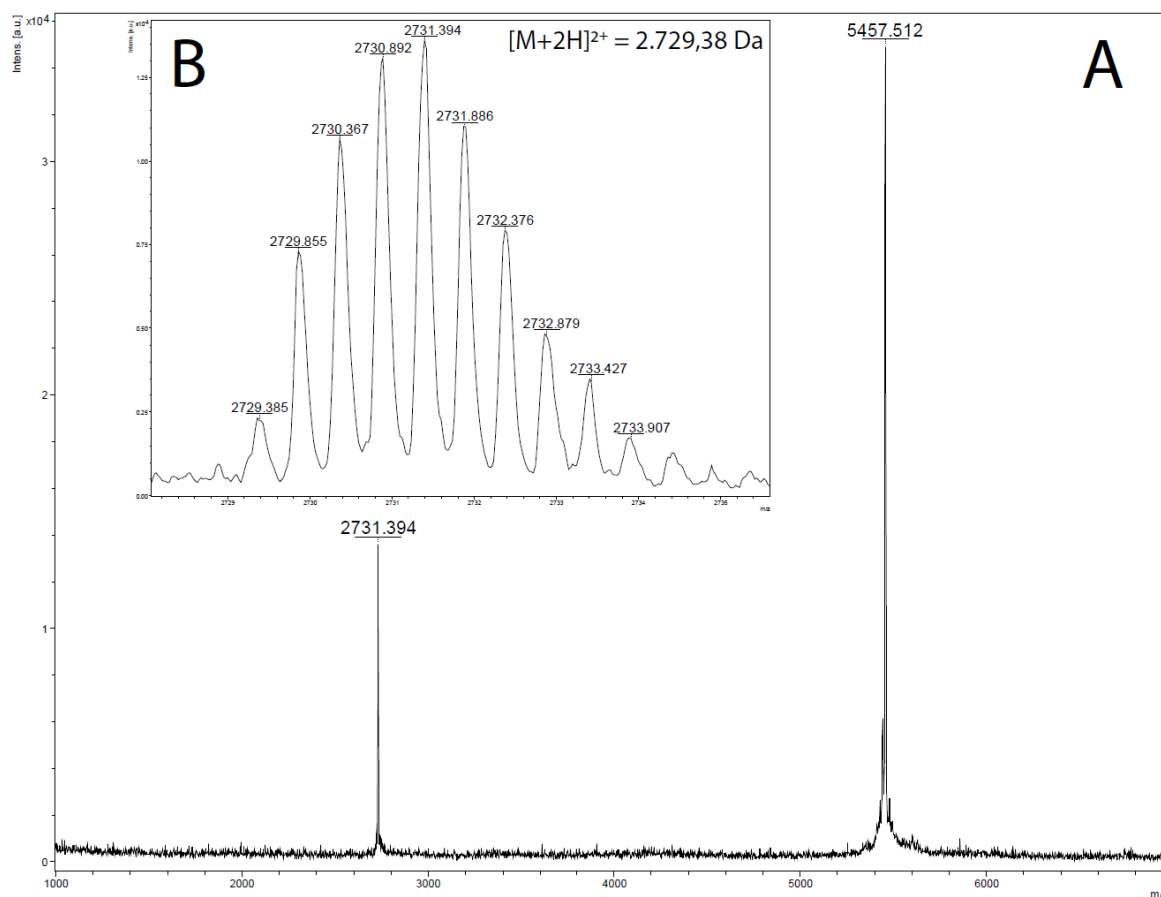


Figura 8 – Espectro de massas do peptídeo Ap1a. (A) Determinação da massa molecular monoisotópica $[M+H]^+$ de 5.457,51 Da do peptídeo Ap1a por espectrometria de massa (MS) no modo refletido. (B) Determinação da massa molecular monoisotópica do íon $[M+2H]^{2+}$ de 2.729,38 Da por espectrometria de massa no modo refletido, correspondendo a uma massa experimental total de 5.457,77 Da.

5.2. Alinhamento de sequências

A investigação de similaridade da sequência do peptídeo Ap1a (Figura 9) foi realizada através do software *BlastP*, consultado via NCBI < <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Para o alinhamento das sequências, empregou-se o programa *Clustal Omega*, disponível na plataforma EMBL-EBI < <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>>.

Toxina		10	20	30	40	50	ID %
B3FIT4 HWTX-VII	-FEC	SISCEIEKKGE-----	SCKPK-----	ECKGGWKCKFNMCVKV			47.92
P82959 HWTX-II	LFEC	SFSCEIEKEGD-----	KPCKKK-----	KCKGGWKCKFNMCVKV			52.08
M5B4R6 GTx4-1	IFEC	VMACDIEKDPD-VYEG	KPKPKK-----	NKECKGGWRCKFKMCMKV			60.42
B3EWY4 Ap1a	IIEC	FFSCEIEKDGKS-KEG	KPKPKGD-----	KNKDKKCSGGWRCKIKMCLKI			100.0
P0DQJ3 U1-TRTX-Agm1a	IIEC	FFSCEIEKDGKS-KEG	KPKPKGD-----	KDKDKKCSGGWRCKIKMCLKI			97.92
B3A0P0 Mu-TRTX-An1a	IIEC	FFSCEIEKDGKS-KEG	KPKPKGD-----	KDKDKKCSGGWRCKIKMCLKI			93.75
P0DM69 Toxin OAIP5	-FEC	VLKCDIQYNG-----	KNCKGKG-----	ENKCSGGWRCKFKLCLKI			50.00
H7CEL7 GTx4-5	IFEC	VMACDIEKDGEYVNN	NPKPKK-----	EQKCTGGWRCKLKLCLKV			57.14
H7CEL8 GTx4-6	IFEC	VMACDIEKDGEYVNN	DPKPKK-----	EQKCTGGWRCKLKLCLKV			57.14
Q5Q114 U1-TRTX-Lsp1b	LFEC	TFECDIKKEG-----	KPKPKGCKCDDKDN	KDHKKCSGGWRCKLKLCLKI			55.56
P61506 U1-TRTX-Lp1b	FFEC	TLECDIKKEG-----	KPKPKGCKCNDKDN	KDHKKCSGGWRCKLKLCLKF			62.00
Q5Q113 U1-TRTX-Lsp1c	FFEC	TFECDIKKEG-----	KPKPKGCKCDDKDN	KDHKKCSGGWRCKLKLCLKF			59.62
P0CC19 U1-TRTX-Lsp1a	FFEC	TFECDIKKEG-----	KPKPKGCKCDDKDN	KDHKKCSGGWRCKLKLCLKF			61.54
P0CC18 U1-TRTX-Lp1a	FFEC	TFECDIKKEG-----	KPKPKGCKCDDKDN	KDHKKCSGGWRCKLKLCLKF			62.00
P85497 Omega-TRTX-Ba1a	IIEC	VFSCDIEKKEG-----	KPKPKG-----	EKKCTGGWRCKIKLCLKI			66.67
P85504 Omega-TRTX-Ba1b	IFEC	VFSCDIEKKEG-----	KPKPKG-----	EKKCTGGWRCKIKLCLKI			66.67
P0DM09 Omega-TRTX-Ba1c	IIEC	VFSCDIEKKEG-----	KPKPKG-----	EKKCTGGWKCKIKLCLKI			66.67
P61509 Omega-TRTX-Asp1f	IFEC	VFSCDIEKKEG-----	KPKPKG-----	EKKCTGGWKCKIKLCLKI			66.67
P0DL79 Omega-TRTX-Bs1b	IIEC	VFSCDIEKKEG-----	KPKPKG-----	EKKCSGGWKCKIKLCLKI			70.83
P0DL80 Omega-TRTX-Bs1a	IFEC	VFSCDIEKKEG-----	KPKPKG-----	EKKCSGGWKCKIKLCLKI			68.75
P0DL81 Omega-TRTX-Asp1a	LFEC	VLSCDIIKNG-----	KPKPKG-----	EKKCSGGWRCKINFCLKV			58.33
P0DL78 U1-TRTX-Ct1b	-FEC	SLSCDIIKNG-----	KPKGSG-----	EKKCSGGWRCKMNFCLKF			53.19
P0DL77 U1-TRTX-Ct1a	LFEC	SFSCDIIKNG-----	KPKGSG-----	EKKCSGGWRCKMNFCLKV			52.08
B1P1A6 U3-TRTX-Cg1a	LFEC	SFSCDIIKNG-----	KPKGSG-----	EKKCSGGWRCKMNFCLKV			52.08
B1P1A7 U3-TRTX-Cg1b	IFEC	SFSCDIIKNG-----	KPKGAG-----	EKKCSGGWRCKMNFCLKV			54.17
B1P1A9 U3-TRTX-Cg1c	IFEC	SFSCDIIKNG-----	KPCTGAG-----	EKKCSGGWRCKMNFCLKV			52.08
	: **	: *: *: .	*		: *	: ** *: *: *: *: *: *	

Figura 9 – Alinhamento múltiplo entre a sequência de aminoácidos da Ap1a e toxinas identificadas em diferentes gêneros da família Theraphosidae. Espaços (-) foram utilizados para maximizar a sobreposição das sequências. Símbolos abaixo do alinhamento indicam o grau de conservação entre os resíduos: (*) para aminoácidos idênticos, (:) para substituições conservativas e (.) para substituições semiconservativas.

5.3. Eletrofisiologia em canais de cálcio dependentes de voltagem

Para a análise da atividade da toxina Ap1a sobre canais Cav, foram selecionados os subtipos Cav1.2, Cav2.1, Cav2.2, Cav2.3 e Cav3.1 (Figura 10). As avaliações foram realizadas por meio de ensaios eletrofisiológicos, com o objetivo de investigar a capacidade da toxina em alterar a amplitude da corrente iônica, expressa como porcentagem de inibição, bem como possíveis efeitos sobre a probabilidade de abertura durante a ativação ($\Delta I_{1/2 \text{ ativação}}$) e, exclusivamente para o canal Cav3.1, sobre a inativação em estado estacionário – *steady-state inactivation* (SSI) – ($\Delta V_{1/2 \text{ de inativação}}$).

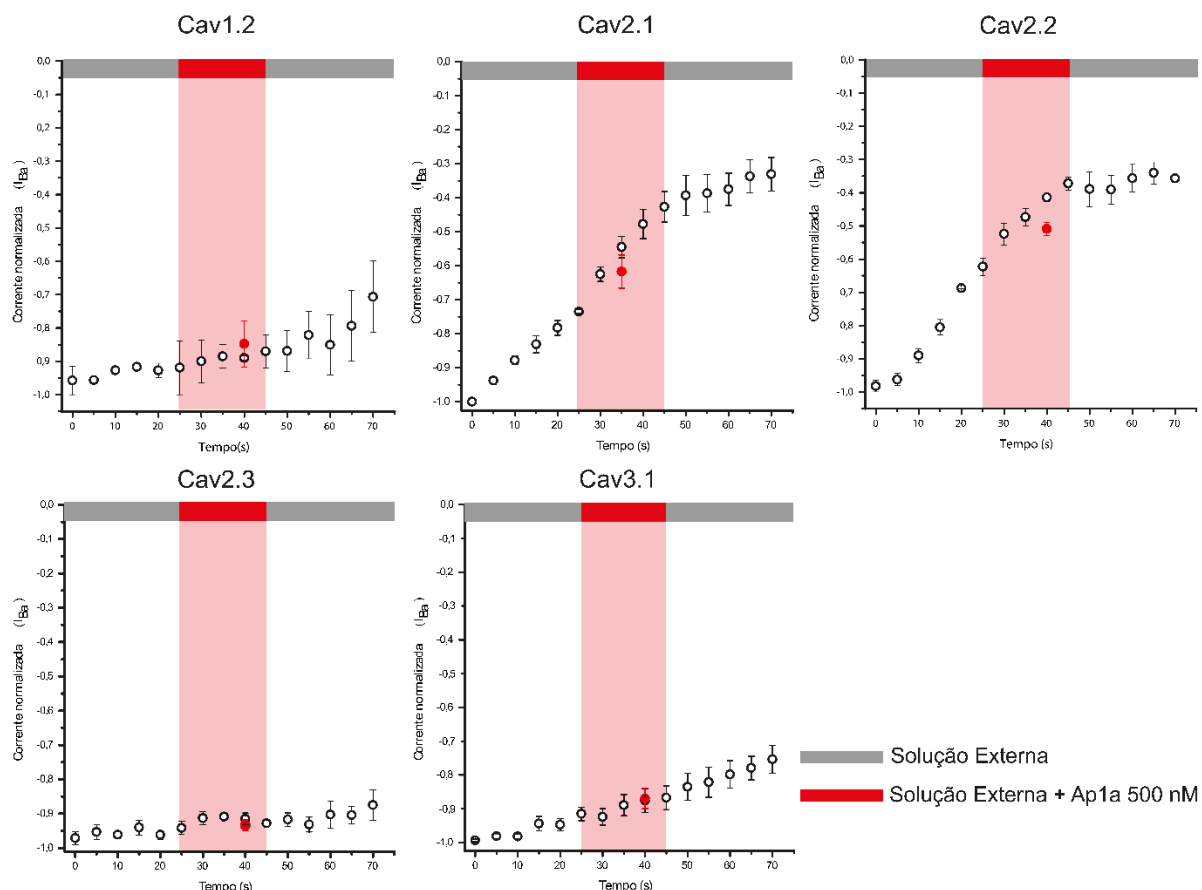


Figura 10 – Correntes normalizadas registradas em diferentes subtipos de canais Ca_v ao longo do tempo, na ausência e presença do peptídeo Ap1a (500 nM). As correntes foram normalizadas pelo valor máximo obtido em cada célula. A aplicação do peptídeo ocorre no intervalo destacado, seguida por período de lavagem. Os pontos representam as correntes medidas, enquanto o ponto vermelho indica a corrente predita (I_{pred}), considerando o decaimento basal de amplitude (*rundown*).

Nos canais Cav1.2, foram analisadas um total de quatro células. A aplicação da toxina Apla na concentração de 500 nM não promoveu inibição significativa da corrente nem alterações nos parâmetros eletrofisiológicos avaliados. Observou-se uma inibição de $0,70 \pm 1,99$ % (Figuras 10 e 11; Tabela 3) e uma variação na voltagem de ativação de $-0,08 \pm 2,77$ (Figura 12; Tabela 3).

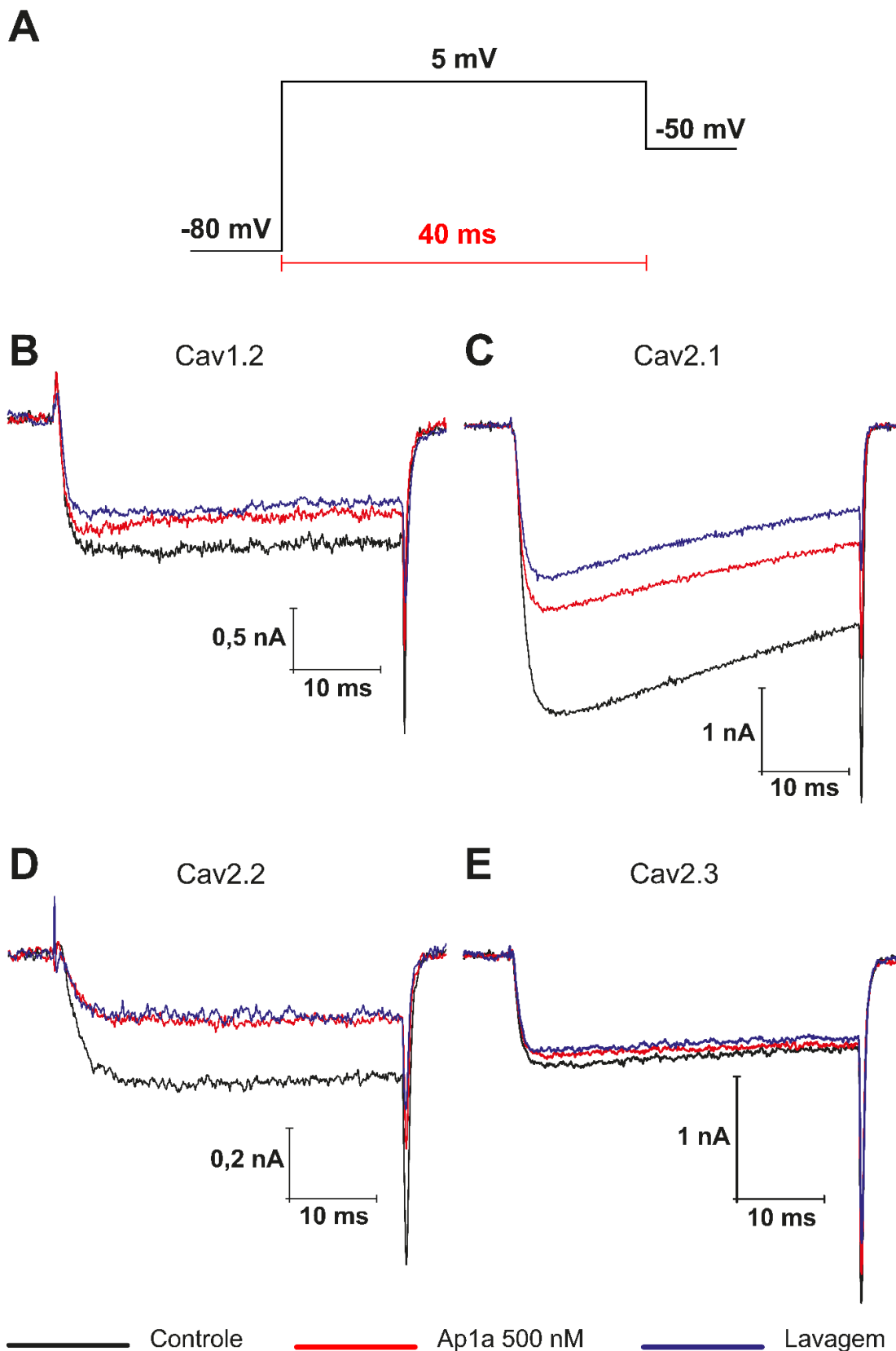


Figura 11 – Traços de registros obtidos em Canais Cav HVA na presença do peptídeo Ap1a (500 nM). (A) Protocolo de estímulo utilizado. (B–E) Traços de corrente dos canais Cav1.2, Cav2.1, Cav2.2 e Cav2.3, respectivamente. Os traços em preto representam a condição controle, os traços em vermelho a condição na presença da toxina, e os traços em azul os registros após a lavagem.

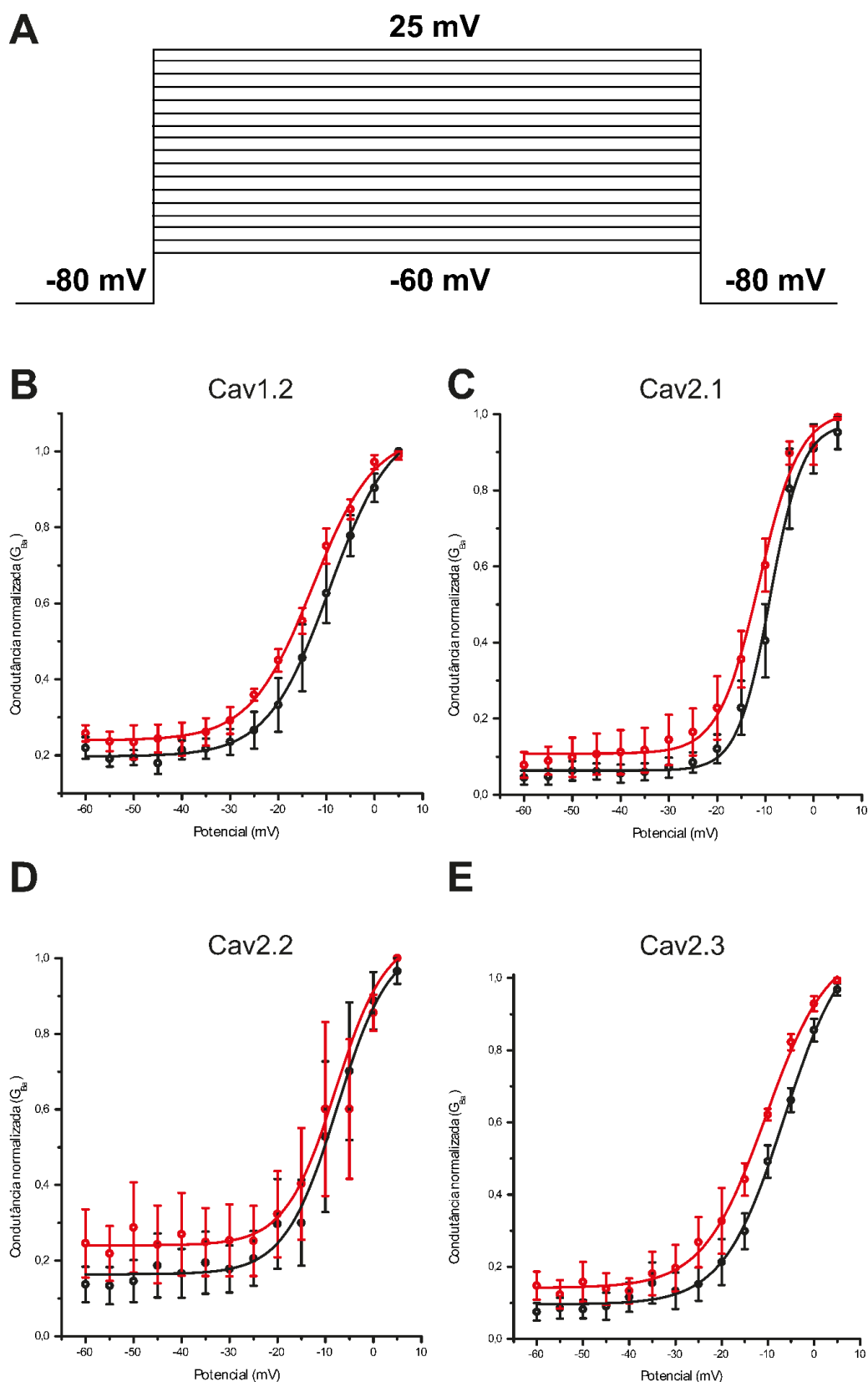


Figura 12 – Ativação dos canais Cav HVA na presença do peptídeo Ap1a (500 nM). A condutância normalizada (G/G_{max}), associada à probabilidade de abertura do canal durante a ativação, é representada por círculos pretos na condição controle e por círculos vermelhos na presença da toxina. As linhas contínuas correspondem ao ajuste dos dados experimentais à equação de Boltzmann (preto: controle; vermelho: Ap1a).

Em contraste, a toxina Apl1a apresentou efeito inibitório sobre os canais Cav2.1. Foram analisadas quatro células, tratadas com a toxina na concentração de 500 nM. Observou-se uma inibição da corrente de $15,34 \pm 3,29\%$, resultado estatisticamente significativo ($P < 0.05$) (Figuras 10 e 11; Tabela 3). No entanto, na mesma concentração, o peptídeo não provocou alterações significativas na cinética de ativação do canal, resultando em uma variação no potencial de ativação de apenas $-0,39 \pm 1,07$ mV (Figura 12; Tabela 3).

De maneira semelhante, nos canais Cav2.2, analisados em quatro células, a toxina Apl1a promoveu uma inibição da corrente de $16,08 \pm 2,61\%$ após aplicação na concentração de 500 nM (Figuras 10 e 11; Tabela 3). Esse efeito foi estatisticamente significativo ($P < 0.05$). Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos parâmetros de ativação do canal, com uma variação no potencial de ativação de $6,04 \pm 6,84$ (Figura 12; Tabela 3).

Nos canais Cav2.3, analisados em quatro células, a toxina Apl1a apresentou atividade discreta na concentração de 500 nM, promovendo uma inibição da corrente de $2,37 \pm 0,46\%$, embora estatisticamente significativa ($P < 0,05$) (Figuras 10 e 11; Tabela 3). Não foram observadas alterações estatisticamente significativas na cinética de ativação do canal, com variação no potencial de ativação de $-2,58 \pm 2,02$ mV (Figura 12; Tabela 3).

De forma semelhante, para os canais Cav3.1, foram analisadas cinco células tratadas com Apl1a na concentração de 500 nM. Durante os ensaios, a toxina não demonstrou atividade funcional, sendo incapaz de inibir o canal ou de alterar as cinéticas de ativação e inativação. No cálculo da inibição da corrente, não foram observadas alterações relevantes, com um valor de $-0,43 \pm 0,62\%$ (Figuras 10 e 13; Tabela 3). O peptídeo também não causou mudanças significativas nos parâmetros cinéticos do canal, resultando em variações nos potenciais de ativação e inativação de $-1,86 \pm 1,27$ mV e $-1,16 \pm 0,85$ mV, respectivamente (Figura 14; Tabela 3).

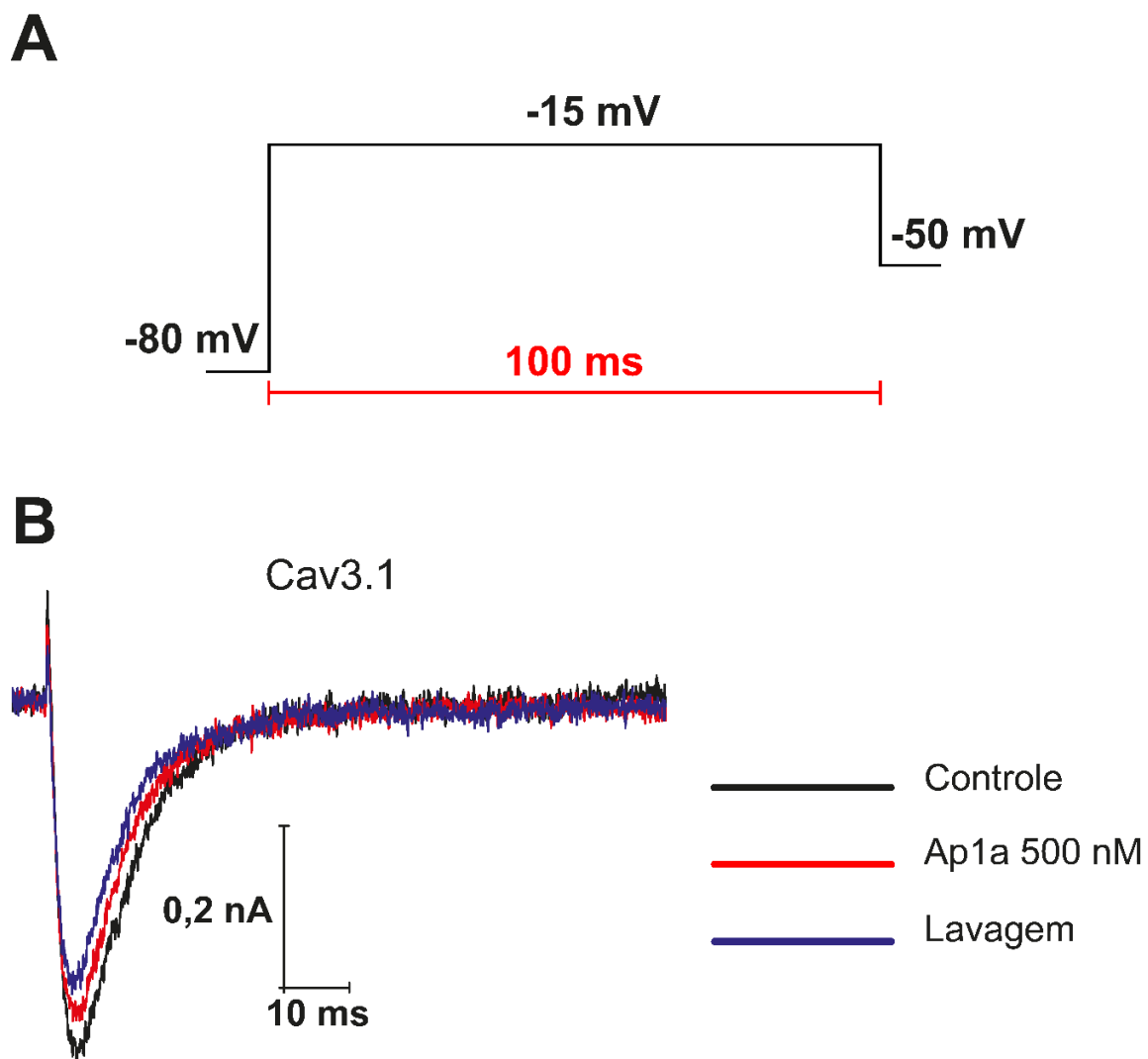


Figura 13 – Traços de registros obtidos em Canais Cav_{3.1} na presença do peptídeo Ap1a (500 nM). (A) Protocolo de estímulo utilizado. (B) Traços de corrente dos canais Cav_{3.1}, traços em preto representam a condição controle, os traços em vermelho a condição na presença da toxina, e os traços em azul os registros após a lavagem.

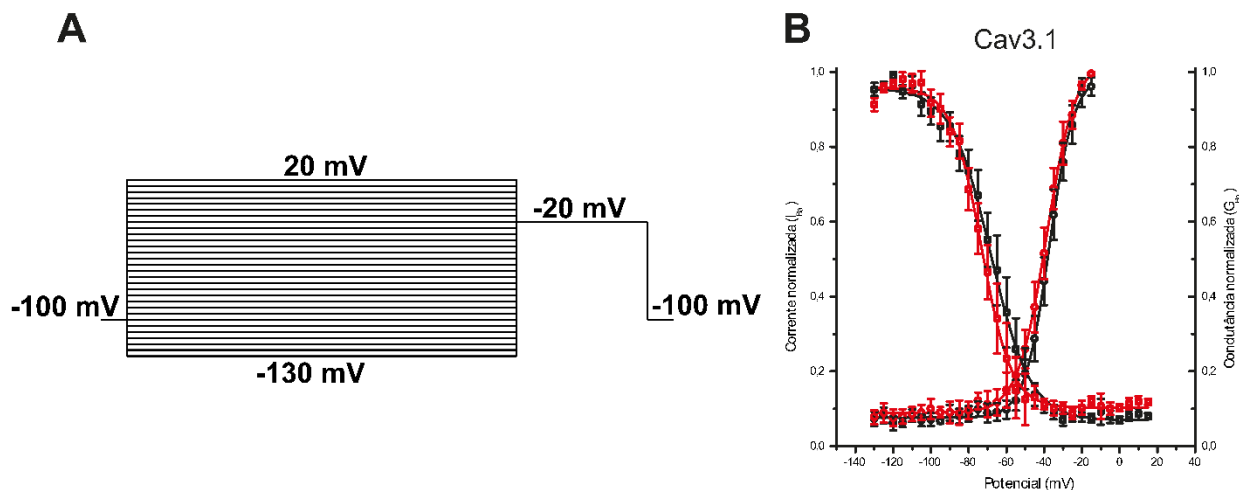


Figura 14 – Ativação e inativação do canal Cav3.1 na presença do peptídeo Ap1a (500 nM). A condutância normalizada (G/G_{max}), associada à probabilidade de abertura do canal durante a ativação, é representada por círculos pretos na condição controle e por círculos vermelhos na presença da toxina. As linhas contínuas correspondem ao ajuste dos dados experimentais à equação de Boltzmann (preto: controle; vermelho: Ap1a). A inativação em estado estacionário (SSI), é representada por quadrados pretos (corrente controle) e círculos vermelhos (corrente na presença da toxina).

Estes resultados demonstram que a toxina Ap1a apresenta seletividade funcional para os canais Cav2.1 e Cav2.2, com atividade reduzida sobre o Cav2.3. Não foi observada atividade significativa nos demais subtipos de canais Cav avaliados sob as condições experimentais utilizadas.

Tabela 3 – Valores das médias de Inibição e $\Delta V_{1/2}$ obtidos para os canais de cálcio na presença da toxina Apl1a 500nM. Dados obtidos pelo ajuste na equação de Boltzmann ($\Delta V_{1/2}$), cálculo da porcentagem de corrente inibida (Inibição%) e número de observações (n). Valores de média e erro padrão. Valores com (*) são estatisticamente significantes.

Subtipo	Inibição da corrente (%)	$\Delta V_{1/2}$ ativação (mV)	$\Delta V_{1/2}$ inativação – SSI (mV)	n
Cav1.2	$0,70 \pm 1,99$	$-0,08 \pm 2,77$	—	4
Cav2.1	$15,34 \pm 3,29^*$	$-0,39 \pm 1,07$	—	4
Cav2.2	$16,08 \pm 2,61^*$	$6,04 \pm 6,84$	—	4
Cav2.3	$2,37 \pm 0,46^*$	$-2,58 \pm 2,02$	—	4
Cav3.1	$-0,43 \pm 0,62$	$-1,86 \pm 1,27$	$-1,16 \pm 0,85$	5

6. Discussão

A Apl1a é a toxina peptídica mais abundante na peçonha da aranha *A. paulensis*, correspondendo a aproximadamente 8% de sua composição total, o que evidencia o papel central dessa molécula no arsenal toxinológico da espécie (Mourão et al., 2013b). Essa toxina apresenta atividade biológica *in vivo* bem caracterizada, sendo capaz de induzir paralisia reversível e dependente da dose em larvas de *S. frugiperda*, promover alterações funcionais no circuito da GF de *D. melanogaster* e causar toxicidade em camundongos após administração intracraniana, com manifestações compatíveis com um quadro de hiperexcitação do sistema nervoso central (Mourão et al., 2013b).

Apesar desse conjunto consistente de efeitos fisiológicos, os mecanismos moleculares subjacentes à ação da Apl1a permaneceram, por longo período, apenas parcialmente elucidados. Ao longo de anos, uma extensa triagem *in vitro* foi conduzida por este grupo de pesquisa, envolvendo ensaios eletrofisiológicos direcionados a diferentes classes de canais iônicos e receptores neuronais. Embora efeitos funcionais tenham sido observados em canais de sódio dependentes de voltagem humanos, esses efeitos não foram suficientes para explicar, de forma integrada, o conjunto de fenótipos neurotóxicos observados *in vivo*. Adicionalmente, a ausência de efeitos relevantes sobre múltiplos subtipos de canais de potássio, receptores nicotínicos de acetilcolina, receptores de glutamato e canais de GluCl indicou que outros alvos moleculares poderiam estar envolvidos na ação da toxina (Garcia et al., 2025; Mourão et al., 2013b).

Nesse contexto, embora a Apl1a seja altamente abundante e biologicamente ativa *in vivo*, seus possíveis alvos moleculares não estão totalmente definidos. Diante desse cenário, a presente dissertação teve como objetivo investigar a capacidade da Apl1a em modular canais Cav, dando continuidade e aprofundando as investigações funcionais previamente conduzidas.

Para viabilizar as análises subsequentes, a Apl1a foi purificada por HPLC. O peptídeo apresentou tempo de retenção de 52 minutos sob condição de 42% de ACN, valor consistente com o previamente descrito, no qual a eluição da molécula ocorreu em aproximadamente 51 minutos com 41% de ACN (Mourão et al., 2013a). A Apl1a é composta por 48 resíduos de aminoácidos (IIECFFSCEIEKDGKSKEGKPKPKGDKNKDKKCSGGWRCKIKMCLKI) e apresentou massa molecular monoisotópica experimental de 5.457,77 Da, determinada por MALDI-TOF/TOF. Esse valor foi idêntico à massa teórica calculada, confirmando a identidade do peptídeo purificado (Mourão et al., 2013b).

Sob a perspectiva estrutural e filogenética, análises de alinhamento indicam que a Apl1a

pertence à família Huwentoxin-II, um grupo de toxinas isoladas de aranhas da família Theraphosidae, caracterizado por uma considerável diversidade estrutural e funcional (Figura 9). A toxina prototípica dessa família, a Huwentoxin-II (U1-TRTX-Hs1a), isolada de *Cyriopagopus schmidtii*, apresenta motivo estrutural do tipo DDH e atividade inseticida bem caracterizada, incluindo paralisia reversível e dependente da dose em insetos, além de inibição da transmissão neuromuscular em preparações de nervo frênico de camundongos (Shu; Liang, 1999; Shu et al., 2009). De modo geral, entretanto, os membros dessa família não compartilham um alvo molecular primário claramente definido, apresentando variações tanto no motivo estrutural (DDH ou ICK) quanto no perfil funcional.

Análises filogenéticas recentes sugerem a existência de um clado monofilético composto majoritariamente por toxinas com motivo ICK oriundas de Theraphosidae do continente americano, incluindo os gêneros *Aphonopelma*, *Brachypelma* e *Acanthoscurria*, em contraste com clados predominantemente asiáticos compostos por toxinas DDH (Garcia et al., 2025). Considerando evidências que apontam o motivo DDH como ancestral em relação ao motivo ICK (Escoubas; Rash, 2004), a família Huwentoxin-II pode representar um exemplo de transição evolutiva entre esses dois arranjos estruturais. Essa diversidade estrutural, aliada à heterogeneidade funcional observada, dificulta a inferência direta de alvos moleculares com base apenas em similaridade de sequência.

Nesse contexto, a comparação entre peptídeos estruturalmente próximos à Apl1a fornece um panorama funcional relevante. Toxinas com elevada similaridade de sequência, como U1-TRTX-Agml1a (~98%) e μ -TRTX-An1a (~94%), ambas isoladas de espécies do gênero *Acanthoscurria*, evidenciam a heterogeneidade funcional e a escassez de informações moleculares para essa família. Enquanto a U1-TRTX-Agml1a ainda não teve sua atividade biológica caracterizada, a μ -TRTX-An1a foi avaliada em ensaios eletrofisiológicos em neurônios de insetos, nos quais induziu alterações progressivas da excitabilidade neuronal, incluindo despolarização da membrana e redução da amplitude da corrente de sódio, sem alterações detectáveis nas cinéticas de ativação ou inativação (Abreu et al., 2017; Rates et al., 2013).

Os peptídeos ESTx1 e ESTx2 da aranha *A. californicum* foram os primeiros da família Huwentoxin-II descritos, possuindo ~67% de similaridade com a Apl1a e ação inseticida comprovada (paralisia e letalidade) (Savel-Niemann, 1989). Posteriormente, a toxina U1-TRTX-Bs1a (*B. smithi*) foi identificada com 100% de identidade com a ESTx2. Estudos de clivagem confirmaram que essas toxinas apresentam o motivo estrutural ICK, consolidando-a,

junto à Apl1a, como membro desta família com estrutura ICK experimentalmente comprovada (Kaiser et al., 1994).

Adicionalmente, estudos envolvendo os peptídeos ω -TRTX-Bal1a e ω -TRTX-Bal1b (~67% de similaridade) demonstraram ausência de antagonismo direto sobre canais de sódio de insetos ou mamíferos, resultado semelhante ao observado para a Apl1a, o que sugere que canais Nav não constituem os principais alvos moleculares dessa linhagem de toxinas (Corzo et al., 2009; Garcia et al., 2025; Mourão et al., 2013b). Outros membros da família, como U1-TRTX-Lp1a e U1-TRTX-Lp1b (~62% de similaridade), apresentam características estruturais ainda mais divergentes, incluindo a presença de quatro ligações dissulfeto, evidenciando a ampla diversidade funcional observada nesse grupo (Escoubas et al., 1997).

Apesar dessa heterogeneidade, um indício funcional particularmente relevante é fornecido pela ω -theraphotoxin-Asp1a, isolada de espécies do gênero *Aphonopelma*, que foi descrita como inibidora de canais Cav em células granulares do cerebelo de ratos, conforme registro em patente (WO1994010196). Embora apresente menor similaridade de sequência em relação à Apl1a, essa toxina constitui, até o momento, o único membro da família Huwentoxin-II com atividade descrita sobre canais de cálcio Cav. Esse achado sugere que, apesar da diversidade estrutural, peptídeos dessa linhagem podem compartilhar a capacidade de modular este tipo de canal.

Os ensaios eletrofisiológicos realizados por *patch clamp* demonstraram que a Apl1a exerce uma atividade seletiva sobre os subtipos Cav2.1 e Cav2.2, promovendo a inibição das correntes desses canais em $15,34 \pm 3,29\%$ e $16,08 \pm 2,61\%$, respectivamente. Essa inibição ocorreu sem alterações significativas nos parâmetros cinéticos de ativação, sugerindo um mecanismo de ação compatível com bloqueio do poro do canal, em vez de uma modulação dependente do *gating*. Para o Cav2.3, observou-se uma inibição estatisticamente significativa, porém de menor magnitude quando comparada aos canais Cav2.1 e Cav2.2, indicando uma afinidade funcional reduzida da toxina por esse canal. Por outro lado, a análise dos parâmetros cinéticos de ativação do Cav2.2 não revelou um padrão consistente entre as células avaliadas, refletindo elevada variabilidade intercelular, o que limita interpretações conclusivas sobre possíveis efeitos da Apl1a sobre o *gating* desse subtipo. Assim, investigações adicionais, com maior número amostral e análises complementares, serão necessárias para elucidar de forma mais robusta a influência da toxina sobre as propriedades cinéticas do Cav2.2. Em contraste, os canais Cav1.2 e Cav3.1 não apresentaram efeitos relevantes, tanto em relação à inibição da corrente quanto à modulação de suas propriedades de *gating*.

Em conjunto, esses achados indicam que a Ap1a apresenta um perfil de seletividade preferencial pelos canais Cav2.1 e Cav2.2, promovendo inibição significativa das correntes desses subtipos, com efeito adicional mais discreto sobre o canal Cav2.3. Esse padrão é consistente com o elevado grau de similaridade estrutural e de sequência existente entre os subtipos Cav2.1 e Cav2.2, particularmente em regiões envolvidas na condução iônica e na interação com ligantes (Dolphin; Lee, 2020; Ertel et al., 2000), o que pode favorecer um modo de interação molecular semelhante da toxina com esses canais. Além disso, em ensaios anteriores, a Ap1a demonstrou uma atividade inibitória sobre Nav, com reduções de corrente mais expressivas nos subtipos Nav1.7 (32%) e Nav1.1 (26%), acompanhadas por um deslocamento hiperpolarizante nas curvas de ativação e inativação (Tabela 4) (Garcia et al., 2025). Assim, os resultados indicam que a Ap1a apresenta um perfil de ação multimodal, com uma seletividade preferencial entre os canais Cav2 e efeitos mais pronunciados sobre subtipos específicos de canais Nav e, contribuindo para a caracterização de seus principais alvos moleculares.

Tabela 4 – Efeitos da toxina Apl1a sobre diferentes canais iônicos dependentes de voltagem e receptores ionotrópicos. A tabela apresenta a inibição da corrente (%) e as alterações no potencial de ativação ($\Delta V_{1/2}$ de ativação) e de inativação em estado estacionário ($\Delta V_{1/2}$ de inativação – SSI) induzidas pela Apl1a nas concentrações indicadas. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. O traço (—) indica parâmetro não avaliado, e “sem efeito” refere-se à ausência de modulação detectável nas condições experimentais. Valores com (*) são estatisticamente significantes.

Canal	Concentração Apl1a	Inibição da corrente (%)	$\Delta V_{1/2}$ ativação (mV)	$\Delta V_{1/2}$ inativação – SSI (mV)	Fonte
Cav1.2	500 nM	0,70 $\pm$ 1,99	-0,08 $\pm$ 2,77	—	Este trabalho
Cav2.1	500 nM	15,34 $\pm$ 3,29*	-0,39 $\pm$ 1,07	—	Este trabalho
Cav2.2	500 nM	16,08 $\pm$ 2,61*	6,04 $\pm$ 6,84	—	Este trabalho
Cav2.3	500 nM	2,37 $\pm$ 0,46*	-2,58 $\pm$ 2,02	—	Este trabalho
Cav3.1	500 nM	-0,43 $\pm$ 0,62	-1,86 $\pm$ 1,27	-1,16 $\pm$ 0,85	Este trabalho
Nav1.1	1 μ M	26,14 $\pm$ 11,84*	-3,97 $\pm$ 2,73*	-2.88 $\pm$ 1.79*	Garcia et al., 2025
Nav1.2	1 μ M	Sem efeito	—	—	Mourão et al., 2013b
Nav1.3	1 μ M	18,09 $\pm$ 7,15*	-4.89 $\pm$ 1.44*	-4.04 $\pm$ 3.30*	Garcia et al., 2025
Nav1.4	1 μ M	Sem efeito	—	—	Mourão et al., 2013b
Nav1.5	1 μ M	Sem efeito	—	—	Mourão et al., 2013b
Nav1.6	1 μ M	Sem efeito	—	—	Mourão et al., 2013b
Nav1.7	1 μ M	32,28 $\pm$ 5,96*	-5,67 $\pm$ 3,35*	-3,42 $\pm$ 2,46*	Garcia et al., 2025
Nav1.8	1 μ M	14,96 $\pm$ 3,56*	1,64 $\pm$ 1,47	-1,35 $\pm$ 1,31	Garcia et al., 2025
BgNav1	1 μ M	Sem efeito	—	—	Garcia et al., 2025
VdNav1	1 μ M	Sem efeito	—	—	Garcia et al., 2025
Kv1.1	1 μ M	1.38 $\pm$ 3.55	—	—	Garcia et al., 2025
Kv4.2	1 μ M	6,83 $\pm$ 2,03*	—	—	Garcia et al., 2025
Kv4.3	1 μ M	14,76 $\pm$ 1,56*	—	—	Garcia et al., 2025
Kv7.1	1 μ M	2.37 $\pm$ 1.17	—	—	Garcia et al., 2025
KQT1	1 μ M	Sem efeito	—	—	Garcia et al., 2025
Shaker	1 μ M	Sem efeito	—	—	Garcia et al., 2025
Shab	1 μ M	Sem efeito	—	—	Garcia et al., 2025
Shal	1 μ M	Sem efeito	—	—	Garcia et al., 2025
Shaw	1 μ M	Sem efeito	—	—	Garcia et al., 2025
nAChR	1 μ M	Sem efeito	—	—	Mourão et al., 2013b
GluCl	10 μ M	Sem efeito	—	—	Garcia et al., 2025

A compreensão da função dos canais Cav2.1 e Cav2.2 foi significativamente aprofundada a partir da caracterização de toxinas peptídicas, provenientes de moluscos e artrópodes, que modulam seletivamente a atividade desses canais. Entre os exemplos mais bem estabelecidos estão as ω -conotoxinas isoladas da peçonha de caracóis do gênero *Conus*, em

especial a ω -conotoxina GVIA, derivada de *Conus geographus*, que se liga com elevada afinidade aos canais Cav2.2, promovendo um bloqueio quase irreversível da condução iônica por interação direta com a região externa do poro, especificamente no loop-P do domínio DIII (Boland; Morrill; Bean, 1994; Ellinor et al., 1994).

Em contraste com as ω -conotoxinas, diversas toxinas de aranhas atuam predominantemente como moduladores do *gating* dos canais Cav, interferindo nos processos de ativação dependentes de voltagem. As ω -agatoxinas isoladas de *Agelenopsis aperta* representam exemplos paradigmáticos desse mecanismo. A ω -agatoxina IVA, altamente seletiva para canais Cav2.1, liga-se a regiões próximas ao VSD do domínio DIV, deslocando o potencial de ativação para valores mais positivos e, conseqüentemente, reduzindo a probabilidade de abertura do canal em potenciais fisiológicos (McDonough; Mintz; Bean, 1997).

A peçonha da aranha chinesa *Ornithoctonus huwena* constitui outra fonte relevante de ω -toxinas com ação sobre canais Cav. A HWTX-I (μ/ω -TRTX-Hs1a) inibe de forma preferencial os canais Cav2.2, com dependência de dose e reversibilidade parcial, enquanto a HWTX-X atua como um bloqueador potente e completamente reversível desses mesmos canais, competindo diretamente com a ω -conotoxina GVIA por sítios de ligação sobrepostos (Liu et al., 2006; Peng; Chen; Liang, 2001). Notavelmente, ambas apresentam o motivo estrutural do tipo ICK, ressaltando a recorrência desse arranjo estrutural entre toxinas moduladoras de canais Cav.

Outro exemplo significativo é a ω -TRTX-Gr1a, também conhecida como ω -grammotoxina SIA, oriunda da tarântula *Grammostola rosea*, que inibe preferencialmente os canais Cav2.1 e Cav2.2 (Lampe et al., 1993). De modo semelhante ao observado para a ω -agatoxina IVA, essa toxina atua como um modulador do *gating*, promovendo um deslocamento da curva de ativação para potenciais mais positivos e retardando de forma significativa a cinética de ativação dos canais. Além disso, evidências indicam que a ω -grammotoxina SIA apresenta maior afinidade pelo canal em seu estado fechado, o que sugere um mecanismo dependente do estado conformacional do canal (McDonough et al., 1997).

Embora o perfil funcional da ω -grammotoxina SIA seja qualitativamente semelhante ao da ω -agatoxina IVA, estudos demonstram que essas toxinas se ligam a sítios distintos ou parcialmente sobrepostos no canal Cav2.1. Essa diferença é evidenciada pelo fato de que a aplicação concomitante das duas toxinas resulta em um deslocamento da curva de ativação mais pronunciado do que aquele observado quando cada toxina é aplicada isoladamente, indicando efeitos aditivos ou sinérgicos sobre a maquinaria de ativação do canal (McDonough

et al., 1997).

Do ponto de vista funcional, os canais Cav2.1 e Cav2.2 desempenham papel central no acoplamento entre o potencial de ação e a liberação de neurotransmissores no sistema nervoso central e periférico, atuando como as principais vias de influxo de Ca^{2+} responsáveis pelo disparo da exocitose vesicular em sinapses químicas rápidas (Dolphin; Lee, 2020). Esses canais encontram-se concentrados nas regiões pré-sinápticas de liberação, onde sua ativação gera aumentos locais e transitórios da concentração intracelular de Ca^{2+} , suficientes para ativar a maquinaria molecular envolvida na fusão vesicular (Kaeser; Regehr, 2014). A contribuição relativa de Cav2.1 e Cav2.2 varia conforme o tipo sináptico, o estágio de desenvolvimento e o padrão de atividade neuronal, sendo ambos amplamente envolvidos na liberação de neurotransmissores em sinapses excitatórias e inibitórias (Takahashi; Momiyama, 1993; Wheeler; Randall; Tsien, 1996).

Como consequência direta de sua ação sobre os canais Cav2.1 e Cav2.2, a ω -grammotoxina SIA promove um bloqueio rápido, completo e reversível da transmissão sináptica glutamatérgica em neurônios hipocâmpais cultivados de rato, levando à inibição das correntes pós-sinápticas excitatórias. Esse efeito é atribuído predominantemente à modulação dos canais Cav2 pré-sinápticos, uma vez que a toxina não interfere diretamente nos receptores glutamatérgicos pós-sinápticos. Além disso, experimentos realizados em neurônios de gânglios da raiz dorsal de ratos demonstraram que a toxina não altera as propriedades do potencial de ação, indicando ausência de efeitos diretos sobre os canais responsáveis pela excitabilidade neuronal (Piser et al., 1995).

Esse conjunto de evidências fornece um paralelo funcional relevante para a interpretação dos efeitos observados para a Apl1a, uma vez que ambas as toxinas atuam preferencialmente sobre canais da subfamília Cav2, em comparação aos demais subtipos dessa família. Assim, é plausível que a Apl1a também exerça seus efeitos por meio de um mecanismo semelhante, afetando a ativação dos canais e, conseqüentemente, a liberação de neurotransmissores. Nesse contexto, a realização de ensaios de transmissão sináptica, semelhantes aos conduzidos com a ω -grammotoxina SIA, em estudos posteriores, torna-se particularmente relevante para elucidar o impacto funcional da Apl1a em circuitos neuronais e confirmar seu possível modo de ação *in vivo*.

Assim, a inibição parcial dos canais Cav2.1 e Cav2.2 pela Apl1a constitui um mecanismo molecular plausível, ainda que não definitivo, para explicar os efeitos comportamentais observados *in vivo* em modelos murinos, nos quais a administração da toxina induziu sinais compatíveis com hiperexcitação do sistema nervoso central. A redução do

influxo de cálcio através desses canais, seja por mutações de perda de função ou por bloqueio farmacológico, diminui diretamente a probabilidade de liberação de glutamato, contudo, o impacto final sobre a atividade da rede neuronal pode ser paradoxal, dependendo do tipo celular e do circuito afetado.

Nesse contexto, mutações *de novo* no gene *CACNA1A*, que codifica o canal Cav2.1, tanto de ganho quanto de perda de função, estão associadas a encefalopatias epiléticas do desenvolvimento. Enquanto algumas variantes reduzem a densidade de corrente devido a falhas no tráfego do canal para a membrana, outras facilitam sua ativação e alteram a cinética das correntes, evidenciando que diferentes mecanismos moleculares podem levar a fenótipos clínicos severos similares (Jiang et al., 2019). A perda de função nos canais Cav2.1 prejudica o acoplamento entre os potenciais de ação e a liberação de neurotransmissores em interneurônios inibitórios, resultando em uma sinalização sináptica instável e pouco confiável. Esse defeito promove a hipersincronização de circuitos talamocorticais, o que desencadeia distúrbios neurológicos como ataxia, crises de ausência e encefalopatias epiléticas graves (Rossignol, 2011).

De forma complementar, estudos com modelos de nocaute do canal Cav2.2 demonstram que a ausência funcional desse canal resulta em um fenótipo de hiperatividade e aumento tônico do estado de alerta. Esses efeitos comportamentais e de eletroencefalografia sugerem que disfunções no Cav2.2 podem levar a desequilíbrios na excitabilidade neural *in vivo*, possivelmente por alterações na liberação de neurotransmissores em núcleos envolvidos na regulação do estado de vigília (Beuckmann et al., 2003). Ainda assim, a extrapolação direta desses mecanismos para os efeitos observados com a Apl1a deve ser feita com cautela, uma vez que o bloqueio farmacológico parcial promovido pela Apl1a não seja diretamente comparável à ausência genética do canal. Além disso, a ausência de dados funcionais em nível sináptico e de circuito limita a atribuição causal direta entre a modulação dos canais Cav e o fenótipo comportamental observado.

A promiscuidade de alvo das toxinas de aranhas é uma característica marcante que lhes permite interagir com múltiplas famílias de canais iônicos. Toxinas inicialmente classificadas como específicas para um único canal iônico demonstraram posteriormente, na realidade, especificidade cruzada. A Hanatoxin-1 (κ -TRTX-Gr1a), isolada de *Grammostola rosea*, por exemplo, além de inibir canais K_V , também é capaz de modificar o *gating* de canais Cav, embora com menor seletividade. De modo semelhante, a ω -grammotoxina SIA (ω -TRTX-Gr1a), proveniente da mesma espécie, inibe canais K_V com afinidade inferior àquela descrita para sua atividade sobre canais Cav (Li; And; Swartz, 1998). Ambas reconhecem um motivo

estrutural conservado VSD, o que lhes permite interagir de forma cruzada com canais K_v e Cav . Esse comportamento indica que a promiscuidade observada decorre do reconhecimento desse motivo estrutural compartilhado, possibilitando que uma única toxina empregue mecanismos multimodais para atuar sobre múltiplos alvos moleculares (Li; And; Swartz, 1998).

Outros peptídeos também oriundos de *G. rosea*, como GrTx1 (β -TRTX-Gr1a), GsAF-I (β -TRTX-Gr1b) e VSTx1 (κ -TRTX-Gr3a) apresentam efeitos heterogêneos ao afetar simultaneamente diferentes isoformas de canais de Nav , bem como canais de $K_v11.1$. Esses peptídeos atuam como bloqueadores de poro em baixas concentrações e, em concentrações mais elevadas, como modificadores de *gating*, promovendo um deslocamento da ativação para potenciais mais despolarizantes (Redaelli et al., 2010). Em nível molecular, essa promiscuidade é sustentada pela forte semelhança estrutural destas toxinas, fundamentada no motivo ICK. Esse motivo garante elevada estabilidade conformacional e, apesar da grande diversidade de sequências primárias, permite a interação eficiente com o VSD de diferentes famílias de canais iônicos (Li; And; Swartz, 1998; Redaelli et al., 2010).

Embora formalmente classificadas como ω -toxinas, devido à capacidade de inibir canais de cálcio do tipo $Cav2.1$, as toxinas Ap2 e Ap3, purificadas de *A. paulensis*, apresentam atividades sobrepostas em canais Nav . A Ap3 ilustra nitidamente essa característica, além de inibir as correntes de $Cav2.1$ em cerca de 22%, ela reduz significativamente as amplitudes de correntes e altera as cinéticas de ativação e inativação em $Nav1.1$, $Nav1.5$ e $Nav1.7$ na concentração de 1 μM . Por sua vez, a Ap2, embora não suprima diretamente a amplitude das correntes de sódio, exibe promiscuidade funcional ao modular as cinéticas de ativação e inativação. Essa modulação, ainda que sutil, da ordem de aproximadamente 2 mV, é estatisticamente significativa e indica que a toxina interage com o VSD desses canais (Tibery et al., 2021).

Nesse mesmo panorama de promiscuidade funcional, a ω -grammotoxina SIA, previamente descrita por sua ação sobre canais Cav e K_v , destaca-se também como um exemplo de toxina com atividade sobre canais Nav . Evidências posteriores demonstram que essa toxina atua como um potente modificador de *gating* em múltiplos subtipos de Nav , promovendo inibição próxima de 80% da corrente em $Nav1.6$ a 1 μM , o subtipo mais suscetível. Esses resultados reforçam que sua atuação em diferentes canais está associada ao reconhecimento de regiões estruturais conservadas no VSD desses canais. Esse mecanismo foi confirmado por estudos de mutagênese direcionada, que demonstraram que a substituição de resíduos críticos de glutamato, como o resíduo na posição 1607 no VSD do DIV, bem como

os resíduos nas posições 782 e 838 no VSD do DII, reduz de forma acentuada a suscetibilidade do canal à toxina. Em conjunto, esses achados sustentam a noção de que a promiscuidade dessas toxinas não resulta de baixa seletividade inespecífica, mas do reconhecimento de arquiteturas moleculares compartilhadas entre diferentes famílias de canais iônicos (Collaço; Van Petegem; Bosmans, 2024).

A polifarmacologia define-se como o design ou o uso de agentes farmacológicos capazes de atuar simultaneamente em múltiplos alvos, visando um desfecho terapêutico superior à modulação de um único alvo (Reddy; Zhang, 2013). Esse conceito representa um paradigma essencial para o tratamento de doenças complexas e multifatoriais, como o câncer e os transtornos do sistema nervoso, que emergem da desregulação de redes moleculares interconectadas e frequentemente apresentam resistência a terapias de alvo único. Em contraste com a abordagem tradicional, moléculas polifarmacológicas tendem a oferecer maior eficácia e perfis de segurança mais favoráveis, ao potencialmente aumentar a eficácia terapêutica e reduzir efeitos adversos (Kabir; Muth, 2022; Van der Schyf; Youdim, 2009).

Nesse contexto, os peptídeos oriundos de peçonhas de aranhas caracterizados pelo motivo ICK destacam-se como candidatos naturais à estratégia polifarmacológica, em razão de suas propriedades multialvo intrínsecas. Extraídos da aranha caranguejeira *Thrixopelma pruriens*, os peptídeos ProTx-I (β/ω -TRTX-Tp1a) e ProTx-II (β/ω -TRTX-Tp2a) destacam-se por sua elevada potência inibitória, apresentando valores de IC_{50} na faixa nanomolar sobre diversos subtipos de canais Nav e sobre o canal Cav3.1 (Bladen et al., 2014; Priest et al., 2007). A administração intratecal de ProTx-II produziu efeitos anti-hiperalgésicos significativos e dependentes da dose em camundongos com neuropatia diabética (Kamei et al., 2015). Além disso, um composto desenvolvido por engenharia molecular a partir do ProTx-II demonstrou induzir analgesia robusta frente a estímulos térmicos e químicos, sugerindo potencial como alternativa não opioide para o tratamento de dores severas (Flinspach et al., 2017).

Outro exemplo relevante é representado pelas toxinas μ/ω -TRTX-Tap1a e μ/ω -TRTX-Tap2a, ambas oriundas da aranha *Theraphosa apophysis*. Essas toxinas atuam como modificadores de *gating*, induzindo um deslocamento hiperpolarizante na dependência de voltagem da ativação e da inativação, com ação sobre diversos subtipos de canais Nav e sobre Cav3.1 em concentrações nanomolares. Em análises *ex vivo*, essas toxinas reduziram de forma pronunciada a mecanossensibilidade neuronal em fibras aferentes da bexiga e do cólon. De forma consistente, em experimentos *in vivo*, sua administração intracolônica foi capaz de reverter a hipersensibilidade mecânica em modelos de síndrome do intestino irritável. Esses dados sugerem que a inibição combinada de canais Nav e Cav constitui uma via promissora

para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas à dor visceral (Cardoso et al., 2021).

Em conjunto, esses achados sugerem que os efeitos observados *in vivo* para a Apl1a podem, ao menos em parte, ser explicados por um perfil polifarmacológico, decorrente da modulação simultânea de canais Nav e Cav. Reconhece-se, contudo, que os peptídeos aqui utilizados como referência apresentam atividade predominante sobre o subtipo Cav3.1 e, de modo geral, exercem efeitos mais robustos sobre canais Nav do que aqueles descritos para a Apl1a. Ainda assim, a comparação com esses peptídeos fornece indicativos valiosos sobre possíveis mecanismos de ação da Apl1a, ressaltando seu potencial e relevância no contexto da polifarmacologia de toxinas de aranhas.

Um aspecto particularmente intrigante da família Huwentoxin-II é que, apesar do pronunciado efeito inseticida descrito para vários de seus membros, incluindo a Apl1a, muitas dessas toxinas não apresentam modulação direta e consistente de canais de sódio ou potássio de insetos em ensaios eletrofisiológicos. Essa discrepância sugere fortemente a participação de alvos moleculares alternativos, ainda pouco explorados.

Nesse contexto, os efeitos previamente descritos da Apl1a sobre o circuito da fibra gigante de *Drosophila melanogaster* tornam-se particularmente relevantes, uma vez que esse circuito depende criticamente da neurotransmissão rápida mediada por canais de cálcio voltagem-dependentes da família Cav2, codificados pelo gene *cacophony* (*Dmca1A*) (Kawasaki et al., 2004). Esse gene é responsável pelo principal influxo pré-sináptico de Ca^{2+} necessário à liberação de neurotransmissores tanto em sinapses centrais quanto nas junções neuromusculares da mosca, sendo funcionalmente análogo aos canais Cav2 de mamíferos (Littleton; Ganetzky, 2000).

Mutações no gene *cac* levam a uma ampla gama de fenótipos, incluindo anomalias no canto de cortejo dos machos (origem do nome do gene), cegueira noturna, paralisia ou convulsões dependentes da temperatura, eficiência sináptica reduzida e crescimento alterado dos terminais motores nas junções neuromusculares. Além disso, a perda completa de sua função é letal ainda no estágio embrionário (Kawasaki; Collins; Ordway, 2002; Smith et al., 1998). Neurônios gigantes de *D. melanogaster* em cultura apresentam duas correntes de cálcio do tipo HVA, com potenciais de limiar de -40 e -20 mV. Ambas as correntes sofrem uma redução significativa em neurônios portadores do alelo mutante *cac* e são quase totalmente eliminadas em linhagens com deficiência desse gene, o que sugere fortemente que ambas as correntes de Cav HVA nesses neurônios sejam mediadas por isoformas do canal Cav2 de *Drosophila* (Peng; Wu, 2007).

Assim, os efeitos da Apl1a sobre o circuito da GF são compatíveis com uma interferência em etapas críticas da neurotransmissão dependente de Cav2, sugerindo que canais Cav de insetos constituem alvos moleculares plausíveis para explicar a atividade observada. De forma análoga, esse mecanismo pode contribuir para os efeitos de paralisia observados em *S. frugiperda*, embora estudos funcionais diretos ainda sejam necessários para confirmação.

Essa correlação entre canais de insetos e vertebrados é reforçada pelo fato de que a ω -agatoxina IVA, também inibe as correntes de cálcio em neurônios de barata com alta afinidade (Wicher; Penzlin, 1997). Embora o sítio de ação da toxina tenha sido originalmente identificado e caracterizado em canais Cav2.1 de vertebrados, esse sítio é conservado nos canais Cav2 de insetos. O alinhamento da alça S3–S4 DIV do canal Cav2.1 de coelho com as regiões correspondentes dos canais Cav2 codificados em diferentes genomas de insetos revela uma boa correspondência, corroborando a conservação estrutural e funcional desse sítio de ligação (King; Escoubas; Nicholson, 2008; Winterfield; Swartz, 2000).

A caracterização eletrofisiológica dos canais Cav de insetos tem sido historicamente limitada pela ausência de sistemas eficientes de expressão heteróloga funcional, o que restringe a análise direta desses canais em modelos recombinantes. Nesse contexto, neurônios DUM (*dorsal unpaired median*), isolados dos gânglios abdominais da barata *Periplaneta americana*, consolidaram-se como um dos principais modelos experimentais para o estudo dos canais Cav em insetos. Esses neurônios permitem a investigação direta das correntes de Cav nativas e da ação de toxinas peptídicas sobre diferentes componentes dessas correntes, constituindo uma ferramenta fundamental para a identificação de perfis farmacológicos, seletividade por subtipos de canais e mecanismos de ação de toxinas com atividade inseticida (Grolleau; Laped, 2000). Assim, torna-se pertinente que estudos futuros avaliem a atividade da Apl1a nesse sistema. Ensaio eletrofisiológicos em neurônios DUM poderão contribuir para a identificação do subtipo de canal de cálcio alvo da toxina, bem como para a comparação direta de seu perfil farmacológico com o de outras ω -toxinas inseto-seletivas já descritas.

Nesse contexto, as peçonhas de aranhas reúnem diversos exemplos de toxinas com atividade sobre canais CaV de insetos, reforçando a relevância funcional desses canais como alvos moleculares. Entre as toxinas mais estudadas, destaca-se a ω -ACTX-Hv1a, isolada da aranha *H. versuta*, capaz de bloquear de forma reversível canais Cav LVA e HVA em neurônios de insetos (Chong et al., 2007b). Essa toxina induz paralisia irreversível em uma ampla gama de artrópodes, caracterizada pela perda da coordenação locomotora, por contrações rápidas e repetitivas dos apêndices e pela perda dos reflexos posturais, culminando em paralisia espástica e morte (Tedford et al., 2004a).

A ω -ACTX-Hv1a e a Apl1a apresentam mecanismos e, possivelmente, alvos distintos em *D. melanogaster*, com efeitos claramente dependentes da dose. Em ensaios utilizando o SNC isolado, a Hv1a exibe uma resposta bifásica: em concentrações muito baixas (>10 pM até ~ 10 nM) induz neuroexcitação intensa, com aumento da taxa de disparo e conversão dos surtos rítmicos em descargas acíclicas prolongadas, associadas à paralisia espástica; já em concentrações superiores a 10 nM, ocorre inibição progressiva da atividade nervosa, culminando em bloqueio quase completo da transmissão sináptica em concentrações micromolares (Bloomquist, 2003).

Em contraste, a Apl1a, testada *in vivo* no circuito da GF, não produz fase excitatória, mas promove uma redução dependente da dose na amplitude e frequência das respostas nas vias da fibra gigante para o músculo tergotrocâter (GF-TTM) e para o músculo dorso longitudinal (GF-DLM), levando à abolição completa das respostas em 4,18 pmol/mg após aproximadamente cinco minutos, com evidências de ação periférica na junção neuromuscular (Mourão et al., 2013b). Adicionalmente, em um estudo com linhagens transgênicas de *D. melanogaster* projetadas para expressar ω -ACTX-Hv1a sob o controle de um promotor induzível por choque térmico, observou-se uma falha frequente na inflação e no endurecimento das asas após a eclosão das pupas. Esse fenótipo específico é idêntico ao observado em um alelo hipomórfico do gene *Dmca1D*, que codifica canais de cálcio do tipo Cav1, indicando que a toxina atua como um antagonista desses canais (Tedford et al., 2007). Em conjunto, esses resultados reforçam que, embora ambas as toxinas afetem a atividade neural em *D. melanogaster*, elas o fazem por mecanismos distintos, com consequências funcionais claramente divergentes.

Outras aranhas também fornecem toxinas com ação em canais Cav de insetos. A HWTX-V é um peptídeo de 35 resíduos que induz paralisia reversível em insetos, como gafanhotos e baratas, em baixas doses ($PD_{50} = 16$ μ g/g), enquanto doses mais elevadas (>100 μ g/g) são letais. Seus efeitos neurotóxicos são predominantemente inseto-específicos, uma vez que a administração de altas doses em camundongos (30–200 μ g/g), por vias intra-abdominal ou intracerebroventricular, não produz efeitos adversos (Zhang et al., 2003). Em nível celular, a Huwentoxin-V não afeta correntes de Na_v e K_v em neurônios DUM de barata, mas bloqueia seletivamente correntes de Ca_v do tipo HVA, com IC_{50} de 219 nM (Deng et al., 2008).

A peçonha da aranha *Calommata signata* tem se mostrado uma importante fonte de ω -toxinas com atividade sobre canais de cálcio de insetos. A ω -Atypitoxin-Cs1a inibe correntes de Ca^{2+} em neurônios de barata com um valor de IC_{50} de 0,182 μ M, apresentando seletividade por canais ativados por alta voltagem (HVA), sem afetar canais de baixa voltagem (LVA).

Ensaio de bioatividade revelaram forte efeito inseticida contra pragas agrícolas de relevância econômica, como *Nilaparvata lugens*, *S. frugiperda* e *Plutella xylostella*, com valores de LD₅₀ variando entre 0,121 e 0,356 nmol/g. Além disso, a toxina apresentou baixa toxicidade para organismos não alvo, em particular para o peixe-zebra (*Danio rerio*), sendo de 6,5 a 19,1 vezes mais letal para insetos do que para peixes (Yu et al., 2023).

Estudos mais recentes identificaram duas toxinas adicionais provenientes da mesma aranha, as neurotoxinas peptídicas ω -Atypitoxin-Cs2a e ω -Atypitoxin-Cs2b. Ambas exibem atividade inseticida significativa contra *N. lugens* e *S. frugiperda*, com valores de LD₅₀ entre 0,949 e 1,083 nmol/g após 24 horas. Do ponto de vista eletrofisiológico, essas toxinas atuam como inibidoras seletivas e potentes de canais de cálcio HVA em neurônios DUM de barata, com valores de IC₅₀ de 0,504 μ M para Cs2a e 0,411 μ M para Cs2b, sem efeitos detectáveis sobre canais LVA, embora apresentem toxicidade inferior à observada para a Cs1a (Yan et al., 2025).

Os resultados obtidos nesta dissertação abrem perspectivas claras para investigações futuras, tanto em nível molecular quanto funcional. A caracterização eletrofisiológica da Apl1 sobre canais Cav de insetos, particularmente em neurônios DUM de barata ou em sistemas recombinantes emergentes, permitirá confirmar se o perfil observado em vertebrados se conserva em invertebrados. Além disso, ensaios de transmissão sináptica e análises em circuitos neuronais intactos poderão esclarecer de forma direta como a inibição parcial de canais Cav2 se traduz em alterações de excitabilidade e comportamento. Em paralelo, abordagens estruturais e *in silico* poderão contribuir para a identificação do sítio de interação da Apl1 nos canais Cav, auxiliando na compreensão de sua seletividade e mecanismo de ação. Em conjunto, esses estudos permitirão consolidar a Apl1 como uma nova ferramenta farmacológica para o estudo da neurotransmissão dependente de Cav2 e como um potencial modelo para o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas.

7. Conclusão

Neste presente trabalho foi realizada a purificação e a caracterização eletrofisiológica da toxina Apl1a, um dos principais componentes peptídicos da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*. A identidade e a pureza do peptídeo foram confirmadas por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa, garantindo a confiabilidade das análises funcionais subsequentes.

Os ensaios eletrofisiológicos demonstraram que a Apl1a apresenta um perfil de seletividade funcional preferencial para canais de cálcio dependentes de voltagem da subfamília Cav2, promovendo inibição parcial e estatisticamente significativa das correntes mediadas pelos canais Cav2.1 e Cav2.2. Em contraste, a toxina exibiu atividade reduzida sobre o canal Cav2.3 e não apresentou efeitos relevantes sobre os canais Cav1.2 e Cav3.1 nas condições experimentais avaliadas.

A ausência de alterações consistentes nos parâmetros cinéticos de ativação dos canais Cav2.1 e Cav2.2 sugere que a Apl1a atue predominantemente por um mecanismo compatível com bloqueio do poro do canal, em vez de uma modulação dependente do *gating*. Em conjunto, esses resultados oferecem indícios de uma base molecular que pode contribuir para a interpretação dos efeitos neurotóxicos previamente descritos *in vivo*, possivelmente associados à interferência na neurotransmissão dependente de Ca^{2+} .

Dessa forma, este trabalho contribui para a ampliação do conhecimento sobre a composição e o potencial farmacológico da peçonha de aranhas caranguejeiras brasileiras, além de posicionar a Apl1a como uma nova ferramenta molecular para o estudo da neurotransmissão mediada por canais Cav2 e para futuras aplicações biotecnológicas.

8. Perspectivas

- Caracterização eletrofisiológica da toxina Apl1a em canais Cav de insetos, particularmente em neurônios DUM de barata, visando verificar a conservação do perfil funcional observado em vertebrados.
- Realização de ensaios de transmissão sináptica em preparações neuronais intactas para avaliar diretamente o impacto da Apl1a sobre a liberação de neurotransmissores e a dinâmica de circuitos neurais.
- Avaliação de curvas dose-resposta e estudos adicionais de cinética em canais Cav2, visando aprofundar a caracterização farmacológica da toxina.
- Emprego de abordagens estruturais e *in silico* para investigar o possível sítio de interação da Apl1a nos canais Cav, contribuindo para a compreensão de sua seletividade e mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Thiago F. *et al.* Peptidomics of *Acanthoscurria gomesiana* spider venom reveals new toxins with potential antimicrobial activity. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 232–242, 2017.
- ADAMS, Michael E. *et al.* Toxotyping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms. **Biochemistry**, v. 32, n. 47, p. 12566–12570, 1 nov. 1993.
- ALEXANDER, Stephen P. H. *et al.* The concise guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Ion channels. **British Journal of Pharmacology**, 2013.
- ASHLEY, James; CARRILLO, Robert A. The Drosophila Larval Neuromuscular Junction: Developmental Overview. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2025, n. 7, 1 jul. 2025.
- BANNISTER, Roger A.; BEAM, Kurt G. Cav1.1: The atypical prototypical voltage-gated Ca²⁺ channel. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 2013.
- BEUCKMANN, Carsten T. *et al.* N-Type Calcium Channel α_{1B} Subunit (Ca_v2.2) Knock-Out Mice Display Hyperactivity and Vigilance State Differences. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 17, p. 6793–6797, 30 jul. 2003.
- BLADEN, Chris *et al.* Block of T-type calcium channels by protoxins I and II. **Molecular Brain**, v. 7, n. 1, p. 36, 9 dez. 2014.
- BLOCK, B. A. *et al.* Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. **Journal of Cell Biology**, 1988.
- BLOOMQUIST, Jeffrey R. Mode of action of atracotoxin at central and peripheral synapses of insects. **Invertebrate Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 45–50, nov. 2003.
- BOLAND, LM; MORRILL, JA; BEAN, BP. omega-Conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 8, p. 5011–5027, 1 ago. 1994.
- BOOTH, Ian R.; EDWARDS, Michelle D.; MILLER, Samantha. Bacterial Ion Channels. **Biochemistry**, v. 42, n. 34, p. 10045–10053, 1 set. 2003.
- BOURINET, Emmanuel *et al.* Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of α_{1E} (Cav2.3) calcium channels. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 1, p. 79–88, 2001.
- BRASIL. **Guia de animais peçonhentos do Brasil**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_animais_peconhentos_brasil.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2026.
- BRISTOWE, W. S. The Liphistiid Spiders. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 102, n. 4, p. 1015–1057, 30 dez. 1932.
- BRISTOWE, W. S. A contribution to the knowledge of liphistiid spiders. **Journal of Zoology**, v. 178, n. 1, p. 1–6, 20 jan. 1976.

BURAEI, Zafir; YANG, Jian. The β subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 4, p. 1461–1506, out. 2010.

CARDOSO, Fernanda C. *et al.* A spider-venom peptide with multitarget activity on sodium and calcium channels alleviates chronic visceral pain in a model of irritable bowel syndrome. **Pain**, v. 162, n. 2, p. 569–581, 1 fev. 2021.

CATTERALL, William A. Voltage-Gated Calcium Channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 8, p. a003947–a003947, 1 ago. 2011.

CATTERALL, William A.; LENAEUS, Michael J.; GAMAL EL-DIN, Tamer M. Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 60, n. 1, p. 133–154, 2020.

CHARALAMBOUS, Kalypso; WALLACE, B. A. NaChBac: The Long Lost Sodium Channel Ancestor. **Biochemistry**, v. 50, n. 32, p. 6742–6752, 16 ago. 2011.

CHASSAGNON, Irène R. *et al.* Potent neuroprotection after stroke afforded by a double-knot spider-venom peptide that inhibits acid-sensing ion channel 1a. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 14, p. 3750–3755, 4 abr. 2017.

CHEN, Yu-hang *et al.* Structural basis of the $\alpha 1$ – β subunit interaction of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Nature**, v. 429, n. 6992, p. 675–680, 30 jun. 2004.

CHIU, Joanna *et al.* Molecular Evolution of Glutamate Receptors: A Primitive Signaling Mechanism that Existed Before Plants and Animals Diverged. **Mol. Biol. Evol**, v. 16, n. 6, p. 826–838, 1999.

CHONG, Youmie *et al.* The ω -atracotoxins: Selective blockers of insect M-LVA and HVA calcium channels. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 623–638, ago. 2007a.

CHONG, Youmie *et al.* The ω -atracotoxins: Selective blockers of insect M-LVA and HVA calcium channels. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 623–638, ago. 2007b.

COLLAÇO, Rita de Cássia; VAN PETEGEM, Filip; BOSMANS, Frank. ω -Grammotoxin-SIA inhibits voltage-gated Na^{+} channel currents. **Journal of General Physiology**, v. 156, n. 10, 7 out. 2024.

CORZO, Gerardo *et al.* Insecticidal peptides from the therapsid spider *Brachypelma albiceps*: An NMR-based model of Ba2. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 8, p. 1190–1196, 2009.

CUI, Shouye *et al.* Noradrenergic $\alpha 2$ Receptor Modulates Cav2.2-Mediated Nociception in Parkinson's Disease Through Spinal Neuro-glial Network. **Molecular Neurobiology**, v. 63, n. 1, p. 86, 19 jan. 2026.

DA SILVA, Carolina Nunes *et al.* Pnpp-19 peptide as a novel drug candidate for topical glaucoma therapy through nitric oxide release. **Translational Vision Science and Technology**, v. 9, n. 8, p. 1–13, 1 jul. 2020.

DENG, Meichun *et al.* Inhibition of insect calcium channels by huwentoxin-V, a neurotoxin from Chinese tarantula *Ornithoctonus huwena* venom. **European Journal of Pharmacology**, v. 582, n. 1–3, p. 12–16, mar. 2008.

DIOCHOT, Sylvie *et al.* Dihydropyridines, phenylalkylamines and benzothiazepines block N-, P/Q- and R-type calcium currents. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 431, n. 1, p. 10–19, nov. 1995.

DOLPHIN, Annette C. The $\alpha 2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, jul. 2013.

DOLPHIN, Annette C.; LEE, Amy. Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 213–229, 11 abr. 2020.

ELLINOR, Patrick T. *et al.* Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 272–275, nov. 1994.

ERTEL, Eric A. *et al.* Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. **Neuron**, v. 25, n. 3, p. 533–535, mar. 2000.

ESCOUBAS, P. *et al.* Two novel peptide neurotoxins from the venom on the tarantula *Lasiodora parahybana*. **Toxicon**, v. 35, n. 6, p. 805–806, jun. 1997.

ESCOUBAS, Pierre; RASH, Lachlan. Tarantulas: Eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. **Toxicon**, v. 43, n. 5, p. 555–574, 2004.

FLINSPACH, M. *et al.* Insensitivity to pain induced by a potent selective closed-state Nav1.7 inhibitor. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 39662, 3 jan. 2017.

FLUCHER, Bernhard E. Skeletal muscle Cav1.1 channelopathies. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 472, n. 7, p. 739–754, 28 jul. 2020.

FOELIX, Rainer; ERB, Bruno. Mesothelae have venom glands. **Journal of Arachnology**, v. 38, n. 3, p. 596–598, dez. 2010.

FORSTER, Yvonne M. *et al.* VenoMS—A Website for the Low Molecular Mass Compounds in Spider Venoms. **Metabolites**, v. 10, n. 8, p. 327, 11 ago. 2020.

GAO, Shuai; YAO, Xia; YAN, Nieng. Structure of human Cav2.2 channel blocked by the painkiller ziconotide. **Nature**, v. 596, n. 7870, p. 143–147, 5 ago. 2021.

GARCIA, Alessa Bembom *et al.* Exploring the unknown activity of the Huwentoxin-II spider toxin family: A screening of Ap1 toxins from *Acanthoscurria paulensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 149037, nov. 2025.

GRANTHAM, C. J. *et al.* ω -conotoxin MVIIC reversibly inhibits a human N-type calcium channel and calcium influx into chick synaptosomes. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 2, p. 255–258, fev. 1994.

GROLLEAU, Françoise; LAPIED, Bruno. Dorsal Unpaired Median Neurones in the Insect

Central Nervous System: Towards a Better Understanding of the Ionic Mechanisms Underlying Spontaneous Electrical Activity. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 11, p. 1633–1648, 1 jun. 2000.

GUO, Ruiyin *et al.* Spider-Venom Peptides: Structure, Bioactivity, Strategy, and Research Applications. **Molecules**, v. 29, n. 1, 1 jan. 2024.

HAUPT, Joachim. Taxonomy of Spiders. **Toxin Reviews**, v. 24, n. 3–4, p. 249–256, 10 jan. 2005.

HEDIN, Marshal *et al.* Phylogenomic reclassification of the world's most venomous spiders (Mygalomorphae, Atracinae), with implications for venom evolution. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1636, 26 jan. 2018.

HEINEMANN, Stefan H. *et al.* Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. **Nature**, v. 356, n. 6368, p. 441–443, abr. 1992.

HENDRIXSON, Brent E.; BOND, Jason E. Evaluating the efficacy of continuous quantitative characters for reconstructing the phylogeny of a morphologically homogeneous spider taxon (Araneae, Mygalomorphae, Antrodiaetidae, *Antrodiaetus*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 1, p. 300–313, out. 2009.

HERZIG, Volker *et al.* Molecular basis of the remarkable species selectivity of an insecticidal sodium channel toxin from the African spider *Augacephalus ezendami*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29538, 7 jul. 2016.

HERZIG, Volker; KING, Glenn. The Cystine Knot Is Responsible for the Exceptional Stability of the Insecticidal Spider Toxin ω -Hexatoxin-Hv1a. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 4366–4380, 26 out. 2015.

HESS, Peter; TSIEN, Richard W. Mechanism of ion permeation through calcium channels. **Nature**, v. 309, n. 5967, p. 453–456, maio 1984.

HILLE, Bertil. Ionic channels of excitable membranes, Sinauer Assoc. **Inc., Sunderland, MA**, 2001.

HILLYARD, P. D. The book of the spider : from arachnophobia to the love of spiders. **Random House**, 1996.

HOCKERMAN, Gregory H. *et al.* MOLECULAR DETERMINANTS OF DRUG BINDING AND ACTION ON L-TYPE CALCIUM CHANNELS. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 361–396, abr. 1997.

HUMPHRIES, Jacqueline *et al.* Species-Independent Attraction to Biofilms through Electrical Signaling. **Cell**, v. 168, n. 1–2, p. 200–209.e12, jan. 2017.

JEGLA, Timothy; BUSEY, Gregory; ASSMANN, Sarah M. Evolution and structural characteristics of plant voltage-gated K⁺ channels. **Plant Cell**, 1 dez. 2018.

JEN, Joanna. Calcium channelopathies in the central nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 9, n. 3, p. 274–280, jun. 1999.

JIANG, Xiao *et al.* Both gain-of-function and loss-of-function de novo CACNA1A mutations cause severe developmental epileptic encephalopathies in the spectrum of Lennox-Gastaut syndrome. **Epilepsia**, v. 60, n. 9, p. 1881–1894, 1 set. 2019.

KABIR, Abbas; MUTH, Aaron. Polypharmacology: The science of multi-targeting molecules. **Pharmacological Research**, 1 fev. 2022.

KAESER, Pascal S.; REGEHR, Wade G. Molecular Mechanisms for Synchronous, Asynchronous, and Spontaneous Neurotransmitter Release. **Annual Review of Physiology**, v. 76, n. 1, p. 333–363, 10 fev. 2014.

KAISER, Ivan I. *et al.* Primary structures of two proteins from the venom of the Mexican red knee tarantula (*Brachypelma smithii*). **Toxicon**, v. 32, n. 9, p. 1083–1093, 1994.

KAMEI, Junzo *et al.* Antihyperalgesic effects of ProTx-II, a Nav1.7 antagonist, and A803467, a Nav1.8 antagonist, in diabetic mice. **Journal of Experimental Pharmacology**, p. 11, jun. 2015.

KAWASAKI, Fumiko *et al.* Active Zone Localization of Presynaptic Calcium Channels Encoded by the *cacophony* Locus of *Drosophila*. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 282–285, 7 jan. 2004.

KAWASAKI, Fumiko; COLLINS, Stephen C.; ORDWAY, Richard W. Synaptic Calcium-Channel Function in *Drosophila*: Analysis and Transformation Rescue of Temperature-Sensitive Paralytic and Lethal Mutations of *Cacophony*. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 14, p. 5856–5864, 15 jul. 2002.

KING, Glenn F. *et al.* A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 264–276, 1 ago. 2008.

KING, Glenn F.; ESCOUBAS, Pierre; NICHOLSON, Graham M. Peptide toxins that selectively target insect Nav and Cav channels. **Channels**, v. 2, n. 2, p. 100–116, 2008.

KLINT, Julie K. *et al.* Isolation, synthesis and characterization of ω -TRTX-Cc1a, a novel tarantula venom peptide that selectively targets L-type Cav channels. **Biochemical Pharmacology**, v. 89, n. 2, p. 276–286, 15 maio 2014.

KUHN-NENTWIG, Lucia; STÖCKLIN, Reto; NENTWIG, Wolfgang. Venom Composition and Strategies in Spiders: Is Everything Possible? In: **Advances in Insect Physiology**. Academic Press Inc., 2011. v. 40 p. 1–86.

KULKARNI, Siddharth; WOOD, Hannah M.; HORMIGA, Gustavo. Advances in the reconstruction of the spider tree of life: A roadmap for spider systematics and comparative studies. **Cladistics**, v. 39, n. 6, p. 479–532, 3 dez. 2023.

KUZMENKOV, Alexey I. *et al.* Spider venom peptides with unique fold selectively block Shaker-type potassium channels. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 82, n. 1, p. 300, 8 ago. 2025.

LAMPE, R. A. *et al.* Isolation and pharmacological characterization of omega-grammotoxin

SIA, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium channel responses. **Molecular pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 451–60, ago. 1993.

LANGENEGGER, Nicolas; NENTWIG, Wolfgang; KUHN-NENTWIG, Lucia. Spider Venom: Components, Modes of Action, and Novel Strategies in Transcriptomic and Proteomic Analyses. **Toxins**, v. 11, n. 10, p. 611, 22 out. 2019.

LEANDROU, Emmanouela *et al.* N-type Ca²⁺ channels mediate the stimuli-dependent α -synuclein secretion in mouse striatum. **npj Parkinson's Disease**, v. 11, n. 1, p. 276, 26 set. 2025.

LI-SMERIN, Yingying; SWARTZ, Kenton J. Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca²⁺ and K⁺ channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 8585–8589, 1998.

LI, Zhangqiang *et al.* Structural basis for different ω -agatoxin IVA sensitivities of the P-type and Q-type Cav2.1 channels. **Cell Research**, v. 34, n. 6, p. 455–457, 5 mar. 2024.

LIEBESKIND, Benjamin J.; HILLIS, David M.; ZAKON, Harold H. Evolution of sodium channels predates the origin of nervous systems in animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 22, p. 9154–9159, 31 maio 2011.

LITTLETON, J. Troy; GANETZKY, Barry. Ion Channels and Synaptic Organization: analysis of the *Drosophila* genome. **Neuron**, v. 26, n. 1, p. 35–43, abr. 2000.

LIU, Zhonghua *et al.* Function and solution structure of huwentoxin-X, a specific blocker of N-type calcium channels, from the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8628–8635, 31 mar. 2006.

LUCAS, Sylvia M. *et al.* Redescription and new distribution records of *Acanthoscurria paulensis* (Araneae: Mygalomorphae: Theraphosidae). **Zoologia (Curitiba)**, v. 27, n. 4, p. 563–568, ago. 2010.

LÜDDECKE, Tim *et al.* The biology and evolution of spider venoms. **Biological Reviews**, v. 97, n. 1, p. 163–178, 28 fev. 2022.

MANSERGH, Fiona *et al.* Mutation of the calcium channel gene *Cacna1f* disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 20, p. 3035–3046, 15 out. 2005.

MARTINAC, Boris; SAIMI, Yoshiro; KUNG, Ching. Ion Channels in Microbes. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1449–1490, out. 2008.

MATSUZAKI, Katsumi. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 8, p. 1687–1692, ago. 2009.

MCCLESKEY, E. W. *et al.* Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 12, p. 4327–4331, jun. 1987.

MCCORMICK, Kevin D.; MEINWALD, Jerrold. Neurotoxic acylpolyamines from spider

venoms. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 10, p. 2411–2451, out. 1993.

MCDONOUGH, S. I.; MINTZ, I. M.; BEAN, B. P. Alteration of P-type calcium channel gating by the spider toxin omega-Aga-IVA. **Biophysical Journal**, v. 72, n. 5, p. 2117–2128, maio 1997.

MCDONOUGH, Stefan I. *et al.* Voltage-Dependent Inhibition of N- and P-Type Calcium Channels by the Peptide Toxin ω -Grammotoxin-SIA. **Molecular Pharmacology**, v. 52, n. 6, p. 1095–1104, dez. 1997.

MENIN, Marcelo; RODRIGUES, Domingos De Jesus; AZEVEDO, Clarissa Salette de. Predation on amphibians by spiders (Arachnida, Araneae) in the Neotropical region. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 4, n. 1, p. 39, 1 jun. 2005.

MINTZ, IM. Block of Ca channels in rat central neurons by the spider toxin omega- Aga-IIIa. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 2844–2853, 1 maio 1994.

MOURÃO, Caroline Barbosa F. *et al.* Venomic and pharmacological activity of *Acanthoscurria paulensis* (Theraphosidae) spider venom. **Toxicon**, v. 61, n. 1, p. 129–138, 2013a.

MOURÃO, Caroline B. F. *et al.* Characterization of a novel peptide toxin from *Acanthoscurria paulensis* spider venom: A distinct cysteine assignment to the HWTX-II family. **Biochemistry**, v. 52, n. 14, p. 2440–2452, 2013b.

NORTON, Raymond S.; PALLAGHY, Paul K. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *In*: 1998.

NYFFELER, Martin; KNÖRNSCHILD, Mirjam. Bat Predation by Spiders. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58120, 13 mar. 2013.

OLIVERA, Baldomero M. *et al.* CALCIUM CHANNEL DIVERSITY AND NEUROTRANSMITTER RELEASE: The ω -Conotoxins and ω -Agatoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 823–867, jun. 1994.

OSTEEN, Jeremiah D. *et al.* Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain. **Nature**, v. 534, n. 7608, p. 494–499, 23 jun. 2016.

PALMA, Mario Sergio. The Acylpolyamines from Spider Venoms. *In*: **Studies in Natural Products Chemistry**. [S.l.]: Elsevier, 2012. v. 36 p. 27–42.

PENG, I. Feng; WU, Chun-Fang. *Drosophila cacophony* Channels: A Major Mediator of Neuronal Ca^{2+} Currents and a Trigger for K^{+} Channel Homeostatic Regulation. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 5, p. 1072–1081, 31 jan. 2007.

PENG, Kuan; CHEN, Xiang-Ding; LIANG, Song-Ping. The effect of Huwentoxin-I on Ca^{2+} channels in differentiated NG108-15 cells, a patch-clamp study. **Toxicon**, v. 39, n. 4, p. 491–498, abr. 2001.

PENG, Kuan; LIN, Ying; LIANG, Song-Ping. Nuclear magnetic resonance studies on huwentoxin-XI from the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*: ^{15}N labeling and

sequence-specific ^1H , ^{15}N nuclear magnetic resonance assignments. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 38, n. 7, p. 457–466, 1 jul. 2006.

PENNINGTON, Michael W.; CZERWINSKI, Andrzej; NORTON, Raymond S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2738–2758, 1 jun. 2018.

PEREZ-REYES, Edward. Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. 2003.

PIETROBON, Daniela. Cav2.1 channelopathies. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 460, n. 2, p. 375–393, 4 jul. 2010.

PINEDA, Sandy S. *et al.* Structural venomics reveals evolution of a complex venom by duplication and diversification of an ancient peptide-encoding gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 21, p. 11399–11408, 26 maio 2020.

PISER, Timothy M. *et al.* Complete and reversible block by ω -grammotxin SIA of glutamatergic synaptic transmission between cultured rat hippocampal neurons. **Neuroscience Letters**, v. 201, n. 2, p. 135–138, dez. 1995.

PLATZER, Josef *et al.* Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca^{2+} Channels. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 89–97, jul. 2000.

POCOCK, R. I. XII.— The genus *Poecilotheria*: its habits, history, and species. **Annals and Magazine of Natural History**, v. 3, n. 13, p. 82–96, 28 jan. 1899.

PRIEST, Birgit T. *et al.* ProTx-I and ProTx-II: Gating modifiers of voltage-gated sodium channels. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 194–201, fev. 2007.

RÁDIS-BAPTISTA, Gandhi; KONNO, Katsuhiro. Spider and wasp acylpolyamines: venom components and versatile pharmacological leads, probes, and insecticidal agents. **Toxins**, v. 16, n. 6, p. 234, 2024.

RATES, Breno *et al.* μ -Theraphotoxin-An1a: Primary structure determination and assessment of the pharmacological activity of a promiscuous anti-insect toxin from the venom of the tarantula *Acanthoscurria natalensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae). **Toxicon**, v. 70, p. 123–134, ago. 2013.

REDAELLI, Elisa *et al.* Target promiscuity and heterogeneous effects of tarantula venom peptides affecting Na^{+} and K^{+} ion channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 6, p. 4130–4142, 2010.

REDDY, A. Srinivas; ZHANG, Shuxing. Polypharmacology: drug discovery for the future. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 41–47, 10 jan. 2013.

REN, Dejian *et al.* A Prokaryotic Voltage-Gated Sodium Channel. **Science**, v. 294, n. 5550, p. 2372–2375, 14 dez. 2001.

REYES-OLIVARES, Claudio *et al.* Lizard predation by spiders: A review from the Neotropical and Andean regions. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 20, p. 10953–10964, 22 out. 2020.

RICHARDS, Kay L. *et al.* Selective Nav1.1 activation rescues Dravet syndrome mice from seizures and premature death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 34, 21 ago. 2018.

RIOS, Eduardo; BRUM, Gustavo. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Nature**, 1987.

ROSSIGNOL, E. **Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders**. **Neural Plasticity** Hindawi Publishing Corporation, , 2011.

SAEZ, Natalie J.; HERZIG, Volker. Versatile spider venom peptides and their medical and agricultural applications. **Toxicon**, v. 158, p. 109–126, 1 fev. 2019.

SATHER, William A.; MCCLESKEY, Edwin W. Permeation and Selectivity in Calcium Channels. **Annual Review of Physiology**, v. 65, n. 1, p. 133–159, mar. 2003.

SAVEL-NIEMANN, Anette. Tarantula (*Eurypelma californicum*) Venom, a Multicomponent System. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, 1989.

SELDEN, Paul A.; GALL, Jean-claude. A Triassic mygalomorph spider from the northern Vosges, France. **Paleontology**, v. 35, p. 211–235, 1992.

SELDEN, Paul A.; PENNEY, David. Fossil spiders. **Biological Reviews**, v. 85, n. 1, p. 171–206, 12 fev. 2010.

SHU, Q.; LIANG, S. Purification and characterization of huwentoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. **The Journal of Peptide Research**, v. 53, n. 5, p. 486–491, maio 1999.

SHU, Qin *et al.* The structure of spider toxin huwentoxin-II with unique disulfide linkage: Evidence for structural evolution. **Protein Science**, v. 11, n. 2, p. 245–252, 2009.

SILVA, Carolina Nunes da *et al.* From the PnTx2-6 toxin to the PnPP-19 engineered peptide: Therapeutic potential in erectile dysfunction, nociception, and glaucoma. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, p. 831823, 2022.

SIMSKE, Jeffrey S. Claudins reign. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 3, p. e25502, jul. 2013.

SINGER, Dafna *et al.* The Roles of the Subunits in the Function of the Calcium Channel. **Science**, v. 253, n. 5027, p. 1553–1557, 27 set. 1991.

SMITH, Lee A. *et al.* Courtship and Visual Defects of cacophony Mutants Reveal Functional Complexity of a Calcium-Channel $\alpha 1$ Subunit in *Drosophila*. **Genetics**, v. 149, n. 3, p. 1407–1426, 1 jul. 1998.

SOUSA, Silmara R. *et al.* Discovery and mode of action of a novel analgesic β -toxin from the African spider *Ceratogyrus darlingi*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0182848, 7 set. 2017.

SPLAWSKI, Igor *et al.* Cav1.2 Calcium Channel Dysfunction Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism. **Cell**, v. 119, n. 1, p. 19–31, out. 2004.

TAKAHASHI, M. *et al.* Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 15, p. 5478–5482, ago. 1987.

TAKAHASHI, Tomoyuki; MOMIYAMA, Akiko. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. **Nature**, v. 366, n. 6451, p. 156–158, nov. 1993.

TALAVERA, Karel *et al.* Aspartate Residues of the Glu-Glu-Asp-Asp (EEDD) Pore Locus Control Selectivity and Permeation of the T-type Ca^{2+} Channel α 1G. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 45628–45635, 7 dez. 2001.

TEDFORD, Hugo W. *et al.* Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. **Toxicon**, v. 43, n. 5, p. 601–618, abr. 2004a.

TEDFORD, Hugo W. *et al.* Scanning Mutagenesis of ω -Atracotoxin-Hv1a Reveals a Spatially Restricted Epitope That Confers Selective Activity against Insect Calcium Channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 42, p. 44133–44140, out. 2004b.

TEDFORD, Hugo W. *et al.* A model genetic system for testing the *in vivo* function of peptide toxins. **Peptides**, v. 28, n. 1, p. 51–56, jan. 2007.

TIBERY, Diogo Vieira *et al.* Purification and characterization of peptides Ap2, Ap3 and Ap5 (ω -toxins) from the venom of the Brazilian tarantula *Acanthoscurria paulensis*. **Peptides**, v. 145, p. 170622, nov. 2021.

TRIGGLE, D. J. Calcium-channel drugs: structure-function relationships and selectivity of action. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 18 Suppl 10, p. S1-6, 1991.

TURNBULL, A. L. Ecology of the True Spiders (Araneomorphae). **Annual Review of Entomology**, v. 18, n. 1, p. 305–348, jan. 1973.

VAN DER SCHYF, Cornelis J.; YODIM, Moussa B. H. Multifunctional drugs as neurotherapeutics. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 1, p. 1–3, jan. 2009.

VAN PETEGEM, Filip *et al.* Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel β -subunit and an α -subunit domain. **Nature**, v. 429, n. 6992, p. 671–675, 12 jun. 2004.

VESTARON. **SPEAR® T insecticide**. Disponível em: <<https://www.vestaron.com/spear-t-liquid-concentrate-bioinsecticide-for-greenhouses-vestaron/>>. Acesso em: 1 jan. 2026.

WAN, Jinjin *et al.* Characterization of excitatory synaptic transmission in the retrosplenial cortex of adult mice. **Molecular Pain**, v. 21, 3 nov. 2025.

WANG, Xiu Hong *et al.* Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 6, p. 505–513, 2000.

WEISS, Norbert; ZAMPONI, Gerald W. Genetic T-type calcium channelopathies. **Journal of Medical Genetics**, v. 57, n. 1, p. 1–10, jan. 2020.

WHEELER, DB; RANDALL, A.; TSIEN, RW. Changes in action potential duration alter

- reliance of excitatory synaptic transmission on multiple types of Ca^{2+} channels in rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 7, p. 2226–2237, 1 abr. 1996.
- WICHER, Dieter; PENZLIN, Heinz. Ca^{2+} Currents in Central Insect Neurons: Electrophysiological and Pharmacological Properties. **Journal of Neurophysiology**, v. 77, n. 1, p. 186–199, 1 jan. 1997.
- WINDLEY, Monique J. *et al.* Spider-Venom Peptides as Bioinsecticides. **Toxins**, v. 4, n. 3, p. 191–227, 22 mar. 2012.
- WINTERFIELD, Jeffrey R.; SWARTZ, Kenton J. A Hot Spot for the Interaction of Gating Modifier Toxins with Voltage-Dependent Ion Channels. **The Journal of General Physiology**, v. 116, n. 5, p. 637–644, 1 nov. 2000.
- WORLD SPIDER CATALOG. **World Spider Catalog**. Disponível em: <<http://wsc.nmbe.ch>>. Acesso em: 15 jan. 2026.
- WU, Jianping *et al.* Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. **Science**, v. 350, n. 6267, 2015.
- WU, Jianping *et al.* Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. **Nature**, v. 537, n. 7619, p. 191–196, 8 set. 2016.
- XIN, Xu *et al.* A genus-level taxonomic review of primitively segmented spiders (Mesothelae, Liphistiidae). **ZooKeys**, v. 488, p. 121–151, 21 mar. 2015.
- YAN, Yang yang *et al.* Peptide neurotoxins affecting insect voltage-gated calcium channels and possessing insecticidal toxicity: Two ω -Atypitoxins from *Calommata signata*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 208, 1 mar. 2025.
- YANG, Jian *et al.* Molecular determinants of Ca^{2+} selectivity and ion permeation in L-type Ca^{2+} channels. **Nature**, v. 366, n. 6451, p. 158–161, nov. 1993.
- YU, Frank H. *et al.* Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. v. 57, n. 4, p. 387–395, 2005.
- YU, Frank H.; CATTERALL, William A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, 2004.
- YU, Na *et al.* Insecticidal toxicity of ω -Atypitoxin-Cs1a and its inhibitory effects on insect voltage-gated calcium channels. **Pest Management Science**, v. 79, n. 12, p. 4879–4885, 1 dez. 2023.
- YUAN, Chunhua *et al.* Jingzhaotoxin-XII, a gating modifier specific for Kv4.1 channels. **Toxicon**, v. 50, n. 5, p. 646–652, out. 2007.
- YUAN, Chun-Hua *et al.* Discovery of a Distinct Superfamily of Kunitz-Type Toxin (KTT) from Tarantulas. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, p. e3414, 15 out. 2008.
- ZAMPONI, Gerald W. *et al.* The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated

Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 821–870, out. 2015.

ZHANG, Peng-Fei *et al.* 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**, v. 42, n. 1, p. 15–20, jul. 2003.

ZHAO, Yanyu *et al.* Cryo-EM structures of apo and antagonist-bound human Cav3.1. **Nature**, v. 576, n. 7787, p. 492–497, 19 dez. 2019.

ZHENG, Jie; TRUDEAU, Matthew C. **Textbook of Ion Channels Volume II**. Boca Raton: CRC Press, 2023.