

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

*Produção da toxina recombinante
PnTx4(5-5) e caracterização de sua
ação farmacológica sobre canais para
sódio de inseto e de mamífero*

Ana Luiza Bittencourt Paiva

Belo Horizonte
Dezembro- 2015

Ana Luiza Bittencourt Paiva

*Produção da toxina recombinante PnTx4(5-5) e
caracterização de sua ação farmacológica
sobre canais para sódio de inseto e de
mamífero*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia

Co-orientadores: Dra. Alessandra Cristine de Souza Matavel

Dr. Marcelo Ribeiro Vasconcelos Diniz

Belo Horizonte

Dezembro - 2015

Este trabalho foi realizado:

- No Serviço de Toxinologia Molecular do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte - MG;
- No Laboratório de Venenos e Toxinas Animais e no Núcleo de Estudo de Estrutura e Função de Biomoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais;
- No laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven (KU Leuven) – Bélgica

Apoio financeiro:

- FAPEMIG;
- CAPES;
- CNPq;
- INCTTOX

Dedicatória

Dedico esse trabalho ao meu esposo Lintz, meu maior incentivador, e à uma pessoa que ainda não nasceu, mas que foi uma motivação a mais nessa etapa final.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Maria Elena, pela oportunidade, pelos ensinamentos e sobretudo, pela confiança.

Ao meu co-orientador, Dr. Marcelo Diniz, pelo incentivo, pelos conselhos e pelas palavras de apoio nos momentos mais difíceis.

À minha co-orientadora, Dra. Alessandra Matavel, por me iniciar no “desconhecido mundo” da eletrofisiologia e compartilhar seus conhecimentos. Pela amizade e, sobretudo, pela paciência.

A todos colegas e amigos da Funed, não citarei todos os nomes para não correr o risco de esquecer alguém. Mas não posso deixar de agradecer especialmente à Ana Valentim, pelos imprescindíveis ensinamentos de cromatografia, e à Elaine, pela disponibilidade e pela ajuda indispensável com os experimentos. Ao Paulo, pelo auxílio fundamental com as moscas e baratas. À Dra Marta Cordeiro pela amostra de toxina nativa e à Dra. Esther Bastos, pelo apoio e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, especialmente ao Daniel, pelo auxílio na espectrometria de massas e à Bruna, pela ajuda nos experimentos de analgesia. À Fernanda, pelas risadas e momentos de descontração. Ao Julinho, pela ajuda com os animais.

Ao Dr. Jarbas Magalhães, Karla e Virgílio, do Departamento de Química da UFMG, pelos experimentos de dicroísmo circular.

Ao Dr. Jan Tytgat pela oportunidade do estágio sanduíche e a todos os integrantes do laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven, pela acolhida. Agradeço especialmente ao Steve, pelos ensinamentos, pela paciência e amizade.

Aos professores e funcionários da pós-graduação em Bioquímica e Imunologia.

À minha mãe, pelo carinho, pela eterna preocupação e por ter me proporcionado as bases que me permitiram chegar até aqui. Ao meu pai, que se foi bem antes de eu iniciar esse doutorado, mas sei que continua olhando por mim. A minha irmã, por ser minha amiga e companheira de todas as horas.

Ao Lintz, pelo amor, incentivo, companheirismo e paciência. Pelo apoio e compreensão durante minha distância. Por ser meu anjo e fazer sempre o possível para me ajudar!

Sumário

Lista de Abreviaturas	I
Lista de abreviaturas dos aminoácidos	III
Lista de Figuras	IV
Lista de Tabelas	VI
ABSTRACT	1
RESUMO	2
1 Introdução.....	3
1.1 O veneno da aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	3
1.2 A fração PhTx4 e a toxina PnTx4(5-5)	5
1.3 Toxinas animais com efeito antinociceptivo	7
1.4 Canais para sódio ativados por voltagem	9
1.5 Sítios de ligação de toxinas em canais para sódio.....	13
2 Justificativa	17
3 Objetivos.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 Material e métodos	20
4.1 Glândulas veneníferas.....	20
4.2 Linhagens de <i>E.coli</i>	20
4.3 Toxina PnTx4(5-5).....	20
4.4 Animais.....	20
4.5 Clonagem da toxina recombinante PnTx4(5-5).....	21
4.5.1 Extração de RNA total	21
4.5.2 Síntese da primeira fita de cDNA.....	22
4.5.3 Amplificação do cDNA codificante da toxina PnTx4(5-5)	22
4.5.4 Clonagem no vetor pGEM- T	23
4.5.5 Transformação em células <i>E. coli</i> DH5 α	24
4.5.6 PCR de colônia.....	25
4.5.7 Extração do DNA plasmidial	25
4.5.8 Digestão dos clones com inserto	25
4.5.9 Clonagem no vetor pET32c	26
4.5.10 Sequenciamento.....	28

4.5.11	Transformação em células Rosetta-gami (DE3) pLysS.....	29
4.6	Expressão, purificação e caracterização de rPnTx4(5-5).....	29
4.6.1	Expressão	29
4.6.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).....	30
4.6.3	Cromatografia de afinidade.....	30
4.6.4	Cromatografia de gel filtração	31
4.6.5	Clivagem de Trx-rPnTx4(5-5)	31
4.6.6	Espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF	31
4.6.7	Cromatografia de fase reversa	32
4.6.8	Dosagem de proteínas	32
4.6.9	Dicroísmo circular	33
4.7	Mutações sítio dirigidas	33
4.7.1	Metilação	34
4.7.2	Mutação sítio dirigida.....	34
4.7.3	Transformação dos clones mutantes	35
4.7.4	Expressão, purificação e caracterização dos mutantes	35
4.8	Avaliação da atividade biológica de rPnTx4(5-5)	36
4.8.1	Teste de toxicidade em insetos	36
4.8.2	Teste de medida do limiar nociceptivo	37
4.9	Ensaio eletrofisiológicos.....	39
4.9.1	Isolamento de ovócitos de rã e expressão dos canais para sódio.....	39
4.9.2	Registros eletrofisiológicos	40
5	Resultados.....	42
5.1	Clonagem	42
5.1.1	Extração de RNA.....	42
5.1.2	Síntese do cDNA e amplificação do cDNA de PnTx4(5-5).....	43
5.1.3	Clonagem no vetor pGEM-T e digestão dos clones recombinantes.....	43
5.1.4	Construção do vetor recombinante de expressão pET32- PnTx4(5-5)...	44
5.1.5	PCR de colônia.....	45
5.1.6	Sequenciamento.....	45
5.2	Expressão, purificação e caracterização da proteína recombinante Trx-PnTx4(5-5).....	47
5.2.1	Expressão	47
5.2.2	Cromatografias de afinidade e gel filtração.....	48
5.2.3	Clivagem	50
5.2.4	Cromatografia de fase reversa	51

5.2.5	Espectrometria de massas	52
5.2.6	Dicroísmo circular	53
5.3	Obtenção e caracterização dos mutantes da toxina rPnTx4(5-5).....	54
5.4	Atividade biológica.....	58
5.4.1	Toxicidade em insetos	58
5.4.2	Teste de medida do limiar nociceptivo	59
5.5	Ensaio eletrofisiológicos.....	60
5.5.1	Ação de rPnTx5(5-5) no canal para sódio de inseto	60
5.5.2	Ação de rPnTx5(5-5) nos canais para sódio de mamífero	64
5.5.3	Comparação dos efeitos das toxinas recombinante e nativa nos canais Na _v 1.3 e Na _v 1.5	67
5.5.4	Ação dos mutantes da toxina no canal Na _v Bg	69
6	Discussão	70
7	Conclusões gerais	86
8	Perspectivas	87
9	Referências bibliográficas	88
10	Anexos	108
10.1	Resumos publicados em anais de congressos	108
10.2	Patentes	109
10.3	Artigos completos em periódicos	110

Lista de Abreviaturas

BSA: Soro Albumina Bovino
DL₅₀: Dose letal para 50% dos animais testados
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
dNTP: Desoxi nucleotídeo 5'-trifosfato
DTT: Ditioneitol
OD: Densidade Óptica
EC₅₀: Concentração efetiva que produz 50% do efeito máximo
EDTA: Ácido Etileno Diaminotetracético
EPM: Erro padrão da média
g_{Na}: Condutância ao Sódio
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance
IC₅₀: Concentração inibitória que produz 50% do efeito máximo
ICK: Nó Inibitório de Cisteína
I_{Na}: Corrente de Sódio
IPTG: Isopropil-tio-β-D-galactosídeo
Kb: Quilobase
kDa: Quilodalton
Kg: Fator de inclinação da curva de ativação
Kh: Fator de inclinação da curva de inativação
LB: Meio de Cultura Luria-Bertani
mA: miliamper
MALDI-TOF-TOF (MS) - Espectrometria de Massa de Tempo de vôo *in tandem* de Ionização e Dessorção por Laser Assistida por Matriz
MCS: Sítio múltiplo de clonagem
mM: MiliMolar
mRNA: RNA mensageiro
Na_v: Canais para Sódio Sensíveis à Voltagem
NMDA: N-metil-D-aspartato
Oligo(dt): Oligonucleotídeo polidesoxitimidina

OPA: tampão “*One for All*”
pb: Pares de bases
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PGE₂: Prostaglandina E2
PSA: Persulfato de Amônia
q.s.p: Quantidade Suficiente Para
RNA: Ácido ribonucléico
RNase: ribonuclease
rpm: rotações por minuto
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SAM: s-adenosil-metionina
SDS: Dodecil Sulfato de sódio
SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida com SDS
T4 DNA ligase: DNA ligase do bacteriófago
TAE: Tampão Tris, Ácido acético, EDTA
Taq DNA: polimerase termoestável do *Thermus aquaticus*
TE: Tampão Tris e EDTA
TEV: Tobacco Etch Virus
TFA: Ácido trifluoroacético
TEMED: Tetrametiletilenodiamino
Tris-HCl: Tris (hidroximetil) aminometano e ácido clorídrico
Trx: Tio redoxina
TTX: Tetrodotoxina
V: Potencial / Voltagem
Vg: Voltagem correspondente a 50% do máximo da ativação
Vh: Voltagem correspondente a 50% do máximo da inativação
U: Unidade de enzima
V: Volts
v/v: razão volume por volume

Lista de abreviaturas dos aminoácidos

Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteina	Cys	C
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M

Lista de Figuras

Figura 1- Aranha <i>Phoneutria nigriventer</i> em posição de defesa.....	3
Figura 2 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das toxinas PnTx4(5-5) e PnTx4(6-1) antes do processamento.....	6
Figura 3 - Representação esquemática do canal para sódio ativado por voltagem mostrando as subunidades α e β	10
Figura 4 - Sítios de ligação de toxinas em canais para sódio.....	16
Figura 5- Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação do cDNA PnTx4(5-5).	23
Figura 6 - Mapa do vetor pGEM -T (Promega).....	24
Figura 7 - Mapa do vetor pET32c (Novagen).....	27
Figura 8 - Construção do vetor recombinante de expressão pET32-PnTx4(5-5).....	28
Figura 9 - Sequência da toxina rPnTx4(5-5) com os aminoácidos onde foi realizada a substituição por alanina destacados em negrito.....	33
Figura 10 - Aparato utilizado para injeção da toxina nas moscas.....	36
Figura 11- Aparelho algesímetro (Ugo Basile, Itália) utilizado para medir o limiar nociceptivo dos animais.....	38
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1%, do RNA total extraído da glândula da aranha <i>P. nigriventer</i>	42
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose (2%), do cDNA da toxina PnTx4(5-5) amplificado por PCR.....	43
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose (0,8% e 2%), mostrando os produtos da digestão do vetor pGEM-Tx4(5-5).....	44
Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) mostrando o produto da digestão do vetor pET32c.....	44
Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose (2%) da PCR de colônia.....	45
Figura 17 – Resultado do sequenciamento após a clonagem da sequência do cDNA da toxina PnTx4(5-5).	46
Figura 18 - Avaliação da cinética de expressão da proteína em fusão Trx-rPnTx4(5-5) por SDS-PAGE 12,5%.....	47
Figura 19 – Perfil da cromatografia de afinidade (IMAC) resultante da aplicação do extrato celular contendo a proteína em fusão Trx-rPnTx4(5-5) em coluna Histrap HP (0,7 x 2.5 cm/ 1 ml).....	48
Figura 20: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% dos produtos resultantes da expressão, seguida da purificação da proteína de fusão rTrx-PnTx4(5-5).	49
Figura 21 – Perfil da cromatografia de fase reversa, resultante da aplicação da mistura da reação de clivagem da proteína rTrx-PnTx4(5-5) pela TEV protease.....	51
Figura 22 - Figura representativa da espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF do material purificado por cromatografia de fase reversa.....	52
Figura 23 - Espectro de dicróismo circular da toxina PnTx4(5-5) nativa e recombinante.	53
Figura 24 - Espectro de massas do mutante Y24A. A massa encontrada foi de 5136.312 Da.	55
Figura 25 - Espectro de massas do mutante R32A. A massa encontrada foi de 5146.721 Da.	56

Figura 26 - Espectro de massas do mutante F36A. A massa encontrada foi de 5152.294 Da.	57
Figura 27 - Efeito da administração intratecal das toxinas PnTx4(5-5) nativa (PnTx4(5-5) nat) e recombinante (PnTx4(5-5) rec), sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E2.	59
Figura 28 - Ação de rPnTx5(5-5) no canal para sódio (Na_vBg) de barata, <i>Blattella germanica</i>	61
Figura 29 - Efeitos de rPnTx5(5-5) na cinética de ativação e de inativação do canal NavBg.	62
Figura 30 - Efeitos de diferentes concentrações de rPnTx5(5-5) no canal NavBg.	63
Figura 31 - Efeitos de rPnTx5(5-5) em diferentes isoformas de canais para sódio de mamífero, expressos em ovócitos de <i>Xenopus</i>	64
Figura 32 - Efeito de rPnTx4(5-5) na corrente do canal Nav1.3.	65
Figura 33- Efeitos de rPnTx4(5-5) na cinética de ativação e de inativação dos canais Na_v 1.3 e 1.5.	67
Figura 34 - Comparação dos efeitos de PnTx5(5-5) nativa e recombinante, nos canais Nav1.3 e Nav1.5.	68
Figura 35 - Comparação dos efeitos de rPnTx5(5-5) e do mutante R32A, no canal para sódio de inseto, NavBg.	69
Figura 36 - Resumo esquemático dos principais resultados obtidos nesse trabalho (<i>Graphical abstract</i>)	85

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequência dos <i>iniciadores forward e reverse</i> utilizados nas reações de mutação sítio dirigidas..	35
Tabela 2 - Massa teórica calculada para cada mutante da toxina PnTx4(5-5)	54
Tabela 3 - Sintomas observados em moscas após a injeção de salina/BSA (controle) e 10ng de rPnT4(5-5) diluída na mesma solução.	58
Tabela 4 - Parâmetros calculados a partir das curvas de ativação e do estado estacionário da inativação do canal NavBg, no controle e na presença da toxina rPnTx5(5-5).	62
Tabela 5 - Parâmetros calculados a partir das curvas de ativação e de inativação para as isoformas de canais para sódio de mamífero testadas, no controle e na presença da toxina rPnTx4(5-5).	66

ABSTRACT

The venom from the spider *Phoneutria nigriventer* contains several neurotoxic polypeptides, which act on ion channels and other receptors of insects and mammals. The ability of such toxins to discriminate between different ion channels renders them potential models for the development of new biologically active tools of medical or biotechnological applications. Identifying their molecular binding targets and elucidating their mechanism of action are the first challenges to overcome, before considering toxins as potential lead compounds for drug discovery. The toxin PnTx4(5-5) have high insecticidal activity and no macroscopic behavioral effects when injected by intracerebral *via* in mice. Nevertheless, it can inhibit the NMDA - subtype of glutamate receptors of cultured rat hippocampal neurons. Furthermore, it was demonstrated to have peripheral and central antinociceptive effect in mice and rats. PnTx4(5-5) shares 63% sequence identity with toxin PnTx4(6-1), that was previously shown to act on the insect sodium channel. Thus, we proposed to investigate if the PnTx4(5-5) could have effects both on insect and mammalian sodium channels. However, the difficulty in obtaining large amounts of venom and isolating its toxins represent a limiting factor for carrying out studies on *P. nigriventer* toxins. To overcome this problem, in this study we have cloned and expressed the toxin PnTx4(5-5) in *E. coli*. The recombinant toxin, rPnTx4 (5-5), demonstrated to have secondary structure and biological activity similar to the native one. Results from electrophysiological experiments showed that rPnTx4(5-5) is a sodium channel gating modifier and has different affinity and mode of action on insect and mammalian sodium channels. The toxin strongly slowed down the inactivation of the cockroach sodium channel, increasing the peak current. Besides that, the toxin inhibited the sodium current on mammalian sodium channels, which is probably due to the small, but significant shift in the activation potential to more depolarized potentials, as observed on the channels Na_v1.3 and Na_v1.5. In addition, we produced some mutants of PnTx4(5-5) for structure-function relationship studies. The mutant R32A demonstrated to have lower activity on insect sodium channels than the original toxin, suggesting that this amino acid can be involved in the affinity of the toxin for sodium channels. This study can contribute to better understanding the structure/function relationship of mammal and insect toxins on sodium channels.

Keywords: *Phoneutria* venom, PnTx4(5-5), recombinant toxin, sodium channel

RESUMO

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* contém vários polipeptídeos neurotóxicos que agem em canais iônicos e outros receptores de insetos e de mamíferos. A capacidade dessas toxinas de discriminar entre diferentes tipos de canais iônicos as tornam potenciais modelos para o desenvolvimento de novas moléculas para aplicação médica e biotecnológica. A toxina PnTx4(5-5) possui alta atividade inseticida, mas não apresenta efeitos comportamentais macroscópicos quando injetada pela via intracerebral em camundongos. No entanto, esta toxina é capaz de inibir o subtipo NMDA de receptores de glutamato de neurônios hipocâmpais de rato. Além disso, foi demonstrado também um efeito antinociceptivo central e periférico em camundongos e ratos. PnTx4(5-5) possui 63% de identidade de sequência com a toxina PnTx4(6-1), que possui ação em canal para sódio de insetos. Assim, propusemos investigar se PnTx4(5-5) poderia ter efeitos tanto sobre os canais para sódio de insetos, quanto de mamíferos. No entanto, a dificuldade em obter grandes quantidades de veneno e de isolar suas toxinas representa um fator limitante para a realização de estudos com toxinas de *P. nigriventer*. Assim, nesse estudo, a toxina PnTx4(5-5) foi expressa de forma heteróloga em *E. coli* e demonstrou ter estrutura secundária e a atividade biológica semelhante à toxina nativa. Os resultados dos experimentos eletrofisiológicos demonstraram que rPnTx4(5-5) é uma modificadora de "gating" e apresenta diferentes afinidades e modo de ação sobre os canais para sódio de inseto e de mamífero. A toxina retardou de forma notável a inativação do canal para sódio de barata, aumentando o pico da corrente de sódio. A mesma também inibiu a corrente de sódio dos canais para sódio de mamífero, o que pode ser devido a mudança no potencial de ativação para potenciais mais despolarizados, como observado nos canais Nav1.3 e Nav1.5. Além disso, foram produzidos alguns mutantes de PnTx4(5-5) para estudos de relação estrutura-função. O mutante R32A demonstrou ter uma menor atividade nos canais de sódio de insetos do que a toxina original, sugerindo que este aminoácido pode estar envolvido na afinidade da toxina para os canais para sódio. Este estudo poderá contribuir para o melhor entendimento da relação estrutura/função de toxinas anti-inseto e anti-mamífero em canais para sódio.

Palavras-chave: veneno *Phoneutria*, PnTx4 (5-5), toxina recombinante, canal para sódio

1 Introdução

1.1 O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*

As espécies de aranha do gênero *Phoneutria*, pertencentes à família Ctenidae, são conhecidas como armadeiras, devido à posição típica que assumem quando são ameaçadas. Estas aranhas são encontradas em áreas de floresta da América Central (Costa Rica) e em toda região da América do Sul compreendida entre o leste dos Andes e o norte da Argentina (Martins & Bertani, 2007).

As aranhas da espécie *Phoneutria nigriventer* (Figura 1) ocorrem no Brasil especialmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Capocasale, 1984). Essas aranhas são bastante agressivas, possuem hábitos noturnos e caçam suas presas ativamente. Como não constroem teias, seu sucesso como predador é, em parte, explicado pela potência de sua peçonha (Sorensen, 1990, Gomez et al., 2002).



Figura 1- Aranha *Phoneutria nigriventer* em posição de defesa.

Fonte: www.viralnova.com

Da peçonha dessa aranha foram isolados diversos componentes biologicamente ativos, dentre eles diversas toxinas que se ligam a canais iônicos e receptores de membrana (Gomez et al., 2002; Richardson et al., 2006; Borges et al., 2009, De Lima et al., 2015). Os canais iônicos estão envolvidos em diversas funções biológicas, incluindo neurotransmissão, contração muscular, secreção de hormônios, excitabilidade, dentre outros; assim a peçonha de *Phoneutria* é capaz de causar uma ampla gama de distúrbios fisiopatológicos. Dentre os sintomas causados pelos acidentes com essa aranha estão: dor excruciante que se irradia do local da picada, câimbras dolorosas, tremores, convulsões tônicas, paralisia espástica, sialorréia, sudorese, priapismo, taquicardia, arritmias e perturbações visuais (Fontana, 1990).

A maioria das toxinas purificadas da peçonha de *Phoneutria nigriventer* são polipeptídeos com 30 a 80 resíduos de aminoácidos e massas moleculares entre 3500 e 9000 Da (Gomez et al., 2002, para revisão ver De Lima et al, 2015). Inicialmente foram isoladas da peçonha três diferentes frações de polipeptídeos neurotóxicos (PhTx1, PhTx2 and PhTx3) e uma fração não tóxica denominada fração M, capaz de provocar contração em íleo de cobaia. Quando estas frações foram injetadas pela via intracerebral (i.c) em camundongos, as doses letais foram de 45 µg/kg para a fração PhTx1, 1,7 µg/kg para PhTx2 e 137 µg/kg para PhTx3 (Rezende Jr et al., 1991).

A fração PhTx1 é composta pela toxina PnTx1, capaz de bloquear canais para sódio (Martin-Moutot et al., 2006, Silva et al., 2012). A fração PhTx2 é responsável pela maioria dos efeitos excitotóxicos da peçonha (Cordeiro et al., 1992, Araujo et al., 1993). Das nove toxinas purificadas dessa fração, PnTx2-5 e PnTx2-6 são as mais tóxicas para camundongos (Cordeiro et al., 1992) e capazes de alterar a cinética de inativação de canais para sódio (Matavel et al., 2002, 2009). Da fração PhTx3 foram purificadas seis toxinas (Cordeiro et al., 1993), sendo que a maioria delas bloqueia diferentes tipos de canais para cálcio (Guatimosim et al., 1997, Cassola et. al., 1998, Leão et al., 2000, Dos Santos et al., 2002), influenciando assim a liberação de neurotransmissores (Gomez et al., 1995, Prado et al., 1996). Além disso,

também foi demonstrado que a toxina PnTx3-1 é capaz de bloquear canais para potássio (Kushmerick et al., 1999).

1.2 A fração PhTx4 e a toxina PnTx4(5-5)

Ao contrário das outras frações, a última fração isolada da peçonha, PhTx4, não demonstrou atividade tóxica aparente quando em mamíferos (camundongos). No entanto, esta apresentou atividade inseticida, causando sintomas como hiperatividade, salivação, fadiga muscular e paralisia em insetos das ordens Diptera (*Musca domestica*) e Dictyoptera (*Periplaneta americana*) (Figueiredo et al. 1995). A partir da fração PhTx4 foram isoladas inicialmente sete sub-frações: PhTx4(1) - PhTx4(7), e dessas foram purificadas e caracterizadas, até o momento, três toxinas com atividade inseticida: PnTx4(6-1) (Figueiredo et al., 1995), PnTx4(5-5) (Figueiredo et al., 2001) e PnTx4-3 (Oliveira et al., 2003), sendo que essa última difere de PnTx4(6-1) em apenas um aminoácido. Nenhuma dessas toxinas apresentou toxicidade aparente quando injetadas na quantidade de até 30 µg pela via i.c. em camundongos, mas apresentaram potente atividade inseticida com DL₅₀ em moscas de 20ng/g (PnTx4(6-1) e 50ng/g (PnTx4(5-5) (Figueiredo et al., 1995, 2001).

Penaforte e colaboradores (2000) isolaram clones de cDNA que codificam para a sequência de PnTx4(6-1) e para outras duas proteínas, Pn4A e Pn4B que apresentaram alta similaridade com PnTx4(6-1). Depois foi verificado que a proteína Pn4A trata-se da toxina PnTx4(5-5) (Figueiredo et al., 2001). Em uma biblioteca de cDNA, construída posteriormente em nosso laboratório (Paiva, comunicação pessoal), também obtivemos os clones dessas toxinas e foi confirmado que, assim como a maioria das toxinas de *Phoneutria*, essas são sintetizadas na glândula na forma de preprotoxinas, com três segmentos distintos. Assim, o cDNA de PnTx4(6-1) e PnTx4(5-5) codificam para uma sequência sinal de 16 aminoácidos (peptídeo sinal), uma sequência rica em resíduos de glutamato com 18 aminoácidos (propeptídeo) seguida da região que codifica a toxina madura. Posteriormente, a toxina é clivada logo após um

resíduo de arginina do propeptídeo, originando assim a sequência madura (Figura 2).

```

Tx4 (5-5) MKVAIVFLSLLVLAFASESIEENREEFPVEESARCADINGA
Tx4 (6-1) MKVAIVFLSLLVLAFASESIEENREEFPVEESARCGDINAA

Tx4 (5-5) CKSDC DCCGDSVTCDCYWS D SCKCRESNFKIGMAIRKKF-C
Tx4 (6-1) CKEDC DCCGYTTACDCYWSK SCKCREAAIIVIYTAPKKKLT C

```

Figura 2 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das toxinas PnTx4(5-5) e PnTx4(6-1) antes do processamento.

A região do peptídeo sinal e propeptídeo estão destacadas em cinza escuro. As diferenças de aminoácidos estão destacadas em cinza claro. A porcentagem de identidade de aminoácidos entre as sequencias maduras das toxinas é de 60%.

A toxina PnTx4(6-1) estimula a liberação de L-glutamato em junções neuromusculares de baratas (*Periplaneta americana*) (Figueiredo et al., 1997). De Lima e colaboradores (2002), mostraram que essa toxina também é capaz de prolongar o potencial de ação em axônio isolado de barata, devido a um retardo na inativação da corrente dos canais para sódio de insetos. Além disso, PnTx4(6-1) mostrou ser inativa nos subtipos de canais para sódio de mamíferos testados. Foi sugerido que esta atue no sítio 3 de canais para sódio de inseto, considerando-se que competiu com Bom IV, uma toxina do tipo- α *like* da peçonha do escorpião *Buthus martensii* (De Lima et al., 2002).

Apesar de não apresentar efeitos aparentes para mamíferos, Mafra e colaboradores (1999), observaram que a fração PhTx4 bloqueia a captação de ^3H -glutamato em sinaptosomas cerebrocorticais de rato, de modo dose-dependente ($\text{IC}_{50} = 2,35 \mu\text{g/ml}$). Além disso, foi demonstrado que a toxina PnTx4(5-5) é capaz de inibir, reversivelmente, a corrente conduzida pelo receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) de glutamato, em neurônios hipocámpais de ratos (Figueiredo et al., 2001). Estes resultados mostraram que PnTx4(5-5) não possui ação estrita em insetos.

A toxina PnTx4(5-5) possui 47 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 5174 Da (Figueiredo et al., 2001) e apresenta 10 resíduos de cisteínas em

sua sequencia. Embora ainda não tenha sido determinado experimentalmente, estas estão provavelmente envolvidas na formação de cinco pontes dissulfeto. Estudos realizados por nosso grupo (Oliveira, 2010) demonstraram, pela primeira vez, uma ação antinociceptiva da toxina PnTx4(5-5) em ratos. Foi verificada uma ação periférica dose-dependente quando injetada na pata de ratos tratados com agentes hiperalgésicos (carragenina, PGE₂ e L-glutamato) e depois submetidos ao teste de compressão da pata, usando o aparelho algosímetro. Mais recentemente também foi demonstrado um efeito antinociceptivo central desta toxina, quando injetada diretamente na medula, em modelos de dor aguda, inflamatória e neuropática em camundongos (Figueira, 2013).

1.3 Toxinas animais com efeito antinociceptivo

Os canais iônicos são fundamentais para geração e transmissão dos sinais nociceptivos e vários tipos de canais estão envolvidos no processo de nocicepção. Sinais nocivos estimulam inicialmente canais catiônicos não seletivos (Canais de Receptores Transitórios - TRPs, Canais Iônicos Sensíveis a Ácido - ASICs, canais de potássio dependentes de ATP – KATP) nos neurônios nociceptores, gerando um influxo de íons e levando à despolarização da membrana. Ao atingir o limiar de ativação, os canais de sódio sensíveis à voltagem se abrem, iniciando e propagando o potencial de ação (Cury & Picolo, 2009). A transmissão do sinal aferente da dor ao sistema nervoso central (SNC) é também mediada por canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v) que controlam a liberação de neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos dos neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) no momento da chegada de um potencial de ação. Estes neurotransmissores, como substância P, aspartato e glutamato, atuam em canais iônicos dependentes de ligantes e receptores metabotrópicos, localizados pós-sinápticamente em interneurônios no corno dorsal da medula que transmitem a informação ao SNC. Assim, a nocicepção é traduzida em mudanças no potencial de membrana e excitabilidade celular através da modulação de canais iônicos (Hogg, 2006, Dhaka et al., 2006).

Algumas toxinas peptídicas de aranhas, escorpiões e de moluscos marinhos podem induzir antinocicepção por inibirem, seletivamente, canais para sódio e cálcio ativados por voltagem, canais do tipo ASIC ou receptores ionotrópicos de glutamato (Cury & Picolo, 2009). Por exemplo, a toxina “analgésica”, ω -agarotoxin IVA (ω -Aga-IVA), isolada do veneno da aranha *Agelenopsis aperta*, apresenta seletividade para canais para cálcio do tipo P (Mintz et al., 1992). A Joro toxina (JSTX), da aranha *Nephila clavata* demonstrou atividade antinociceptiva agindo em receptores do tipo não-NMDA (Sorkin et al., 2001). Da aranha *Psalmopoeus cambridgei* (tarântula) foi isolado o peptídeo Psalmotoxin 1 (PcTx1), que bloqueia especificamente canais do tipo ASIC (Escoubas et al., 2002). A toxina GsMTx4 do veneno da aranha *Grammostola spatulata* também apresenta ação antinociceptiva específica contra estímulo mecânico e na dor neuropática, agindo em receptores mecanosensitivos (Park et al., 2008).

Estudos recentes demonstraram que toxinas purificadas da fração PhTx3 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* também apresentam atividade antinociceptiva. A toxina PnTx3-6 (Ph α 1 β) mostrou ação em modelos de dor nociceptiva e neuropática, inclusive em sua forma recombinante (Souza et al., 2008). Essa toxina apresentou efeito “analgésico” mais duradouro no modelo de dor pós-operatória em camundongos, quando comparada à ω -conotoxina MVIIA e à morfina (Souza et al., 2011). Outra toxina, PnTx3-3, também apresentou prolongado efeito antinociceptivo em modelos de dor neuropática (Dalmolin et al., 2011). O efeito dessas toxinas parece estar relacionado ao bloqueio de canais para cálcio. Esses canais localizados na medula espinhal tem um importante papel em modular a liberação de neurotransmissores como glutamato e neuropeptídios (Miljanich et al., 1995). Outro importante exemplo desse mecanismo de ação é o da ω -conotoxina MVIIA, isolada do veneno do molusco marinho *Conus magus*. Essa toxina serviu como modelo para o desenvolvimento do primeiro fármaco derivado de toxina peptídica aprovado para o tratamento da dor, o Ziconotide (Prialt®), que é uma droga analgésica não opióide, derivada de uma versão sintética da ω -conotoxina MVIIA. O seu mecanismo de ação deve-se a um potente e seletivo bloqueio dos canais para cálcio do tipo-N, localizados nos neurônios pré-

sinápticos da medula espinhal (Mcgovern, 2007).

Algumas toxinas isoladas do veneno do escorpião chinês *Buthus martensii* Karsch também apresentam atividade antinociceptiva, como BmK IT2 (Wang et al., 2000), BmK dITAP3 (Guan et al., 2001a), BmK AS, BmK AS-1 (Lan et al., 1999), BmK Ang P1 (Guan et al., 2001b), BmK AGAP (Liu et al., 2003) e BmK Ang M1 (Cao et al., 2004). Dessas, algumas possuem também atividade inseticida, sendo que a maioria age em canais para sódio de insetos e/ou mamíferos. Estudos tem sugerido que a atividade antinociceptiva de toxinas de escorpião estão relacionadas à sua ação em canais para sódio. Foi reportado que a toxina BmKIT2 é capaz de inibir parcialmente a corrente de sódio em neurônios DRG (Tan et al., 2001, Zhang et al., 2003). Da mesma forma, BmK AS reduziu a corrente de sódio de canais TTX-R e TTX-S em neurônios DRG em cerca de 50% (Chen et al., 2006).

1.4 Canais para sódio ativados por voltagem

Os canais para sódio ativados por voltagem são proteínas integrais de membrana responsáveis por iniciar e propagar o potencial de ação em neurônios e em outras células eletricamente excitáveis (Catterall, 2000). Esses canais possuem alta seletividade aos íons sódio, sendo seu mecanismo de abertura dependente do potencial de membrana. Durante a despolarização da membrana, os canais para sódio são ativados a partir do estado fechado (em repouso) para o estado aberto. Poucos milissegundos após a ativação, o canal passa para o estado inativado, um estado não condutor e refratário do canal. Quando ocorre a repolarização da membrana, o canal retorna então ao estado fechado, e portanto, capaz de ser estimulado e aberto novamente. Os canais para sódio são capazes de abrir a partir do estado fechado, mas não do estado inativado.

Esses canais são formados por uma subunidade α de 220-260 kDa, que pode estar associada ou não a uma ou mais subunidades β (β 1-4) de 30 a 40 kDa (Catterall et al., 2000, Cestèle & Catterall, 2000, Caterall, 2007) (Fig. 3). A subunidade α consiste de quatro domínios homólogos (I-IV), cada um contendo

seis segmentos transmembranares (S1-S6). As alças entre os segmentos S5 e S6 (denominadas alças P) de cada domínio se invaginam na membrana, formando as paredes extracelulares do poro condutor, enquanto que, a porção transmembranar dos segmentos S5 e S6 formam a porção intracelular. Na alça P também estão localizados os resíduos de aminoácidos que constituem o filtro responsável pela alta seletividade do canal aos íons sódio, ou filtro de seletividade. Este é formado por resíduos de aminoácidos altamente conservados em todos os quatro domínios, especialmente arranjados dentro do anel DEKA interno (formado pelos resíduos Asp, Glu, Lys e Ala dos domínios DI, DII, DIII e DIV) e do anel EEDD externo (formado pelos resíduos Glu, Glu, Asp e Asp dos domínios DI, DII, DIII e DIV, respectivamente) (Heinemann, Terlau et al., 1992).

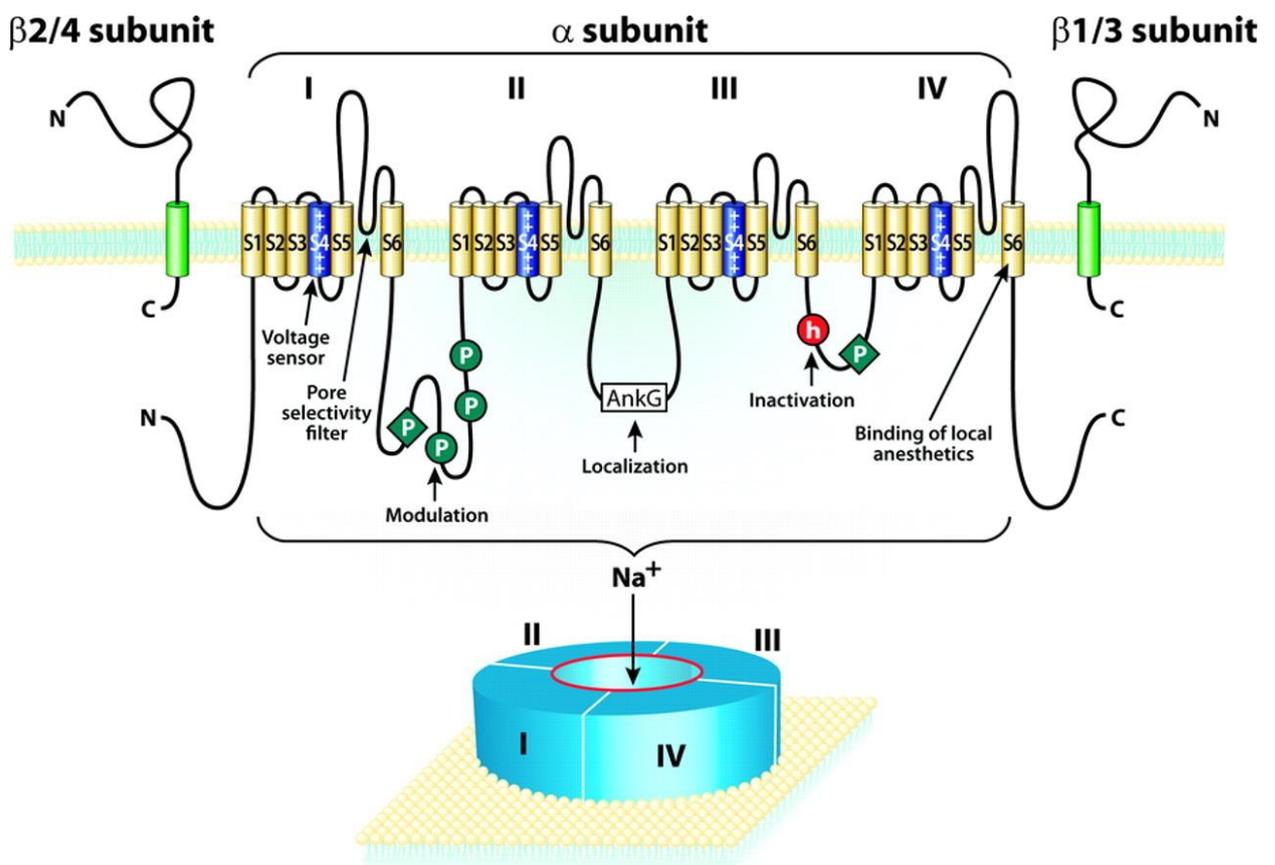


Figura 3 - Representação esquemática do canal para sódio ativado por voltagem mostrando as subunidades α e β .

Fonte: www.neurology.org.

Os segmentos S4 são considerados os sensores de voltagem do canal por possuírem resíduos de aminoácidos positivos altamente conservados (Arg ou Lys), posicionados a cada terceira posição do segmento, estando alinhados na mesma face em um modelo de α -hélice. Foram propostos modelos para explicar o funcionamento do segmento S4 como sensor de voltagem, como os modelos “hélice deslizante” (Catterall, 1986) ou “parafuso helicoidal” (Guy e Seetharamulu, 1986). Estes propõem que os resíduos de aminoácidos dos sensores de voltagem, carregados positivamente, estão estabilizados pelo campo elétrico transmembranar, pela formação de pares iônicos com resíduos negativos dos segmentos transmembranares adjacentes. No estado fechado do canal, o campo elétrico negativo interno exerce uma força sobre os resíduos positivos, estabilizando os segmentos S4 na conformação de repouso. A despolarização da membrana desestabiliza esta conformação, permitindo que os sensores de voltagem se movam no campo elétrico da membrana em direção ao meio extracelular. Este movimento está relacionado a mudança de conformação do canal associada a abertura para passagem dos íons (Catterall, 2000, 2012).

Além da ativação dependente de voltagem e alta seletividade aos íons sódio, outra característica fundamental dos canais para sódio é a inativação rápida e espontânea, consecutiva ao processo de ativação. Enquanto o movimento dos segmentos S4 dos domínios I, II e III está relacionado com a ativação do canal, o movimento do S4 do domínio IV está relacionado à inativação (Chanda & Bezanilla, 2002; Campos et al., 2008). O movimento da alça intracelular entre o segmento S6 do domínio III e o segmento S1 do domínio IV, na qual se encontra o motivo IFM (I: Ile; F: Phe e M: Met), é responsável pela inativação rápida do canal (West et al., 1992). Os resíduos de Gly e Pro, vizinhos do motivo IFM, serviriam como “dobradiças”, permitindo o fechamento da “comporta” de inativação, ocluindo o poro interno do canal. Essa oclusão se dá pela interação do motivo IFM com múltiplos resíduos hidrofóbicos localizados na alça intracelular entre os segmentos S4 e S5 dos domínios III e IV, e região C-terminal de S6 do domínio IV (Catterall, 2000). Além disso, trabalhos recentes indicam o papel importante da região C-terminal

do canal para sódio no processo de inativação rápida, provavelmente através de uma interação dependente de cargas com a comporta de inativação (Nguyen & Goldin, 2010). O processo de inativação rápida é dependente de voltagem devido ao acoplamento com o processo de ativação (Catterall, 2000). Acredita-se que o movimento para o lado extracelular do segmento S4DIV durante a ativação, é o evento que inicia a inativação rápida, levando ao fechamento da alça de inativação (Kuhn et al., 1999).

Em mamíferos, as subunidades α dos canais para sódio são codificadas por nove genes que são expressos em diferentes tecidos excitáveis: Na_v1.1, 1.2, 1.3 e 1.6 são os subtipos primários do sistema nervoso central, enquanto Na_v1.7, 1.8 e 1.9 são expressos primariamente no sistema nervoso periférico. Na_v1.4 está presente no músculo esquelético e Na_v1.5 no coração (Catterall et al., 2005, Catterall, 2012). Alguns subtipos também podem ser eventualmente expressos fora de seus tecidos primários (Goldin, 2001).

As subunidades β (1-4) acessórias possuem um único segmento transmembranar e um curto segmento C-terminal intracelular (Catterall et al., 2007). Elas estão envolvidas na localização celular, na interação com moléculas de adesão, à matriz extracelular e ao citoesqueleto. A co-expressão da subunidade alfa com a subunidade beta pode influenciar na cinética e na dependência de voltagem da ativação, além de aumentar a densidade de canais para sódio na membrana celular (Yu & Catterall, 2003, Catterall et al., 2005).

A estrutura primária dos canais para sódio de insetos é similar ao de mamíferos. Vários tipos já foram clonados e expressos funcionalmente em ovócitos de *Xenopus*; por exemplo, *Para*, da mosca *Drosophila melanogaster*, *Vssc1* da mosca doméstica e também os canais de barata *Para CSMA* e *BgNav1-1* (Bosman & Tytgat, 2007)

Como os canais para sódio desempenham um papel crucial em diversos processos fisiológicos de vertebrados e de invertebrados, eles são alvo de um amplo espectro de drogas terapêuticas, inseticidas e de toxinas de origem animal e vegetal. Esses ligantes podem exercer suas ações nesses canais através de dois mecanismos diferentes: eles podem inibir a passagem do sódio pelo canal através da oclusão física do poro condutor de íons (denominados

bloqueadores de canais), ou podem alterar seus parâmetros biofísicos, como a dependência de voltagem de ativação e/ou inativação, pela interação alostérica com alguma região do canal, sendo chamados de modificadores de *gating* (processo pelo qual o canal se abre ou fecha).

1.5 Sítios de ligação de toxinas em canais para sódio

Várias toxinas de escorpiões, de moluscos marinhos (*Conus*) e de aranhas possuem alta afinidade e propriedades farmacológicas específicas sobre canais para sódio, sendo consideradas ferramentas valiosas para discriminar diferentes isoformas e para estudar a relação de estrutura-função desses canais (Catterall et al., 2007, Cestèle et al., 2006; Escoubas et al., 2000, para revisão ver Klint et al., 2012). Assim, grande parte do conhecimento que se tem sobre a estrutura e a função dos canais para sódio foi elucidado utilizando-se toxinas animais.

Existem seis sítios clássicos conhecidos de ligação de toxinas na estrutura do canal para sódio (Figura 4). A ligação de toxinas em cada sítio altera de forma distinta a função do canal, sendo que algumas podem bloquear fisicamente o poro, enquanto outras interferem no mecanismo de “*gating*”, podendo modificar os parâmetros da ativação ou inativação do canal (Catterall et al., 2007, Cestèle & Catterall, 2000).

O sítio 1 é composto pelos resíduos das alças P reentrantes, conectando os segmentos S5 e S6 de todos os quatro domínios. As toxinas guanidínicas tetrodotoxina (TTX) e saxitoxina (STX) foram as primeiras neurotoxinas descobertas a se ligar a esse sítio. A ligação de qualquer uma destas toxinas causa o bloqueio do poro e diminuição da corrente de sódio. TTX e STX são produzidas por algumas espécies de bactérias e de dinoflagelados, respectivamente (Narahashi, 2008, Chau et al., 2011). As μ -conotoxinas encontradas em alguns moluscos do gênero *Conus* também compartilham uma região de ligação ao sítio 1 do canal para sódio com essas toxinas (Stephan et al., 1994). Atualmente a TTX ainda é utilizada para classificar os canais de acordo com sua sensibilidade: $\text{Na}_v1.1$, 1.2, 1.3, 1.4, 1.6 e 1.7 formam o grupo

de canais sensíveis a TTX (TTX-S), ou seja, o bloqueio máximo é atingido com concentrações nanomolares de toxina ($IC_{50} = 1-12 \text{ nM}$). O canal cardíaco $Nav_{1.5}$ é insensível à TTX, sendo bloqueado em concentrações milimolares ($IC_{50} = 1-2 \text{ mM}$). Já os canais $Nav_{1.8}$ e $Nav_{1.9}$ formam o grupo dos canais resistentes a TTX (TTX-R), sendo bloqueados com concentrações 10^7 vezes maiores que os canais sensíveis ($IC_{50} = 40-60 \text{ mM}$) (Catterall et al., 2005). A toxina PnTx1 da aranha *Phoneutria nigriventer* é capaz de bloquear diferentes isoformas de canais para sódio de mamíferos sem alterar seus parâmetros de ativação e de inativação. Assim, foi sugerido que ela se ligue ao sítio 1, já que também competiu com a μ -conotoxina, um conhecido ligante deste sítio (Martin-Moutot et al., 2006, Silva et al., 2012).

O sítio 2 está localizado nos segmentos S6 em todas as quatro repetições homólogas. A esse sítio ligam-se uma grande variedade de toxinas lipofílicas com diferentes estruturas químicas, encontradas em plantas, animais e bactérias. Estas toxinas, ao se ligarem a este sítio, deslocam a dependência de voltagem para potenciais hiperpolarizados, além de inibirem a inativação rápida do canal, causando assim uma ativação persistente (Stevens et al., 2011).

As neurotoxinas que se ligam ao sítio 3 incluem, principalmente, toxinas de escorpiões do tipo α , de anêmonas do mar e de aranhas. Essas toxinas ligam-se na alça entre os segmentos S3 e S4 do domínio IV. O segmento S4 está envolvido no processo de acoplamento da ativação à inativação. A ligação dessas toxinas impede o movimento desse segmento e dificulta as mudanças conformacionais necessárias para a inativação rápida, causando um retardo, ou um bloqueio na mesma (Rogers et al., 1996; Wang et al. 2011c).

O sítio 4 foi inicialmente identificado através de toxinas de escorpião do tipo β (Vijverberg & Lazdunski, 1984), sendo também alvo de ligação de várias toxinas de peçonha de aranha. Esse sítio foi inicialmente localizado em resíduos específicos nas alças extracelulares, ligando os segmentos S1-S2 e S3-S4 de DII (Catterall et al., 2007), mas alguns trabalhos têm demonstrado evidências também do envolvimento do sensor de voltagem do domínio III (Leipold et al., 2006, Song et al., 2011). A ligação a esse sítio mantém o sensor de voltagem na posição ativada, ou seja, voltado para o lado externo do canal,

causando um deslocamento da voltagem de ativação para potenciais mais hiperpolarizados (Cestèle et al., 2006). No entanto, mais recentemente, foram descritas algumas toxinas que se ligam ao sítio 4, mas que causam o efeito oposto, mantendo o sensor de voltagem na posição fechada, ou seja, voltada para o lado interno do canal (Middleton et al., 2002, Bosmans et al., 2006, Priest et al., 2007). Esse mecanismo de ação faz com que essas toxinas desloquem a ativação para potenciais mais despolarizados (Sokolov et al., 2008; Xiao et al., 2008, Rong et al., 2011).

As toxinas lipossolúveis brevetoxina e ciguatoxina, produzidas pelos dinoflagelados *Karenia brevis* e *Gambierdicus toxicus*, respectivamente, são conhecidas por se ligarem ao sítio 5, localizado ao longo dos segmentos transmembranares S6DI e S5DIV. Essas toxinas causam uma inibição da inativação rápida do canal e um deslocamento a dependência de voltagem da ativação para potenciais mais hiperpolarizados (Cestèle et al., 2000).

As δ -conotoxinas, isoladas de moluscos marinhos do gênero *Conus*, retardam o processo de inativação rápida pela ligação ao sítio 6. Essas toxinas interagem com a tríade de resíduos hidrofóbicos conservados (YFV) do segmento S4 (DVI) e acredita-se que elas mantem o sensor de voltagem no estado ativado, similarmente às toxinas do sítio 3 (Stevens, 2011).

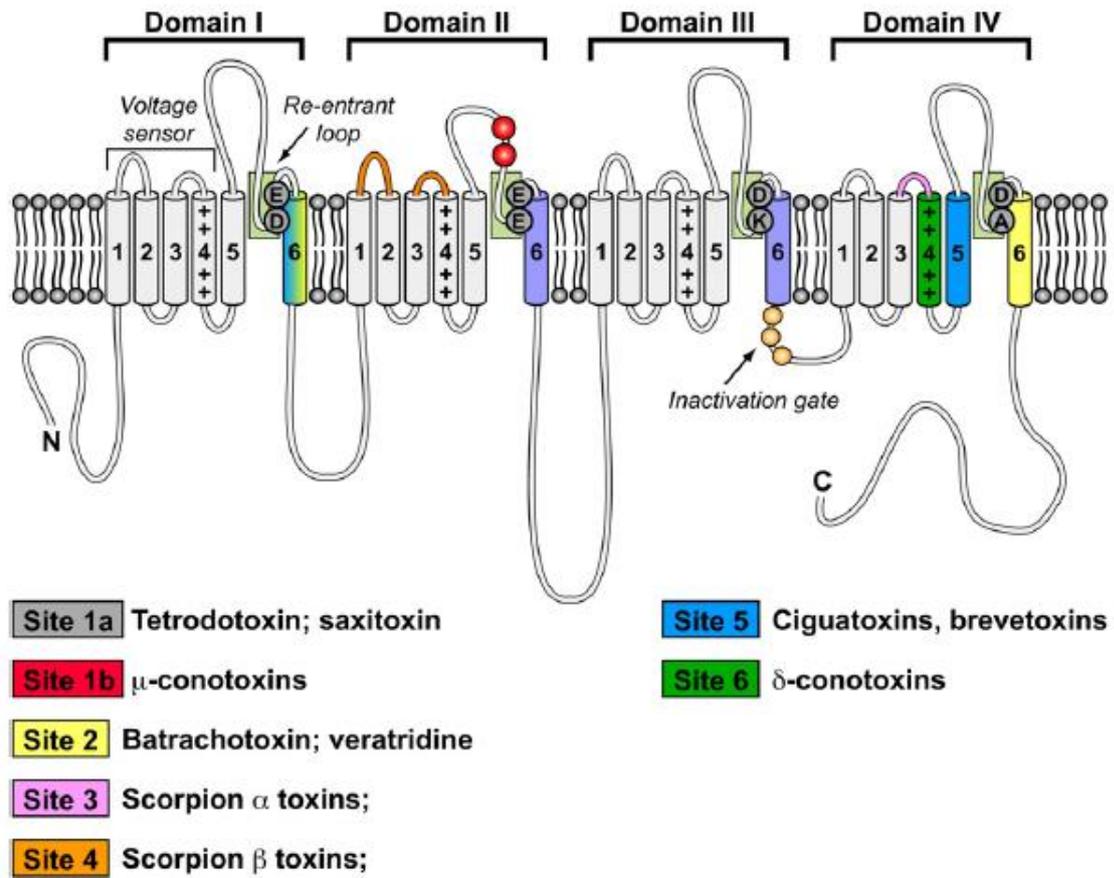


Figura 4 - Sítios de ligação de toxinas em canais para sódio.

Modificado de Klint et al, 2012.

2 Justificativa

Os canais para sódio dependentes da voltagem atuam diretamente na excitabilidade celular, estando assim, envolvidos em diversas funções fisiológicas fundamentais. Estes canais são, frequentemente, alvo de uma variedade de toxinas de animais peçonhentos, incluindo diversas espécies de aranhas. A capacidade de tais toxinas de discriminarem entre isoformas moleculares estreitamente relacionadas, as tornam ferramentas “chave” no estudo dos canais para sódio. Elucidar seus modos de ação, bem como identificar seus alvos de ligação moleculares, são os primeiros desafios a serem elucidados, antes de se considerar toxinas como compostos potenciais para a descoberta de novos medicamentos.

Alguns trabalhos vêm demonstrando que algumas toxinas de artrópodes possuem atividade antinociceptiva por agirem em diferentes tipos de canais (para revisão ver Cury & Picolo, 2009). A toxina PnTx4(5-5) da aranha *Phoneutria nigriventer* apresenta ação inseticida e atividade antinociceptiva em mamíferos, no entanto a mesma nunca havia sido testada em nenhum canal iônico dependente de voltagem. Como PnTx4(5-5) apresenta alta similaridade com a toxina PnTx4(6-1) que possui ação em canal para sódio de insetos, propusemos investigar se a mesma também possui ação em canais para sódio de insetos e de mamíferos. Assim, uma possível ação nestes últimos, poderia estar relacionada ao efeito antinociceptivo já observado (Oliveira, 2010, Figueira, 2013). Os canais para sódio localizados em neurônios nociceptores constituem o alvo de ação de alguns analgésicos bloqueadores de canais, como a lidocaína, e são alvos para o desenvolvimento de novos fármacos com maior seletividade e menores efeitos colaterais.

Uma grande limitação para os estudos com toxinas de venenos de artrópodes é a dificuldade de se obter quantidades suficientes de material. Estratégias de clonagem e expressão heteróloga de toxinas animais têm sido utilizadas para contornar essa dificuldade. Além disso, a partir da toxina recombinante é possível realizar mutações sítio dirigidas em resíduos

específicos de aminoácidos, que permitam avaliar as regiões ou resíduos-chave para a interação da toxina com o receptor.

Assim, a clonagem e expressão da toxina recombinante PnTx4(5-5) permitiria a obtenção de maiores quantidades desta molécula para testá-la em diferentes isoformas de canais para sódio, buscando-se averiguar os possíveis mecanismos de ação ao interagir com esses canais. Também seria possível a realização de mutações sítio dirigidas, modificando-se sua sequência primária, para estudos de relação entre estrutura e função.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Expressar a toxina PnTx4(5-5) em sistema heterólogo e investigar seus possíveis efeitos sobre os canais para sódio de inseto e de mamífero, buscando-se avaliar se existe correlação entre o efeito da toxina nesses canais e a atividade antinociceptiva. Produzir mutantes de PnTx4(5-5) recombinante com intuito de identificar os resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação da toxina nos canais para sódio.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a clonagem do cDNA da toxina PnTx4(5-5) no vetor pET32c e induzir sua expressão em células de *E.coli*;
- Purificar e caracterizar a toxina PnTx4(5-5) recombinante;
- Comparar estruturalmente as toxinas nativa e recombinante através de dicroísmo circular;
- Testar se a toxina recombinante apresenta toxicidade para insetos e ação antinociceptiva em ratos, assim como a nativa;
- Realizar ensaios eletrofisiológicos em diferentes subtipos de canais para sódio com a toxina recombinante;
- Realizar mutações sítio dirigidas na toxina rPnTx4(5-5) e comparar a ação dos mutantes com a toxina original em canais para sódio.

4 Material e métodos

4.1 Glândulas veneníferas

As glândulas utilizadas para a extração do RNA foram doadas pelo aracnidário científico da Fundação Ezequiel Dias. O veneno foi extraído dois dias antes da retirada das glândulas para estimular a expressão de mRNA das toxinas. Após a retirada, as glândulas foram armazenadas a - 70°C.

4.2 Linhagens de *E.coli*

DH5 α : *deoR endA1 gyrA96 hsdR17 Δ (lac)U169 recA1 relA1 supE44 thi-1 (ϕ 80 lacZ Δ M15)*

BL21 Rosetta-gami (DE3)pLysS: *F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (Cam^R, Kan^R, Tet^R)*

DH5 α -T1^R: *F- ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44thi-1 gyrA96 relA1 tonA*

4.3 Toxina PnTx4(5-5)

A toxina nativa PnTx4(5-5), utilizada nos testes comparativos com a recombinante, foi purificada na Fundação Ezequiel Dias e cedida pela Dra. Marta Nascimento Cordeiro.

4.4 Animais

As moscas (*Musca domestica*) utilizadas no teste de toxicidade foram eclodidas no insetário do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, LVTA (UFMG), a partir de larvas cedidas pela fazenda Vale Verde (Betim, Minas Gerais). As larvas foram mantidas no insetário até a eclosão das pupas e os testes de toxicidade foram realizados nas moscas três dias após a eclosão.

Para os testes de atividade antinociceptiva foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*) Wistar machos com peso entre 180 e 200 g, provenientes do

Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO). Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo 287/ 2013).

4.5 Clonagem da toxina recombinante PnTx4(5-5)

4.5.1 Extração de RNA total

Cerca de 500 mg de glândulas de veneno extraídas de exemplares da aranha *Phoneutria nigriventer* foram maceradas na presença de nitrogênio líquido. Após a maceração, acrescentaram-se 10 ml de Trizol (Invitrogen) e incubou-se a preparação por 5 min, a 30 °C. Em seguida foram adicionados 2 ml de clorofórmio, o material foi incubado por 3 min e centrifugado a 13000 rpm (Eppendorf 5804R) a 4 °C por 15 min. A fase aquosa superior foi removida e à mesma adicionou-se 5 ml de isopropanol. Esse material foi incubado por 10 min a 30 °C e centrifugado a 13000 rpm a 4°C por mais 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com etanol 75% e em seguida recentrifugado a 13000 rpm por 15 min e o excesso de sobrenadante, descartado. O precipitado após seco foi ressuspendido em 300 µl de água/DEPC e armazenado a -70 °C. Após a extração o material foi quantificado por leitura em espectrofotômetro a 260 nm. Para avaliar a qualidade do material extraído, retirou-se uma alíquota de 5 µl, acrescentou-se 5 µl tampão de amostra (10% sacarose, 90% formamida deionizada, 0,05% azul de bromofenol) e incubou-se a 65 °C por 3 min. Em seguida a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (89 mM Tris acetato, 2 mM EDTA, 89 mM ácido bórico) a 50 mA por cerca de 30 min e o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5µg/ml).

4.5.2 Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA a partir do RNA total foi realizada utilizando-se o kit *Super Script™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR* (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante.

Para 5 µl do RNA total (5 µg/µl) obtido na etapa anterior, adicionou-se 1 µl de dNTP(10mM), 1 µl de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ e água DEPC q.s.p 10 µl. Incubou-se a preparação a 65 °C por 5 min e, em seguida, no gelo por 1 min.

Paralelamente, preparou-se uma mistura contendo 2 µl de tampão para a enzima transcriptase reversa 10x concentrada, 4 µl de 25 mM MgCl₂, 2 µl de DTT 0,1 M e 1 µl de inibidor de RNase. Essa mistura foi adicionada à mistura da reação anterior com RNA/Oligo(dT), e esta preparação foi incubada a 42°C, por 2 min. Em seguida acrescentou-se 1 µl (50u) de transcriptase reversa Super Script II e incubou-se a mistura a 42°C, por 50 min. A reação foi interrompida elevando-se a temperatura a 70 °C por 15 min e, em seguida, resfriada em gelo. Adicionou-se 1 µl de RNase H, incubou-se a 37 °C por 20 min e o cDNA foi então armazenado a -20 °C.

4.5.3 Amplificação do cDNA codificante da toxina PnTx4(5-5)

Para amplificação por PCR do cDNA da toxina PnTx4(5-5) foram desenhados iniciadores específicos utilizando-se a sequência do cDNA obtido de uma biblioteca de cDNA da glândula da aranha *P. nigriventer*, previamente construída em nosso laboratório. O vetor pET32c utilizado para clonagem do cDNA, expressa proteínas recombinantes em fusão com a proteína tioredoxina (Trx) e codifica um sítio de reconhecimento para posterior clivagem da proteína em fusão pela enzima enteroquinase. Devido a dificuldades anteriores na clivagem da proteína em fusão recombinante pela enzima enteroquinase, acrescentou-se a porção 5' do iniciador *forward* um sítio específico de clivagem para a enzima TEV (Tobacco Etch Virus) protease para substituir o sítio de clivagem da enteroquinase no vetor pET32c. Os iniciadores *forward* e *reverse* continuam também o sítio de clivagem para as enzimas KpnI e XhoI

respectivamente. Na figura 5 estão as sequências dos iniciadores *forward* e *reverse*:

PnTx4(5-5) Fw: 5' GGTACCGAAAATCTGTATTTCCAGGGATGCGCCGATATTAACGGT 3'
 PnTx4(5-5) Rv: 5' CTCGAGTTAACAGAATTTCTTTCTGAT 3'

Figura 5- Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação do cDNA PnTx4(5-5).

As regiões correspondentes aos sítios de restrição das enzimas KpnI (iniciador *forward*) e XhoI (iniciador *reverse*) estão sublinhadas e a sequência correspondente ao sítio da TEV protease está destacado em negrito no iniciador *forward*.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 10 pmoles de cada iniciador, 0,1 mM de dNTPs, tampão da Taq polimerase 1x (10 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0,1% Triton-X), 1u de Taq DNA polimerase (Phoneutria) e 2 µl do cDNA obtido na etapa anterior. A reação foi realizada no termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystems) programado para uma desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C e um ciclo final de 4 min a 72 °C (extensão). Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%.

4.5.4 Clonagem no vetor pGEM- T

Para facilitar posteriormente a clonagem no vetor de expressão pET32c (Novagen), o cDNA amplificado da toxina PnTx4(5-5) foi previamente clonado no vetor pGEM-T (Promega) (Figura 6). A reação foi realizada segundo as recomendações do fabricante utilizando-se 3 µl da reação da PCR anterior para ligação ao vetor. Esse vetor foi escolhido por não conter nenhum sítio para as enzimas de restrição utilizadas para clonagem no vetor pET32c.

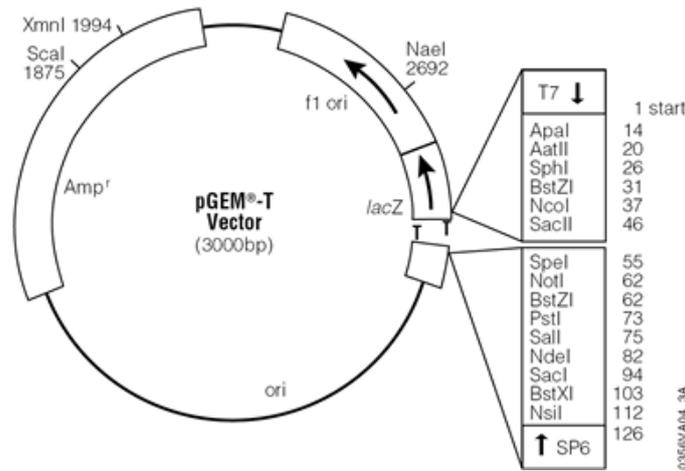


Figura 6 - Mapa do vetor pGEM -T (Promega).

4.5.5 Transformação em células *E. coli* DH5 α

Após a clonagem no vetor pGEM-T realizou-se a transformação em células *Escherichia coli* da linhagem DH5 α , preparadas para transformação química. Uma alíquota de 50 μ l de células estocadas a -70 °C foi descongelada, inoculada em 5 ml de meio LB (10 g de bacto-triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, água q.s.p 1L, pH 7,5) e esta preparação foi incubada a 37°C *overnight*, sob agitação. No dia seguinte, 200 μ l dessa cultura foram inoculados em 20 ml de meio 2xTY (16 g de bacto-triptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, água q.s.p 1L, pH 7,5) seguindo-se incubação a 37 °C, por aproximadamente 2 h sob agitação, até atingir densidade ótica (OD) de 0,4, em 600 nm. Em seguida as células foram centrifugadas (Beckman CS-6R) a 3000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado ressuscitado em 10 mL de CaCl₂ 50 mM estéril, sendo mantidos a 4 °C, por 20 minutos. Centrifugou-se novamente a suspensão, o sobrenadante foi eliminado e o precipitado contendo as células foi ressuscitado novamente em 1 mL da mesma solução. A uma alíquota de 150 μ L dessas células competentes foram adicionados 5 μ L da mistura de reação de ligação do cDNA PnTx4(5-5) ao vetor pGEM-T e realizou-se a transformação por choque térmico, incubando-se a preparação no gelo por 30 minutos e, em seguida, a 42 °C por 90 seg. Às células transformadas adicionaram-se 500 μ L de meio LB, e estas ficaram sob

agitação a 37 °C por 1 h. O cultivo foi plaqueado em meio LB ágar (10 g de bacto-triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, 15 g ágar, água q.s.p 1L, pH 7,5) contendo ampicilina (100 µg/ml) e X-gal. (40 µg/ml). As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 16 horas.

4.5.6 PCR de colônia

Para confirmar a presença do inserto do cDNA da toxina PnTx4(5-5) nos clones, coletaram-se algumas colônias brancas das placas e essas foram inoculadas cada uma em 250 µL de meio LB com ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37 °C com agitação, por 2 h. Em seguida realizou-se a PCR com os iniciadores PnTx4(5-5) *forward* e *reverse* da mesma forma que na reação do item 4.1.3, utilizando-se 2 µl da cultura. Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 2%.

4.5.7 Extração do DNA plasmidial

Após a confirmação da presença do inserto, alguns clones foram inoculados em 10 ml de meio LB/ampicilina e realizou-se a extração do DNA plasmidial (miniprep) pelo método de lise alcalina segundo SAMBROOK et al., 2001.

4.5.8 Digestão dos clones com inserto

Após a miniprep, realizou-se a digestão do DNA plasmidial utilizando-se as enzimas KpnI e XhoI (Pharmacia). Para a reação utilizou-se 100 µg do DNA plasmidial, 10 u de enzima Kpn I, 10 u de enzima Xho I e tampão OPA (*One for All*) 1X (10 mM Tris-acetato pH 7.5, 10 mM acetato de magnésio e 50 mM acetato de potássio) em H₂O q.s.p. 50 µl. A mistura foi incubada a 37 °C por 16 h e depois inativada a 65 °C, por 15 minutos. Em seguida realizou-se eletroforese da amostra em gel de agarose com concentração de 0,8% na

primeira metade e 2% na segunda metade. O fragmento correspondente ao cDNA da toxina PnTx4(5-5), liberado após a digestão do vetor pGEM, foi extraído do gel utilizando-se o kit *Pure Link* (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante. O DNA extraído do gel foi quantificado em espectrofotômetro por leitura a 260 nm e armazenado a -20 °C.

4.5.9 Clonagem no vetor pET32c

Realizou-se a digestão de 100 µg do vetor pET32c (Figura 7) com as enzimas KpnI e XhoI da mesma forma que a reação da etapa anterior. A reação foi inativada e em seguida acrescentou-se 5 U de fosfatase alcalina de camarão (USB) para evitar que extremidades do vetor parcialmente digeridas pudessem ser religadas novamente. Essa mistura foi incubada a 37 °C por 1 h e em seguida, inativada a 65 °C, por 15 min. O cDNA da toxina PnTx4(5-5), previamente digerido com as enzimas KpnI e XhoI (100 ng), foi ligado ao vetor pET32c digerido (100 ng) utilizando-se 1U de enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) na presença do tampão de reação 1x (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP, 0,5 mM de DTT, 5% polietilenoglicol-8000). Em seguida a mistura foi incubada a 4 °C, por 16 h e foram utilizados 5 µl da mesma para transformação de células *E. coli* DH5α como no item 4.1.5. Foram coletados alguns clones e realizou-se a PCR da mesma forma que no item 4.1.3 para confirmação da presença do inserto. Os clones em que foi confirmada a presença do inserto foram submetidos a extração do DNA plasmidial segundo SAMBROOK et al., 2001.

A figura 8 representa um esquema da construção do vetor recombinante de expressão, mostrando a substituição da região codificante do sítio de reconhecimento da enzima enteroquinase (EK), pela região codificante do sítio de reconhecimento da enzima TEV protease, logo antes da região codificante para a toxina PnTx4(5-5).

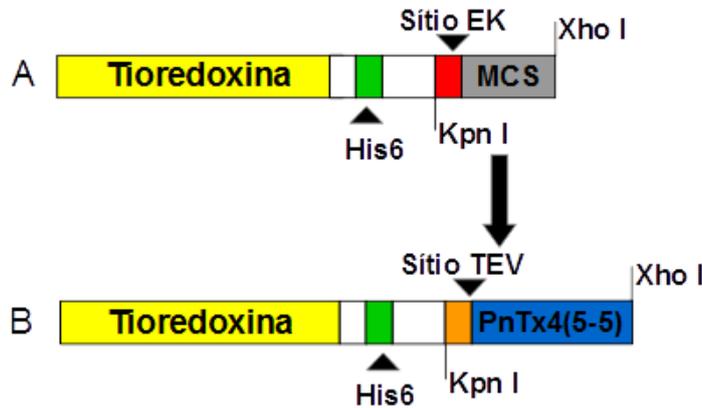


Figura 8 - Construção do vetor recombinante de expressão pET32-PnTx4(5-5).

A) Vetor pET32c original e B) após a clonagem do cDNA PnTx4(5-5) com a substituição da região codificante do sítio de reconhecimento para a enzima EK, pela enzima TEV protease. MCS: Sítio múltiplo de clonagem (*Multiple Cloning Site*).

4.5.10 Sequenciamento

Para confirmar se o cDNA da toxina foi clonado de forma correta no vetor pET32c foi realizado sequenciamento de alguns clones recombinantes. A reação foi realizada com o kit de sequenciamento *Big Dye Terminator v3.1 Cycle* (Applied Biosystems) na seguinte mistura de reação: 1 µl de Big Dye Terminator Ready reaction mix, 1,5 µl de tampão de diluição 5X, 1 µl de iniciador Stag (1.6 pmol/ µl), DNA molde (300ng), água mili-Q q.s.p 10 µl. Para a PCR de sequenciamento utilizou-se o programa: 96° C por 1 min, 40 ciclos (94 °C por 15 seg , 55 °C por 15 seg, 60 °C por 4 min), 4 °C infinito. Após a

PCR, a mistura foi precipitada segundo as recomendações do fabricante para retirada de reagentes em excesso. As amostras foram ressuspensas em 10 µl de formamida deionizada (Applied Biosystems) e em seguida analisadas no sequenciador automático capilar *ABI 3130 Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

4.5.11 Transformação em células Rosetta-gami (DE3) pLysS

Os clones que apresentaram a sequência correta foram transformados em células *E. coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS (Novagen), da mesma forma que no item 4.1.5.

4.6 Expressão, purificação e caracterização de rPnTx4(5-5)

4.6.1 Expressão

Coletou-se uma colônia da placa com os clones transformantes de *E. coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS e inoculou-se em 10 ml de meio LB com ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml). O pré-inóculo foi incubado a 37 °C, por 16 h e, em seguida, adicionado em 490 ml de meio LB com ampicilina e cloranfenicol (100 µg/mL; 34 µg/mL). A cultura foi então incubada a 37 °C com agitação, até atingir densidade óptica entre 0,6-1,0, a 600 nm. Adicionou-se então, isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) na concentração final de 1 mM, incubando-se por diferentes períodos (1 h, 2 h, 3 h e 16 h) para a determinação da cinética de expressão. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada a 5000 rpm (Beckman J2-MC Rotor JA-14) por 10 minutos, à temperatura ambiente, para a coleta das células. Em seguida o precipitado foi submetido a três etapas de congelamento a -20 °C, por 10 minutos, seguido de descongelamento a 37 °C, por 10 minutos e ressuspensado em 20 ml de solução tampão de ligação para cromatografia de afinidade (50 mM imidazol, 0,5 M NaCl e 20 mM fosfato de sódio, pH 7,4). Para

completar o rompimento celular o material foi sonificado por três ciclos de 1 minuto com intervalo de 1 min entre os ciclos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10000 rpm (Beckman J2-MC Rotor JA-20) por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análises em eletroforese em gel de poliacrilamida e nos procedimentos de purificação.

4.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

A verificação da expressão da toxina recombinante e o acompanhamento dos passos cromatográficos foram realizados por eletroforese em gel de poliacrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 29:1) com SDS. Os géis foram preparados em placas de vidro com dimensões de 10 x 8 x 0,2 cm e espaçadores de 0,75 mm. Utilizou-se um gel de empilhamento 5%, contendo Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS 0,1% e um gel de separação 12,5% contendo Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS 0,1%. Acrescentou-se às amostras tampão desnaturante (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; β -mercaptoetanol 10%, glicerol 10%, SDS 0,2% e azul de bromofenol 0,001%) e incubou-se durante 5 min, a 95 °C. A eletroforese foi realizada com solução tampão Tris-glicina (25 mM Tris; 192 mM glicina; SDS 10%, pH 8,3) com uma corrente constante de 100 mA por cerca de 2 h. Os géis foram corados por 30 minutos em solução de Coomassie Blue R-250 0,2% em água: metanol: ácido acético (4:5:1) e descorados por 1h em solução de água: etanol: ácido acético (6:3:1).

4.6.3 Cromatografia de afinidade

Após a expressão, o sobrenadante do extrato celular foi aplicado em coluna de afinidade HisTrap HP 1 ml (GE Healthcare) carregada com íons Ni^{2+} imobilizados e equilibrada com o tampão de ligação (50 mM imidazol, 0,5 M NaCl e 20 mM fosfato de sódio, pH 7,4). A cromatografia foi realizada em sistema HPLC (*ÄKTA Purifier 10*- GE) em um gradiente linear (0-100%) de tampão de eluição (0,5 M de imidazol, 0,5 M NaCl e 0,02 M fosfato de sódio, pH=7,4), numa extensão de 20 ml, fluxo de 1ml/min e frações de 0,5 ml foram

coletadas. O perfil cromatográfico foi acompanhado por leituras de absorvância a 280 nm e amostras das frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE.

4.6.4 Cromatografia de gel filtração

As frações contendo a proteína em fusão Trx-PnTx4(5-5) recombinante, obtida na cromatografia de afinidade, foram reunidas e concentradas em centrífuga a vácuo (*Concentrator plus* - Eppendorf). Em seguida foram submetidas à cromatografia de gel filtração em sistema HPLC, utilizando-se duas colunas HiTrap HP Desalting 5ml (GE Healthcare) acopladas em série. As colunas foram previamente equilibradas com tampão da enzima TEV protease 2x (100mM Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 1mM) e as proteínas eluídas com o mesmo tampão, em um fluxo de 1,5 mL/min, frações de 1 ml foram coletadas. O perfil de absorvância foi acompanhado por leituras a 280 nm.

4.6.5 Clivagem de Trx-rPnTx4(5-5)

Para a reação de clivagem da proteína em fusão Trx-rPnTx4(5-5), foram utilizadas as frações provenientes da etapa anterior. Para cada 100 µg da proteína recombinante foi utilizado 10 µg da enzima TEV protease produzida previamente no laboratório. Na mistura de reação foram adicionadas glutatona oxidada e reduzida e água mili-Q, sendo a composição final do tampão de reação: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 0,5 mM, 3 mM glutatona reduzida e 0,3 mM glutatona oxidada. A reação foi incubada à temperatura ambiente, por 16 h. A análise da clivagem foi realizada por espectrometria de massas.

4.6.6 Espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF

A espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF MS) foi realizada no aparelho Ultraflex II (Bruker Daltonics), controlado pelo programa FlexControl 2.4.30.0. As amostras acrescidas da solução matriz (ácido α -ciano-4-

hidroxicinâmico) (1:1 v/v) foram aplicadas na placa MTP AnchorChip 600/384. Os espectros de massa foram obtidos em modo positivo/refletido, com a frequência do laser ajustada em 50 Hz. Os dados foram analisados através do programa Flex Analysis 2.4.

4.6.7 Cromatografia de fase reversa

Após a confirmação da clivagem da proteína em fusão Trx-PnTx4(5-5) pela a enzima TEV protease por espectrometria de massas, a amostra foi submetida à cromatografia em fase reversa em sistema de HPLC utilizando-se a coluna Sephasil peptide C18 5 μ ST4.6/250 (Amersham). A coluna foi previamente equilibrada com o eluente A (0,1% de TFA em água Milli-Q), a 22 °C. As proteínas foram eluídas usando-se um gradiente contínuo do eluente B (0,1% TFA em ACN) segundo o programa: 0% de B de 0 a 12 min; 0- 20% de B de 12 a 15 min; 25-60% de B de 15 a 100 min; 60-100% de B de 100 a 102 min; 100% de B de 102 a 125 min) com fluxo de 1 ml/min. Frações de 1 ml foram coletadas e as proteínas foram detectadas por absorbância a 280 nm e 214 nm. As frações da cromatografia foram concentradas no aparelho *Concentrator plus* (Eppendorf) e submetidas à espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF), como descrito no item anterior.

4.6.8 Dosagem de proteínas

Após cada etapa de cromatografia o rendimento da purificação foi determinado pela razão entre a leitura a 280 nm e o coeficiente de extinção molar, que foi calculado pela ferramenta *Protparam* do website *Expasy Proteomics Server* (web.expasy.org/protparam). O coeficiente utilizado foi 1.031 e 1.453 para a proteína em fusão Trx-rPnTx4(5-5) e rPnTx4(5-5), respectivamente.

4.6.9 Dicroísmo circular

Para avaliar se a toxina recombinante apresenta estrutura secundária semelhante à nativa, foram comparados os espectros de dicroísmo circular (CD). Os espectros foram obtidos no espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco), à temperatura ambiente, entre 260 e 190 nm, utilizando-se cubeta de 1 mm. A toxina nativa e recombinante foram dissolvidas em água na concentração de 0,15 mg/ml. Os dados foram coletados a 1 nm, taxa de *scan* 100 nm/min e constante de tempo de 1s. A medida do espectro foi determinada pela média de três *scans*.

4.7 Mutações sítio dirigidas

Foram realizadas mutações sítio dirigidas na sequência da toxina recombinante rPnTx4(5-5), substituindo-se alguns aminoácidos (Tyr24, Trp25, Lys30, Arg32 e Phe36), que poderiam estar envolvidos na interação com o canal para sódio, por alanina (Figura 8). Esses aminoácidos foram escolhidos a partir de análise por bioinformática para predição de sítios mais expostos (<http://www.iedb.org/>) e análise da literatura (Martin-moutot et al., 2006, Matavel et al., 2009). Além disso, todos aminoácidos substituídos, exceto Phe36, também estão presentes nas mesmas posições em PnTx4(6-1) (Figura 2).

GCADINGACKSDC DCCGDSVT CDCY**W**SD**SCK**CRESNFKIGMAIRKKFC

Figura 9 - Sequência da toxina rPnTx4(5-5) com os aminoácidos onde foi realizada a substituição por alanina destacados em negrito.

A substituição dos resíduos de aminoácidos da figura 8 por resíduos de alanina foram feitas utilizando o Kit “*GeneTailor Site-Directed Mutagenesis*” (Invitrogen), de acordo com as etapas a seguir:

4.7.1 Metilação

Essa etapa é realizada antes da reação de mutação, pois a linhagem de *E. coli* utilizada para transformação dos clones mutantes (DH5 α -T1^R) possui uma endonuclease que reconhece e digere o DNA metilado usado como molde para as mutações. Assim, após a transformação o DNA molde será digerido, restando apenas o vetor não metilado que contém as substituições de aminoácidos.

Na reação de metilação 100 ng do vetor pET32c, contendo a construção para expressão da toxina recombinante, foram incubados por 1 h a 37 °C com 1,6 μ l do tampão de metilação, 1,6 μ l de SAM (s-adenosil-metionina) 10x concentrada, 1 μ l de DNA metilase (4 U/ μ l) e água MiliQ q.s.p. 16 μ l.

4.7.2 Mutação sítio dirigida

Após ser metilado, o vetor pET32c contendo a construção para expressão da toxina recombinante, foi utilizado como molde para as reações de PCR com os iniciadores contendo as alterações das bases codificantes para cada aminoácido a ser substituído. As reações foram realizadas separadamente para cada mutante utilizando-se 0,3 μ M de cada iniciador, 0,3 μ M de dNTPs, 5 μ l de tampão de reação 10x concentrado, 1 mM de MgSO₄, 2,5 U de *Taq Platinum High Fidelity* e água MiliQ q.s.p 50 μ l. A tabela 1 contém a relação dos *iniciadores* utilizados para cada mutante. As reações foram realizadas no termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystems) programado para uma desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 20 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 55 °C, 6 min a 68 °C e um ciclo final de 10 min a 68 °C (extensão). Após a reação uma alíquota dos produtos de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Mutante	Iniciadores
Y24A	FW: 5' CTCGGTAACTGTGATTGTGCATGGTCAGACAG 3' RV: 5' ACAATCACAGGTTACCGAGTCTCCACAGCA 3'
W25A	FW: 5' GTAACCTGTGATTGTTAT G CATCAGACAGCTG 3' RV: 5' ATAACAATCACAGGTTACCGAGTCTCCAC 3'
K30A	FW: 5' GTTATTGGTCAGACAGCTGCGCATGTAGAGAGA 3' RV: 5' GCAGCTGTCTGACCAATAACAATCACAGGT 3'
R32A	FW: 5' GGTCAGACAGCTGCAAATGTGCAGAGAGTAATT 3' RV: 5'ACATTTGCAGCTGTCTGACCAATAACAATC 3'
F36A	FW: 5'GCAAATGTAGAGAGAGTAATGCAAAAATCGGTA 3' RV: 5'ATTACTCTCTACATTTGCAGCTGTCTGA 3'

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores *foward* e *reverse* utilizados nas reações de mutação sítio dirigidas. Cada iniciador contém a alteração das bases codificantes do aminoácido a ser substituído pelas bases codificantes de alanina.

4.7.3 Transformação dos clones mutantes

Após as reações de mutações sítio dirigidas, os clones mutantes foram transformados em células *E.coli* da linhagem DH5 α -T1R, utilizando-se 2 μ l da reação de PCR, de acordo com o protocolo descrito no item 4.1.5. Após a purificação do DNA plasmidial, segundo item 4.5.7, os clones foram sequenciados para confirmação da substituição das bases (item 4.1.13).

4.7.4 Expressão, purificação e caracterização dos mutantes

Os clones mutantes que tiveram a alteração de bases confirmada pelo sequenciamento foram transformados na linhagem Rosetta-gami (DE3) pLysS (Novagen) segundo item 4.1.14. Em seguida realizou-se a expressão, purificação e caracterização de cada mutante de acordo item 4.2, exceto item 4.2.8.

4.8 Avaliação da atividade biológica de rPnTx4(5-5)

4.8.1 Teste de toxicidade em insetos

Para avaliar a atividade biológica da toxina recombinante foi realizado um teste de toxicidade em moscas (*Musca domestica*) com três dias de eclosão, pesando cerca de 20 mg, como descrito inicialmente por Figueiredo, (1995). Foram testadas três diferentes quantidades de toxina (5 ng, 10 ng e 100 ng) utilizando-se 10 moscas para cada grupo teste e 10 para o grupo controle. Após serem anestesiadas pelo abaixamento da temperatura (4 °C), as moscas do grupo controle foram injetadas com 1 µl de solução de NaCl 0,9% e BSA 0,1% e o grupo teste com 1 µl da mesma solução contendo a toxina recombinante rPnTx4(5-5). Para a injeção foi utilizada uma microseringa Hamilton (capacidade de 25 µl) acoplada a um dispositivo automático para dispensar o volume (Figura 9). Na agulha da seringa foi adaptado um fino capilar de vidro que era introduzido na porção média do tórax da mosca (entre a segunda e terceira pata) Após a injeção as moscas foram colocadas em frascos transparentes com um chumaço de algodão embebido com solução aquosa de açúcar (5%). Observaram-se os sinais e/ou morte dos insetos aos 5 min, 30 min, 2 h e 24 h.

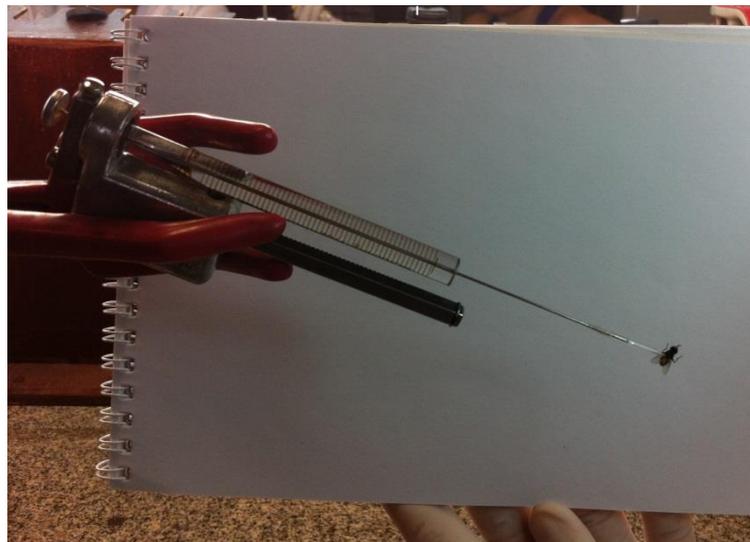


Figura 10 - Aparato utilizado para injeção da toxina nas moscas.

4.8.2 Teste de medida do limiar nociceptivo

Foi realizado um teste de medida do limiar nociceptivo comparativo entre as toxinas nativa e recombinante. Esse teste foi o mesmo realizado por Oliveira, (2010), quando foi demonstrado pela primeira vez a atividade antinociceptiva da toxina PnTx4(5-5).

Para realização do teste, Prostaglandina E2 (PGE₂) foi administrada previamente, por via subcutânea, na superfície plantar da pata posterior dos ratos (2 µg/100 µL/pata) para provocar reação hiperalgésica. As toxinas PnTx4(5-5) nativa ou recombinante foram injetadas pela via intratecal, nas doses de 1 ou 2 µg por animal, três horas depois do agente hiperalgésico (PGE₂), momento correspondente ao pico de ação hiperalgésica de acordo com observações prévias. Para o grupo controle foi utilizada solução salina (NaCl 0,9%) e para o teste, as toxinas diluídas em salina administradas em um volume de 20 µL. Após a sedação dos animais por inalação de isoflurano (3,5%) (BioChimico) a injeção foi realizada, utilizando-se agulha 13 x 0,3 mm acoplada à seringa hipodérmica, diretamente no espaço subaracnóide, entre a quinta e a sexta vértebras lombares (Mestre et al., 1994). Para a avaliação do limiar nociceptivo foi utilizado o método de retirada da pata submetida à compressão (Randall & Selitto, 1957) utilizando-se o aparelho algosimétrico da Ugo Basile (Itália) (Figura 10). Para a aplicação do método, o animal é mantido cuidadosamente em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata sob teste é apresentada, por sua superfície plantar, à parte compressor do aparelho. Esta consiste de duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se apoia a pata do animal, e outra cônica, com uma área de 1,75 mm² na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície plantar do rato. A intensidade dessa pressão aumenta a uma taxa constante de 32 g/s, mediante o acionamento de um pedal, pelo experimentador. Ao observar a resposta nociceptiva do animal (reflexo de retirada da pata), o experimentador desaciona o pedal. Interrompe-se, assim, o aumento da pressão imposta à pata, sendo o último valor registrado correspondente ao limiar nociceptivo. Este fica indicado na escala do aparelho e é expresso em gramas.

Fixando-se a confiabilidade do estudo em 90% e considerando-se um erro absoluto de 10,4 g (variação do limiar nociceptivo observada em relação à média), foi possível realizar o cálculo do N amostral que foi definido em quatro animais para cada grupo experimental. As medidas do limiar nociceptivo foram realizadas em triplicata, para cada animal, em cada tempo e a média das medidas foi utilizada. Os resultados foram apresentados como a média \pm EPM e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni, foram utilizados para verificar a significância das diferenças entre as médias (comparações múltiplas), sendo consideradas significantes quando os valores de $P < 0,05$. Para a construção dos gráficos e aplicação das análises estatísticas foi utilizado o programa Prisma 5.0.

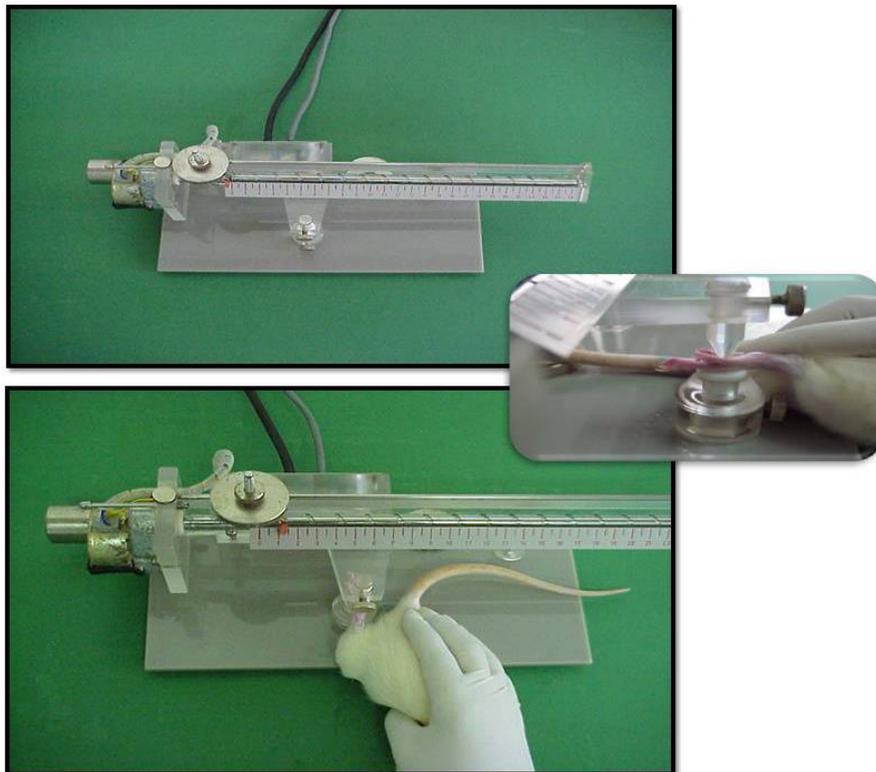


Figura 11- Aparelho algesímetro (Ugo Basile, Itália) utilizado para medir o limiar nociceptivo dos animais.

Fonte: Oliveira, 2010.

4.9 Ensaios eletrofisiológicos

A toxina recombinante e alguns dos mutantes obtidos da mesma foram testados em canais para sódio de inseto e de mamífero expressos em ovócitos da rã *Xenopus laevis*. Todos os ensaios eletrofisiológicos foram realizados no Laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven (Bélgica) durante o estágio sanduíche da doutoranda entre agosto de 2014 e fevereiro de 2015.

4.9.1 Isolamento de ovócitos de rã e expressão dos canais para sódio

Para expressão das diferentes isoformas de canais para sódio, os vetores rNaV1.2/pCLT1, rNaV1.3/pNa3T, rNaV1.4/pUI-2, mNaV1.6/pLCT1, BgNaV1.1/pGH19, que codificam para subunidades α e r β 1/pSP64T, h β 1/pGEM-HE e tipE/pGH19, que codificam para subunidades β , foram previamente linearizados e transcritos utilizando-se os kits de transcrição T7 ou SP6 mMMESSAGE-mMACHINE (Ambion), seguindo-se as instruções do fabricante.

Os ovócitos foram removidos cirurgicamente de rãs previamente anestesiadas em água fria declorada com 0,03% de triclaína, de acordo com Liman et al., 1992. Em seguida, foram incubados em solução ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4) sem cálcio contendo 2 mg/ml de colagenase tipo II por 2 horas a 16 °C sob agitação suave e constante. A seguir, os ovócitos foram lavados quatro vezes com solução ND96 e mantidos a 16 °C. Ovócitos em estágio V e VI foram selecionados manualmente e injetados com até 50 nl de cRNA de cada isoforma de canal na concentração de 1 ng/nl usando-se um micro-injector (Drummond Scientific, USA). As células foram mantidas a 16 °C por 1-5 dias em solução ND96 suplementada com sulfato de gentamicina (50 mg/L) e teofilina (180 mg/L), para expressão dos canais.

4.9.2 Registros eletrofisiológicos

As correntes nos ovócitos foram registradas pelo método de *Voltage-clamp* de dois eletrodos. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (18-22 °C) usando-se amplificador GeneClamp 500 (Axon Instruments, USA) controlado pelo sistema de aquisição de dados pClamp (Axon Instruments, USA). Os eletrodos de voltagem e corrente foram preenchidos com solução de KCl 3M e as resistências de ambos os eletrodos foram mantidas entre 0,5 e 1,5 MΩ. As correntes elicítadas foram amostradas a 20 kHz e filtradas a 2 kHz utilizando-se um filtro passa-baixa Bessel de 4 polos. A subtração de artefatos capacitivos e de corrente de vazamento foi feita por meio de um protocolo P/4. Como solução do banho também foi utilizada a solução ND96.

O efeito da toxina nas diferentes isoformas de canais para sódio foi verificado utilizando-se protocolos padrões de *voltage clamp*. O pulso teste consistiu numa despolarização para 0 mV por 100 ms a partir de um potencial de 'holding' de -90 mV e intervalos de 5 segundos entre cada pulso teste. A relação corrente *versus* voltagem (*I*x*V*) foi obtida por pulsos de despolarização de 100 ms iniciando-se em -90 mV até 65 mV com incrementos de 5 mV.

Para investigar os efeitos da toxina sobre a dependência de voltagem para o processo de ativação dos canais, a condutância do sódio (g_{Na}) foi calculada de acordo com a equação: $g_{Na} = I_{Na}/(V - V_{rev})$, onde I_{Na} é o valor máximo de corrente no potencial aplicado V e V_{rev} é o potencial de reversão. Os valores de g_{Na} foram normalizados, plotados em função da voltagem, e as curvas foram ajustadas de acordo com a equação de Boltzmann, $g_{Na}/g_{max} = [1 + \exp((Vg - V)/k)]^{-1}$, onde g_{max} é o valor máximo da condutância, Vg é a voltagem correspondente a metade do valor da condutância máxima e k é o fator de inclinação da curva.

O efeito produzido pela toxina, na dependência de voltagem do estado estacionário da inativação, foi investigado utilizando-se o protocolo padrão de dois estágios. Esse protocolo consiste em submeter às células a pré-pulsos de 100 ms de -90 a 65 mV com incrementos de 5 mV (protocolo da *I*x*V*), seguidos

por um pulso teste para 0 mV por 50 ms. As amplitudes das correntes do pulso teste foram normalizadas e plotadas em função do potencial aplicado no pré-pulso. As curvas dos experimentos com componente não-inativante (C) foram ajustadas de acordo com a equação de Boltzmann modificada: $I_{Na}/I_{max} = [(1 - C)/(1 + \exp((V - V_h)/k)) + C]$, onde I_{max} é a corrente máxima, V_h é a voltagem correspondente a voltagem onde se tem a metade do valor máximo de inativação, V é a voltagem aplicada, k é o fator de inclinação da curva e C é a fração de corrente de sódio não inativada. Os experimentos controle foram ajustados usando-se a equação de Boltzmann convencional: $I_{Na}/I_{max} = 1/[1 + \exp((V - V_h)/k)]$.

O efeito de dose resposta para Na_vBg foi calculado plotando-se a proporção de corrente sustentada (média da corrente entre 45 e 50 ms - I_{ss}) em relação ao pico da corrente (I_{pico}), em função da concentração de toxina. Para $Na_v1.3$, a dose resposta foi calculada plotando-se a proporção de inibição da corrente em relação ao pico da corrente, em função da concentração de toxina. Os dados foram ajustados com a equação da hipérbole retangular $y = P_{max} * [toxin] / (EC_{50} + [toxin])$ onde P_{max} é o efeito máximo induzido pela toxina, $[toxin]$ é a concentração de toxina e EC_{50} ou IC_{50} é a concentração de toxina na metade da eficácia máxima.

Todo os dados foram analisados utilizando-se os programas Clampfit 10.4 (Molecular Devices, USA), Origin 9.0 (OriginLab, USA) e SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Germany). Os resultados foram verificados através do *Student's paired t test*, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. Os dados foram apresentados através de média \pm Erro Padrão da Média (SEM, do inglês *Standard Error of Mean*) de pelo menos três experimentos independentes.

5 Resultados

5.1 Clonagem

Para a clonagem do cDNA da toxina PnTx4(5-5) no vetor pET32c, inicialmente foi extraído o RNA total de glândulas de veneno da aranha e esse foi utilizado para a síntese do cDNA total. Em seguida a região correspondente à sequência codificante da toxina foi amplificada por PCR, a partir do cDNA total, utilizando-se “iniciadores” específicos. A sequência do cDNA de PnTx4(5-5) foi previamente clonada no vetor pGEM-T e, então, subclonada, no vetor de expressão pET32c.

5.1.1 Extração de RNA

A integridade do RNA total isolado da glândula da aranha *Phoneutria nigriventer* foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (Figura 11). Observam-se as bandas correspondentes às subunidades do RNA ribossomal e ausência de produtos de degradação de baixa massa molecular. A quantificação, em espectrofotômetro, revelou um rendimento de 150 µg de RNA total.

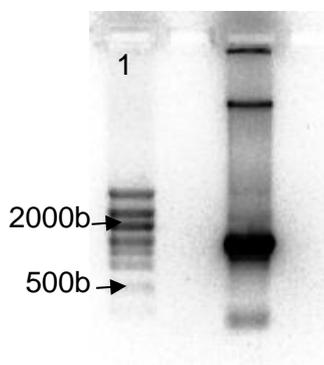


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1%, do RNA total extraído da glândula da aranha *P. nigriventer*.

1- Padrão de massa molecular de RNA (Fermentas). 2- Alíquota do RNA total extraído da glândula da aranha *P. nigriventer*.

5.1.2 Síntese do cDNA e amplificação do cDNA de PnTx4(5-5)

O RNA total, extraído da glândula de *P. nigriventer*, foi utilizado para a síntese do cDNA total de fita simples. Em seguida, este foi utilizado como molde para a amplificação, por PCR, com os iniciadores para o cDNA da toxina PnTx4(5-5). Na figura 12 podemos visualizar a banda de 210 pb correspondente ao cDNA de PnTx4(5-5), indicando que o mesmo foi amplificado com sucesso.

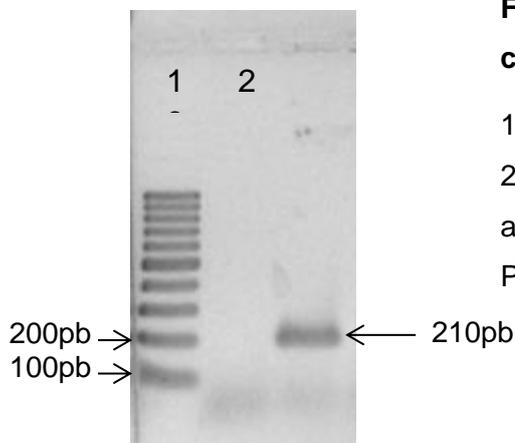


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose (2%), do cDNA da toxina PnTx4(5-5) amplificado por PCR.

1- Padrão de massa molecular de DNA 100pb (Invitrogen).
2- Controle negativo de PCR. 3- Fragmento correspondente ao DNA amplificado por PCR, que codifica a toxina PnTx4(5-5).

5.1.3 Clonagem no vetor pGEM-T e digestão dos clones recombinantes

O produto da amplificação do cDNA da toxina PnTx4(5-5) foi ligado ao vetor pGEM-T e em seguida foi realizada a transformação em células *E. coli* DH5 α . A clonagem foi então confirmada por PCR de colônia, utilizando *iniciadores* para o cDNA de PnTx4(5-5). Após a extração do DNA plasmidial dos clones com inserto, realizou-se a digestão com as enzimas KpnI e XhoI. A figura 13 mostra a análise em gel de agarose da reação de digestão de alguns clones recombinantes. As bandas superiores correspondem ao vetor pGEM-T digerido e, as bandas na altura de 200pb, correspondem ao fragmento correspondente ao cDNA da toxina PnTx4(5-5). A amostra da canaleta 4 apresentou digestão completa e foi escolhida para a retirada e purificação do

fragmento do gel utilizando-se o kit *Pure Link* (Invitrogen). Após a purificação, o material foi então armazenado para posterior subclonagem no vetor pET32c.

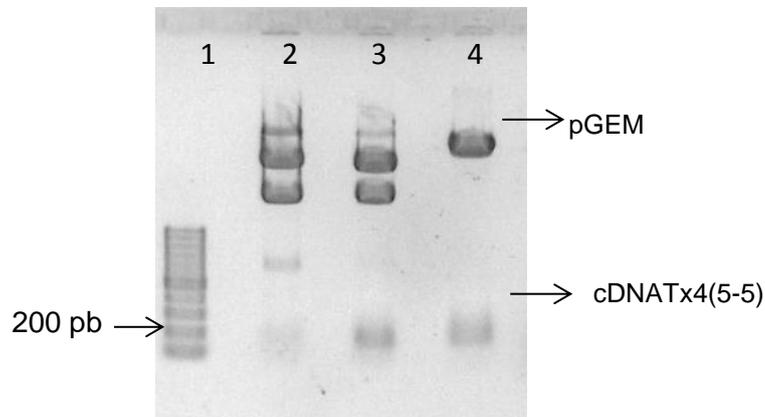


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose (0,8% e 2%), mostrando os produtos da digestão do vetor pGEM-Tx4(5-5).

1- Padrão de massa molecular de DNA 100pb (Invitrogen). 2, 3 e 4- Clones pGEM-T com inserto cDNA PnTx4(5-5), digeridos com KpnI e XhoI .

5.1.4 Construção do vetor recombinante de expressão pET32- PnTx4(5-5)

Para construção do vetor recombinante de expressão pET32-PnTx4(5-5), o vetor pET32c foi digerido com as enzimas KpnI e XhoI (figura 14) e purificado do gel utilizando-se o kit *Pure Link* (Invitrogen).

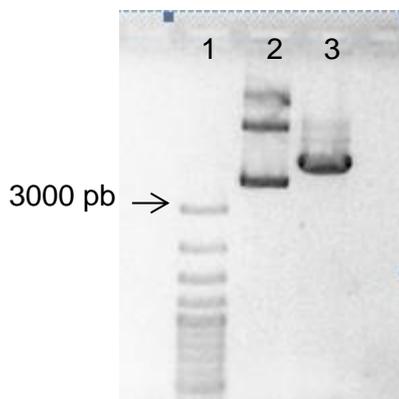


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) mostrando o produto da digestão do vetor pET32c.

1- Padrão de massa molecular de DNA 100pb (Invitrogen). 2- Vetor pET32c não digerido. 3-Vetor pET32c digerido com KpnI e XhoI .

Em seguida, foi feita a ligação do vetor pET32c digerido ao cDNA PnTx4(5-5), previamente digerido com as mesmas enzimas.

5.1.5 PCR de colônia

Após a clonagem, o vetor de expressão recombinante pET32-PnTx4(5-5) foi previamente transformado em células *E. coli* DH5 α . Alguns clones foram coletados das placas e foi realizada PCR de colônia, com os iniciadores específicos do cDNA PnTx4(5-5), para averiguar a presença do inserto. A figura 16 mostra o resultado da PCR, que revelou a presença do inserto na maioria dos clones.

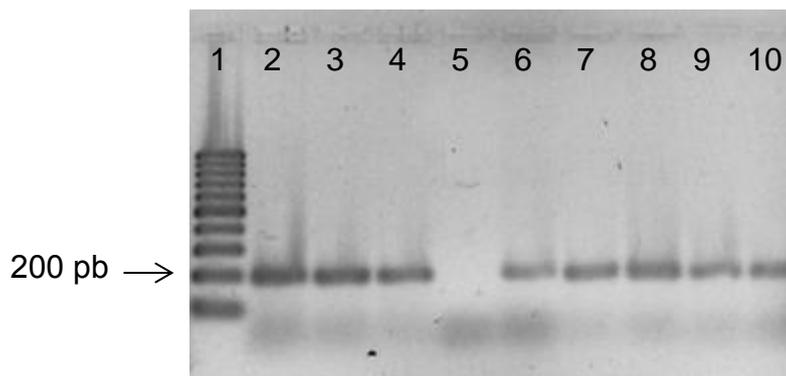


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose (2%) da PCR de colônia.

1- Padrão de massa molecular de DNA 100pb; 2 a 10- Clones amplificados com *iniciadores* para o cDNA de PnTx4(5-5).

5.1.6 Sequenciamento

Realizou-se a extração do DNA plasmidial dos clones com inserto e, em seguida, o sequenciamento, para averiguar se o fragmento de DNA que codifica a toxina estava inserido em fase de leitura (*in frame*) e sem alteração de nenhuma base. A figura 17 mostra, na parte superior, a sequencia de DNA do inserto contendo o sítio de restrição para a enzima KpnI, a sequencia de

bases codificantes para os aminoácidos reconhecidos pela enzima TEV e a sequencia do cDNA codificante para a toxina madura PnTx4(5-5). Na parte inferior está o alinhamento entre a sequencia da parte superior e a sequencia de um dos clones pET32-PnTx4(5-5), obtido no sequenciamento, realizado no programa BLAST (bl2seq) pelo site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.



Figura 17 – Resultado do sequenciamento após a clonagem da sequencia do cDNA da toxina PnTx4(5-5).

a) Sequencia de DNA inserida no vetor pET32c, com o sítio de restrição da enzima KpnI sublinhado, a sequencia de bases correspondentes aos aminoácidos reconhecidos pela enzima Tev em negrito, seguido pela a sequencia do cDNA da toxina madura PnTx4(5-5). b) Alinhamento realizado entre a sequência da parte superior com um dos clones recombinantes sequenciados.

5.2 Expressão, purificação e caracterização da Trx-PnTx4(5-5)

5.2.1 Expressão

Escolheu-se um clone cuja sequência de bases do inserto no plasmídeo pET32c é a apresentada na figura 17a e realizou-se transformação em células Rosetta-gami (DE3) pLysS para a expressão proteica. Durante o período de incubação e após indução com IPTG foi feita a avaliação cinética da expressão da proteína recombinante e, alíquotas com tempo de indução de 1, 2, 3 e 16 h foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 12,5% (Figura 18). A toxina recombinante é expressa inicialmente em fusão com a proteína tioredoxina - Trx-rPnTx4(5-5) - e tem uma massa molecular teórica de 22,5 kDa, calculada pela ferramenta *Protparam* do website *Expasy Proteomics Server* (web.expasy.org/protparam). O gel mostra que a Trx-rPnTx4(5-5) expressa, tem massa molecular entre 20-25 kDa e pela intensidade cromática das bandas avaliou-se que, em três horas atingiu-se um patamar máximo da expressão.

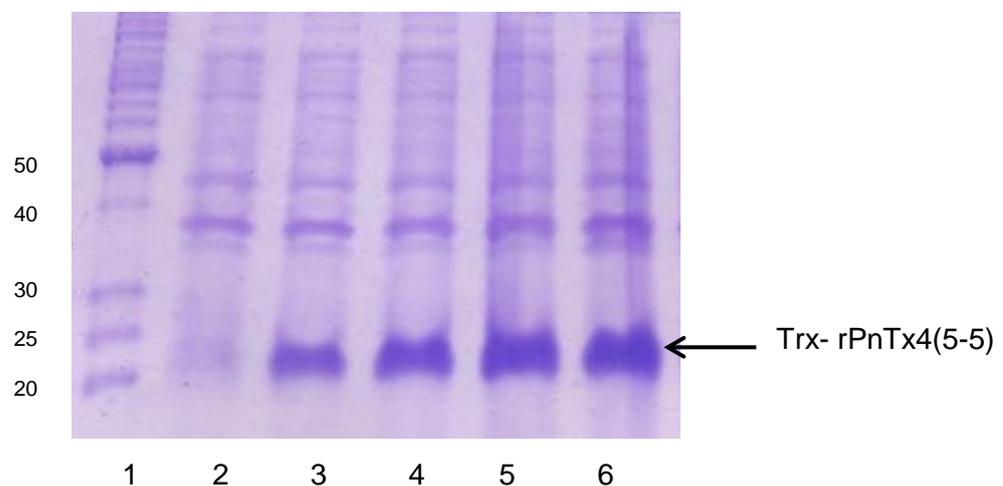


Figura 18 - Avaliação da cinética de expressão da proteína em fusão Trx-rPnTx4(5-5) por SDS-PAGE 12,5%.

1- Padrão de massa molecular Bench Mark protein ladder (kDa) (Invitrogen). 2- Controle com células não induzidas. 3- Células após 1 h de indução. 4- Células após 2 h de indução. 5- Células após 3 h de indução. 6- Células após 16 h de indução.

5.2.2 Cromatografias de afinidade e gel filtração

O sobrenadante do extrato celular bacteriano, contendo a proteína em fusão rTrx-PnTx4(5-5), foi submetido à cromatografia de afinidade com metais imobilizados (IMAC) utilizando-se a coluna HisTrap HP 1ml (Figura 19). As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE e as frações contendo a proteína recombinante com menos contaminantes (região demarcada), foram reunidas e a concentração deste *pool* foi estimada a partir da leitura de absorbância a 280 nm, revelando-se um rendimento médio de 0,7 mg de proteína por litro de cultura.

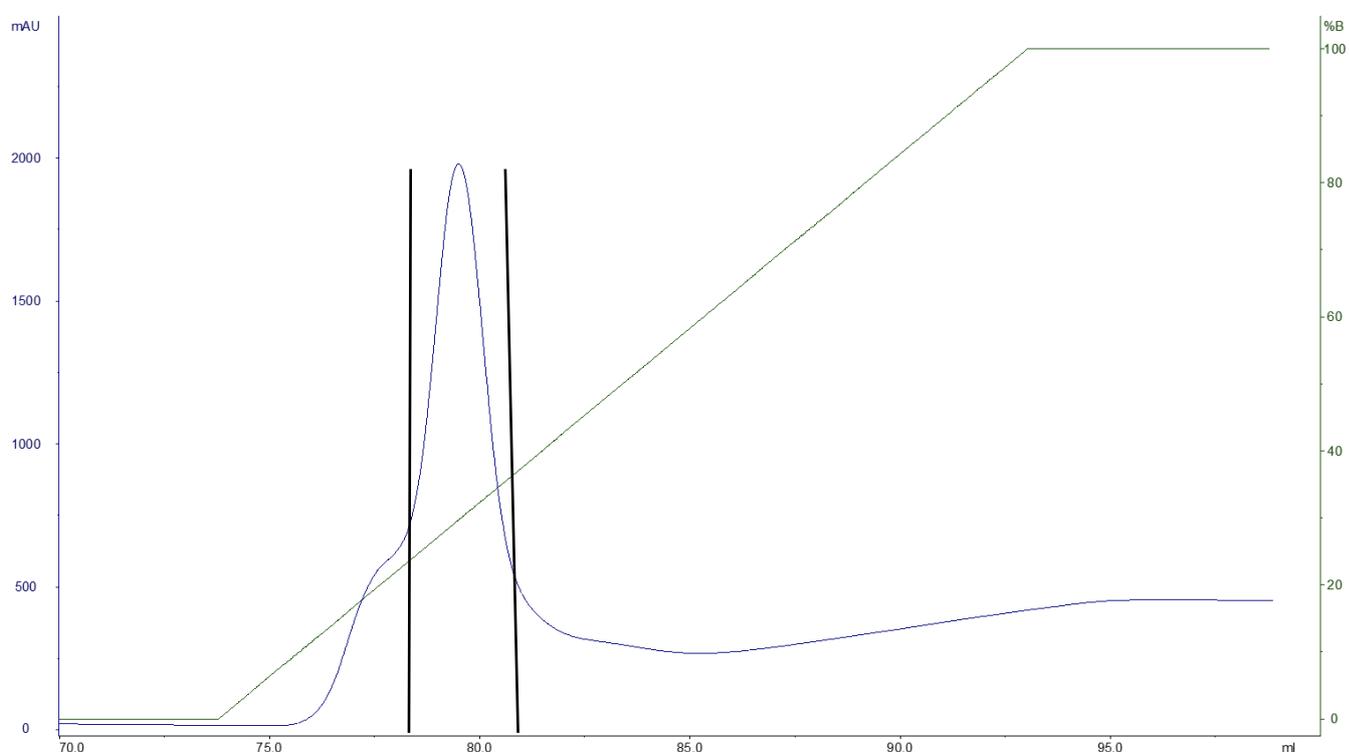


Figura 19 – Perfil da cromatografia de afinidade (IMAC) resultante da aplicação do extrato celular contendo a proteína em fusão Trx-rPnTx4(5-5) em coluna Histrap HP (0,7 × 2.5 cm/ 1 ml).

A coluna foi equilibrada com o tampão de ligação (50 mM imidazol, 0,5 M NaCl e 20 mM fosfato de sódio, pH 7,4) e as proteínas foram eluídas em um gradiente linear (0-100%) de tampão de eluição (0,5 M de imidazol, 0,5 M NaCl e 20 mM fosfato de sódio, pH 7,4) com um fluxo de 1,0 ml/min a 22° C. Frações de 0,5 ml foram coletadas. A cromatografia foi monitorada por leituras em 280 nm. As frações indicadas pela região demarcada no cromatograma foram reunidas e armazenadas à 4°C

A figura 20 mostra o gel da SDS-PAGE de amostras de cultura celular não induzida (2) e induzida (3), extrato celular sonificado induzido e centrifugado (4 e 5) e após a purificação, por cromatografia de afinidade – IMAC (6). Observa-se na canaleta 5 que, a maior parte da proteína recombinante foi expressa de forma solúvel encontrando-se pouca quantidade desta no precipitado (canaleta 4). Na canaleta 6 pode-se visualizar uma fração purificada proveniente da cromatografia de afinidade.

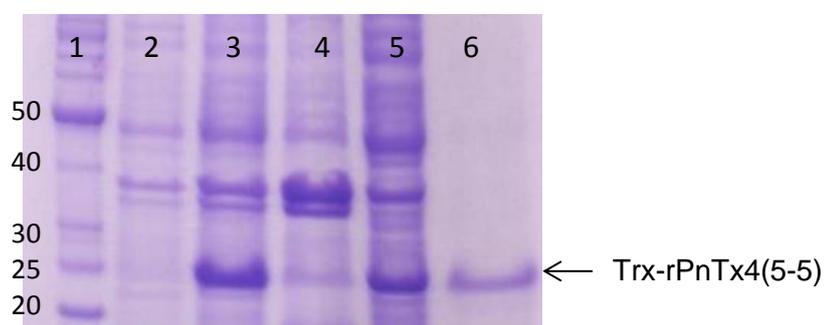


Figura 20: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% dos produtos resultantes da expressão, seguida da purificação da proteína de fusão rTrx-PnTx4(5-5).

1- Padrão de massa molecular *Bench Mark protein ladder* (kDa) (Invitrogen); 2- Controle com células não induzidas; 3- Células após 3 h de indução; 4- Precipitado de extrato celular centrifugado; 5- Sobrenadante de extrato celular centrifugado; 6- Fração purificada por cromatografia de afinidade - IMAC

Após a purificação por cromatografia de afinidade, foi necessária a troca do solvente para a realização da clivagem enzimática da proteína em fusão Trx-rTx4(5-5) com a enzima TEV protease. O material proveniente da cromatografia de afinidade (Figura 19) foi concentrado em centrifuga à vácuo e submetido à cromatografia de gel filtração, em coluna HiTrap HP Desalting 5ml (GE Healthcare) no tampão da enzima TEV protease 2x (100mM Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 1mM). As frações com leitura foram reunidas e, após essa etapa, o rendimento foi estimado em 0,45 mg de proteína por litro de cultura.

5.2.3 Clivagem

Para obtenção e purificação da toxina recombinante rPnTx4(5-5), o material contendo a proteína em fusão Trx-rPnTx4(5-5), eluído em coluna de gel filtração (HiTrap HP Desalting 5ml) foi incubado com a enzima TEV protease. A TEV reconhece o epítipo linear Glu-Asn-Leu-Phe-Tyr-Gln↓Gly, inserido e expresso na proteína em fusão recombinante. Após a clivagem enzimática, a amostra foi analisada por espectrometria de massas, que revelou a presença de uma espécie com massa molecular de 5230,3 Da, semelhante à massa teórica calculada para a toxina recombinante rPnTx4(5-5), que difere da toxina nativa (massa de 5170 Da) por possuir uma glicina (57Da) na extremidade N-terminal. Essa glicina é parte do sítio de clivagem da enzima TEV protease (↓) como indicado na sequência de aminoácidos mencionada acima.

5.2.4 Cromatografia de fase reversa

Após a clivagem pela TEV para obtenção da toxina rPnTx4(5-5), o produto da reação enzimática foi submetido à última etapa de purificação por cromatografia de fase reversa em coluna Sephasil Peptide (C18 5 μ ST4.6/250). Pela análise do perfil cromatográfico observa-se que a proteína foi eluída com 30% de tampão B (Figura 21). Após essa última etapa de purificação, o rendimento médio final foi de 0,05 mg de toxina recombinante por litro de cultura.

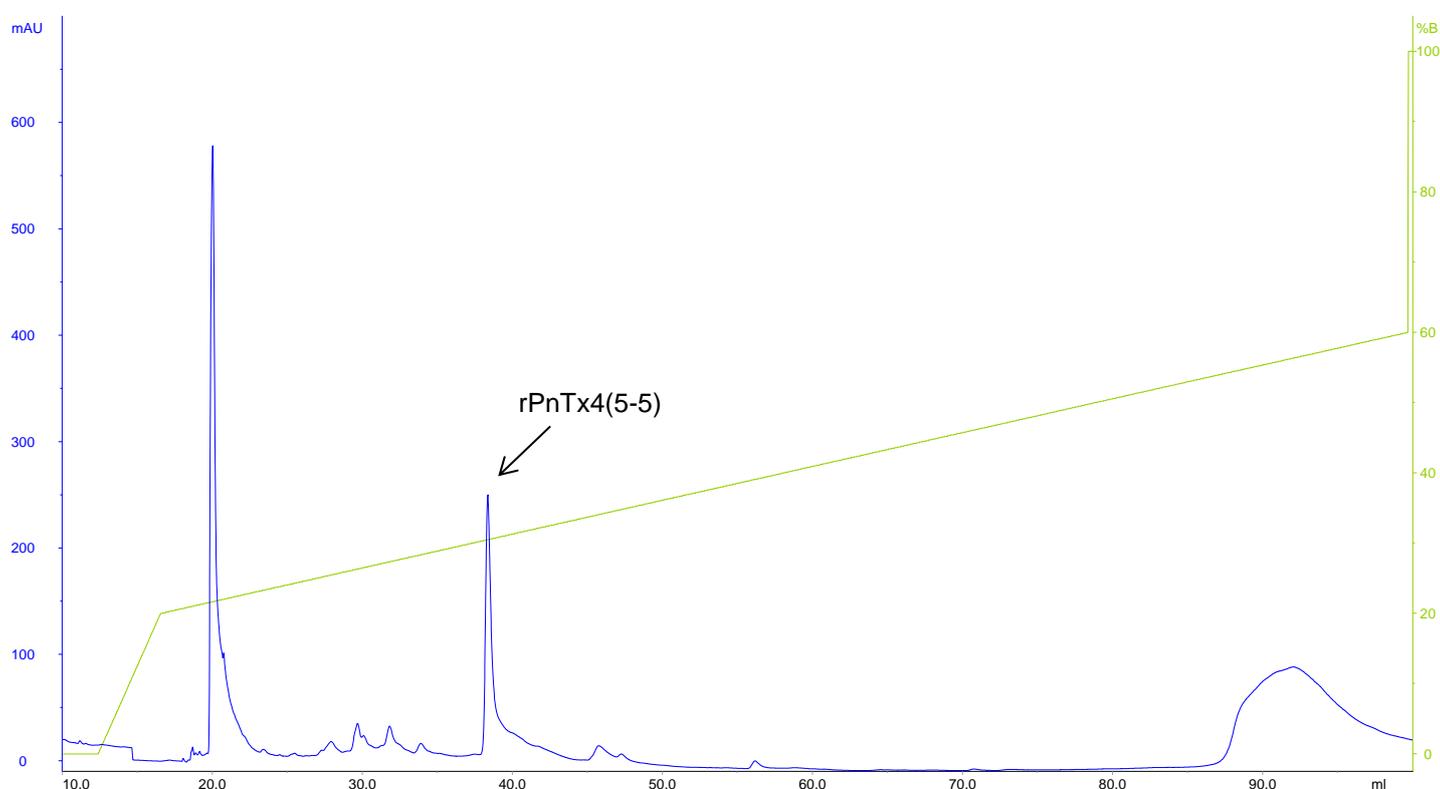


Figura 21 – Perfil da cromatografia de fase reversa, resultante da aplicação da mistura da reação de clivagem da proteína rTrx-PnTx4(5-5) pela TEV protease.

A cromatografia foi realizada em coluna Sephasil Peptide (C18 5 μ ST4.6/250 - 0,46 x 25 cm/ 4,15mL) previamente equilibrada com 0,1% TFA/H₂O (eluyente A). Os picos foram obtidos em gradiente linear de 25 a 60% de 0,1% TFA/ACN (eluyente B). Fluxo de 1mL/min. A cromatografia foi monitorada por leituras em 280 nm. O pico indicado pela seta corresponde a rPnTx4(5-5), eluída com 35% de eluyente B.

5.2.5 Espectrometria de massas

A análise por MALDI TOF/TOF MS do material purificado por cromatografia de fase reversa (Figura 21) mostrou a presença de apenas uma espécie molecular com massa de 5230,3 Da (figura 22). Essa massa corresponde a proteína rPnTx4(5-5), cuja massa teórica calculada é de 5231,8 Da, considerando-se que todos os resíduos de cisteínas estejam oxidados.

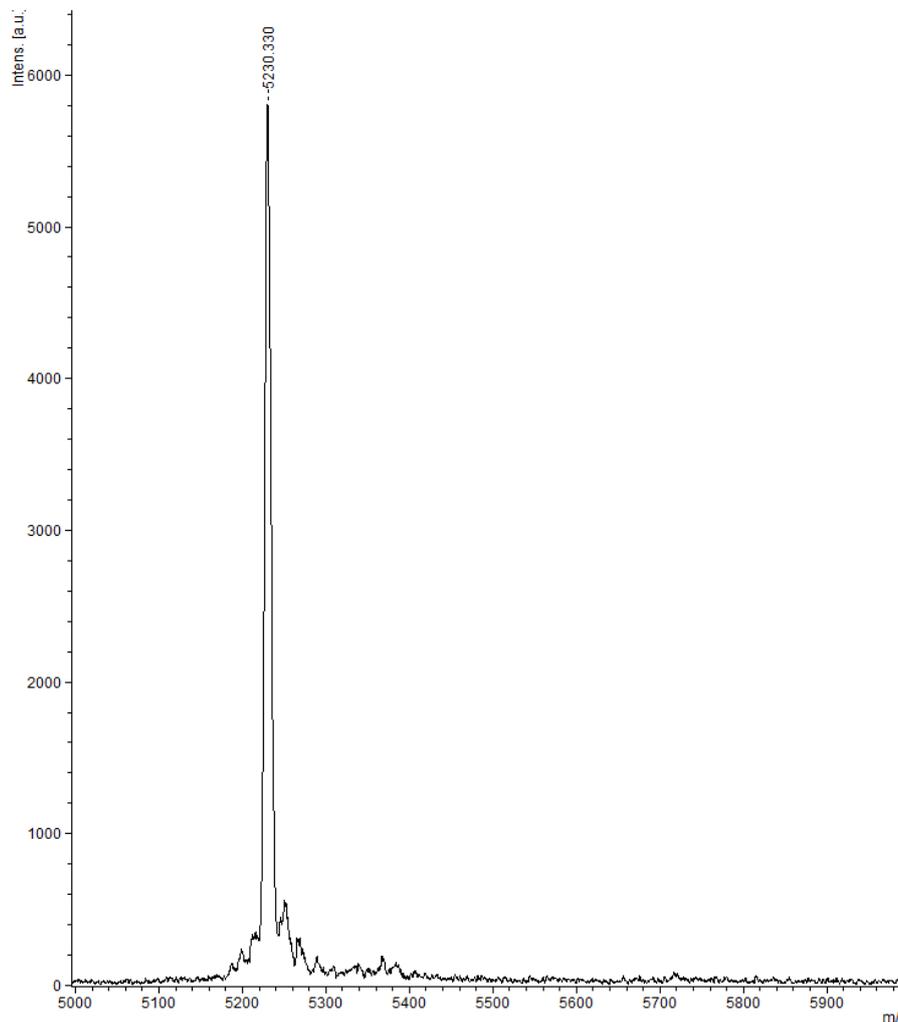


Figura 22 - Figura representativa da espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF do material purificado por cromatografia de fase reversa.

O pico com massa de 5230,33 corresponde à massa da toxina recombinante rPnTx4(5-5).

5.2.6 Dicroísmo circular

O perfil de dicroísmo circular, correspondente à estrutura secundária da proteína recombinante rPnTx4(5-5) foi comparado ao da toxina nativa. Pela figura 23 podemos observar que os espectros são praticamente sobrepostos, indicando que a toxina recombinante possui estrutura secundária bem semelhante à da nativa. Ambas mostram no espectro, um mínimo a 205 nm e um máximo a 191 nm. Pelos dados de CD foi estimado um conteúdo de folhas-beta de 39,9% na toxina recombinante e 41,1% na nativa.

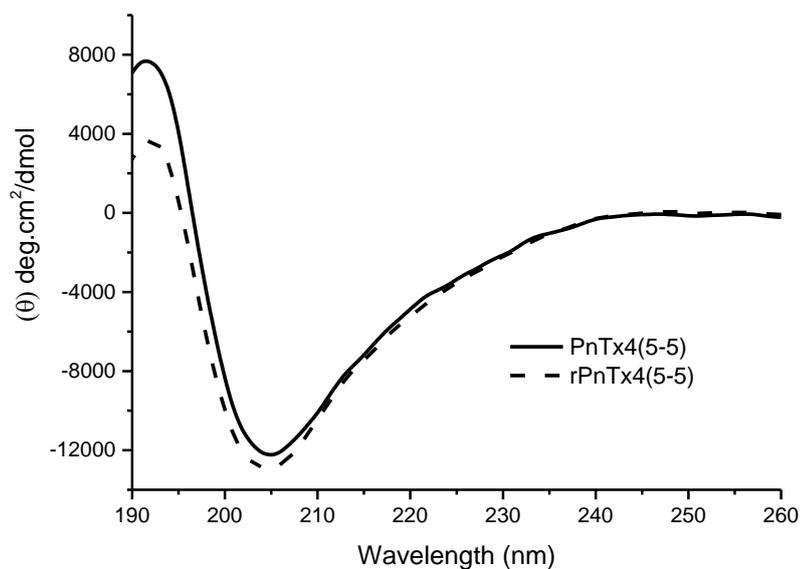


Figura 23 - Espectro de dicroísmo circular da toxina PnTx4(5-5) nativa e recombinante.

5.3 Obtenção e caracterização dos mutantes da toxina rPnTx4(5-5)

Foram feitas mutações sítio-dirigidas por PCR na sequência da toxina recombinante, utilizando-se como molde o vetor pET32c-rTrx-Tx4(5-5). O sequenciamento dos plasmídeos mutantes confirmou a substituição da sequência codificante dos aminoácidos alvo por alanina, e os clones contendo insertos para as proteínas mutantes foram transformados em células Rosetta-gami (DE3) pLysS. Após a expressão, purificação e clivagem com a enzima TEV protease, os mutantes foram analisados por espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF). A tabela 2 mostra a massa calculada para cada um dos mutantes, após a substituição dos aminoácidos e as figuras 24 a 26 mostram seus espectros de massas. A massa dos mutantes Y24A e F36A apresentou uma diferença de 3 Da a mais e a menos, respectivamente, em relação à massa teórica. Essa diferença é aceitável, pois pode ser causada por artefatos de calibração do aparelho. Os mutantes W25A e K30A apresentaram problemas de precipitação na reação de clivagem com a enzima TEV protease, e não foi possível analisá-los no espectro de massas.

Mutante	Massa calculada (Da)
Y24A	5139,88
W25A	5116,84
K30A	5174,88
R32A	5146,87
F36A	5155,88

Tabela 2 - Massa teórica calculada para cada mutante da toxina PnTx4(5-5)

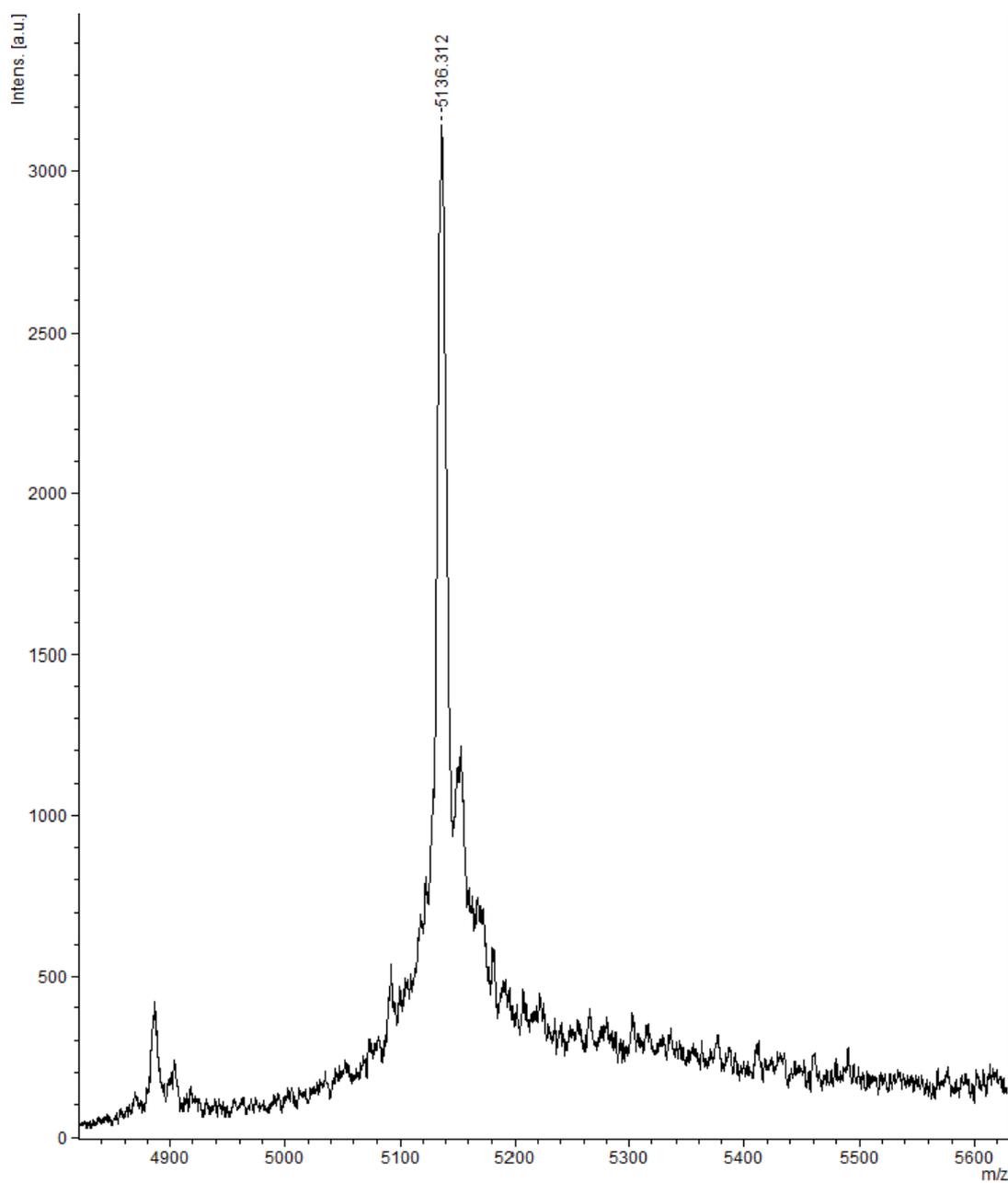


Figura 24 - Espectro de massas do mutante Y24A. A massa encontrada foi de 5136.312 Da.

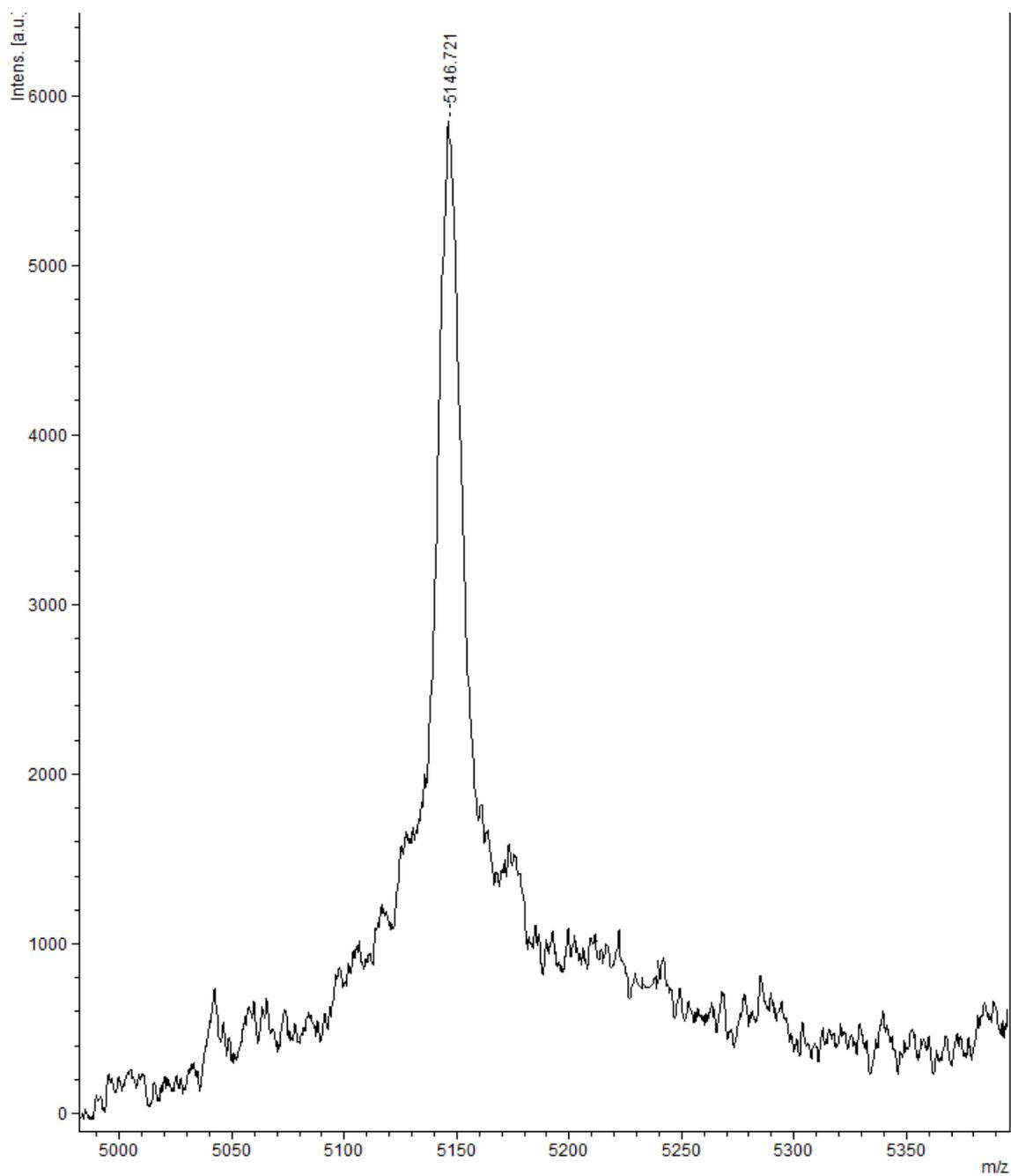


Figura 25 - Espectro de massas do mutante R32A. A massa encontrada foi de 5146.721 Da.

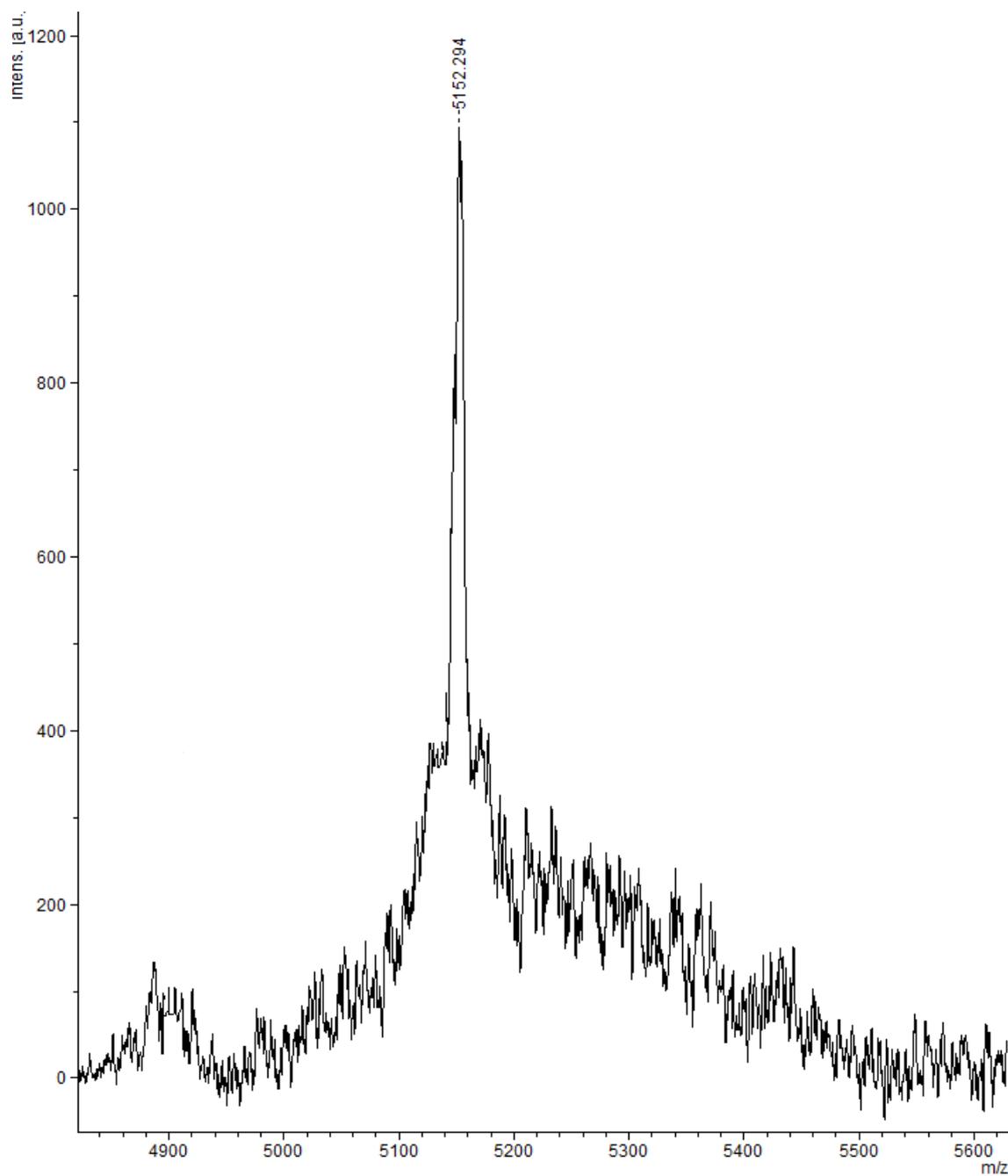


Figura 26 - Espectro de massas do mutante F36A. A massa encontrada foi de 5152.294 Da.

5.4 Atividade biológica

5.4.1 Toxicidade em insetos

Para testar a atividade biológica da toxina recombinante foi realizado um teste de toxicidade em moscas (*Musca domestica*). Após a injeção de solução salina/BSA no grupo controle e de 5 ng, 10 ng e 100 ng da toxina recombinante, diluída em salina/BSA, no grupo teste, as moscas foram observadas após 5 min, 30 min, 2h e 24h e os sinais decorrentes da ação da toxina foram anotados. O teste de toxicidade revelou que rPnTx4(5-5) induz os mesmos sinais que a toxina nativa. A tabela 3 mostra os resultados do teste com 10 ng, que corresponde à DL₅₀ calculada para a toxina nativa (Figueiredo et al., 2001), e que no teste com rPnTx4(5-5) causou 60% de morte (6/10) das moscas. A dose de 100 ng causou 90% de morte (9/10) após 24 h.

Sinais	Controle (n=10)				Toxina (n=10)			
	5min	30min	2h	24h	5min	30min	2h	24h
Protusão e retração da probóscide					X	x	x	
Salivação			x			x	x	
Tremores					X	x	x	
Paralisia/ Incapacidade de vôo						x	x	x
Morte							x (2/10)	x (6/10)

Tabela 3 - Sinais observados em moscas após a injeção de salina/BSA (controle) e 10ng de rPnT4(5-5) diluída na mesma solução..

5.4.2 Teste de medida do limiar nociceptivo

Para avaliar se a toxina recombinante apresenta também atividade antinociceptiva em ratos, como já observado para a toxina nativa (Oliveira, 2010), foi realizado um teste de medida do limiar nociceptivo comparativo com a toxina nativa. O limiar nociceptivo foi avaliado utilizando-se o método de retirada da pata submetida à compressão, utilizando-se o aparelho algosimétrico. Três horas antes da administração das toxinas foi injetada prostaglandina E₂ (PGE₂) na pata direita dos ratos, que induziu a diminuição do limiar nociceptivo dos animais. Pelo gráfico da figura 27 podemos observar que a administração intratecal de 1 e 2 µg de PnTx4(5-5) nativa e de 2 µg de rPnTx4(5-5) causou efeito antinociceptivo, tempo-dependente, sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂, quando comparado ao grupo controle.

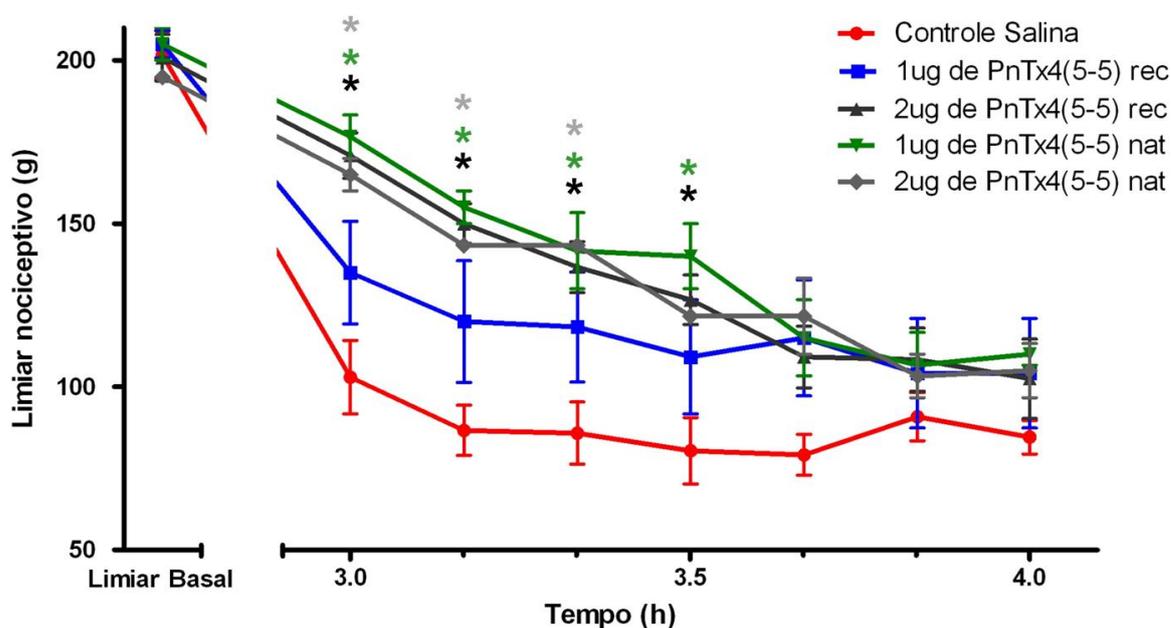


Figura 27 - Efeito da administração intratecal das toxinas PnTx4(5-5) nativa (PnTx4(5-5) nat) e recombinante (PnTx4(5-5) rec), sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂.

Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) da medida do limiar nociceptivo em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE2+Salina.

5.5 Ensaios eletrofisiológicos

5.5.1 Ação de rPnTx5(5-5) no canal para sódio de inseto

A toxina recombinante foi testada inicialmente no canal para sódio (Na_vBg) de barata (*Blattella germanica*), expresso em ovócitos de *Xenopus laevis*. Pelo traço representativo da corrente, podemos observar que na concentração de 1 μM , rPnTx5(5-5) teve um feito marcante no aumento da corrente e na inibição da inativação rápida desse canal (Figura 28a). Analisando-se o gráfico da relação Corrente x Voltagem (IxV), foi detectado um aumento de $105,3 \pm 15,6 \%$ na amplitude do pico da corrente de sódio a - 5 mV (Figura 28b).

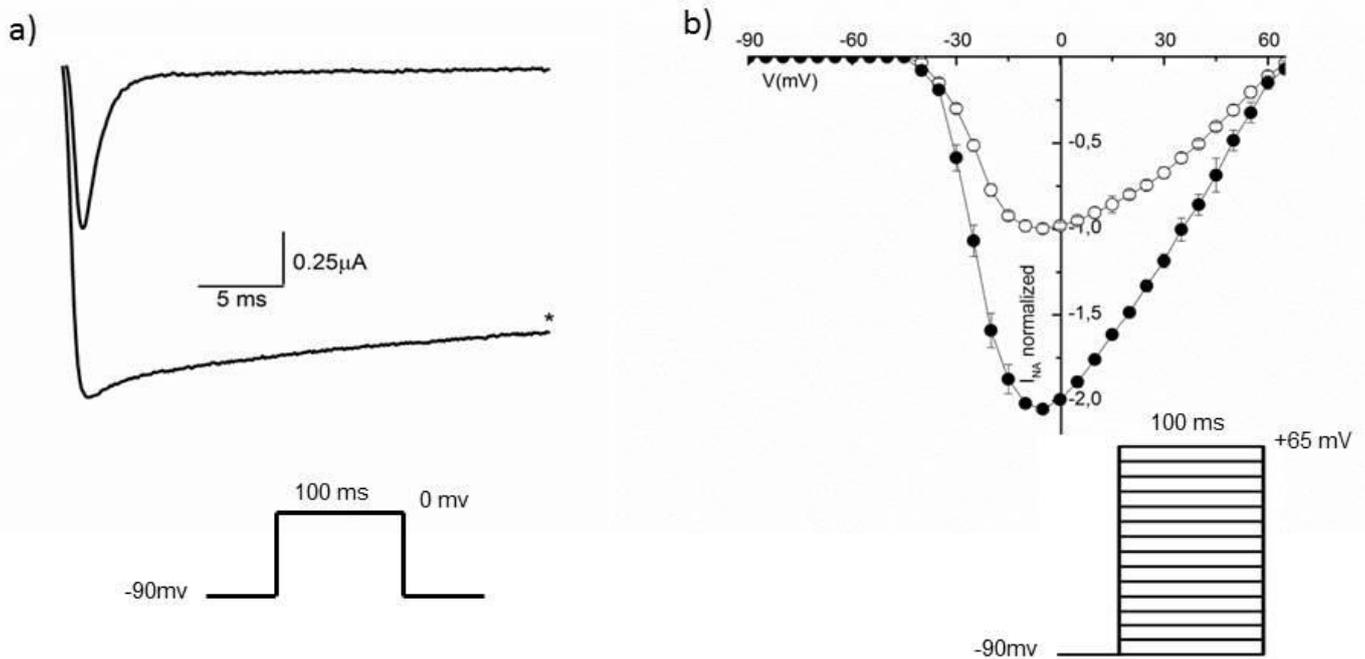


Figura 28 - Ação de rPnTx5(5-5) no canal para sódio (Na_vBg) de barata, *Blatella germanica*.

a) Traço representativo da corrente no controle e na presença de $1 \mu\text{M}$ rPnTx5(5-5) (*)
 b) Gráfico da relação corrente x voltagem, no controle (○) e na presença de $1 \mu\text{M}$ de rPnTx4(5-5) (●). Os valores foram normalizados pelo pico máximo de corrente de cada célula correspondente no controle. O protocolo utilizado está representado abaixo de cada imagem.

O efeito da toxina na dependência de voltagem do canal NavBg foi analisado através das curvas de ativação (figura 29a) e do estado estacionário da inativação (figura 29b). Analisando-se os parâmetros obtidos (tabela 4), constatamos que a toxina não causa efeito significativo na dependência de voltagem para a ativação do canal. No entanto, como a toxina bloqueia completamente a inativação rápida do canal, houve um grande aumento do fator de inclinação da curva do estado estacionário da inativação (Kh). Assim, foi necessário a adição do componente (C) na equação de Boltzmann, para quantificar este componente não inativante, e para o melhor ajuste da curva do estado estacionário da inativação. O valor da voltagem para 50% da inativação máxima (Vh) não foi modificado significativamente.

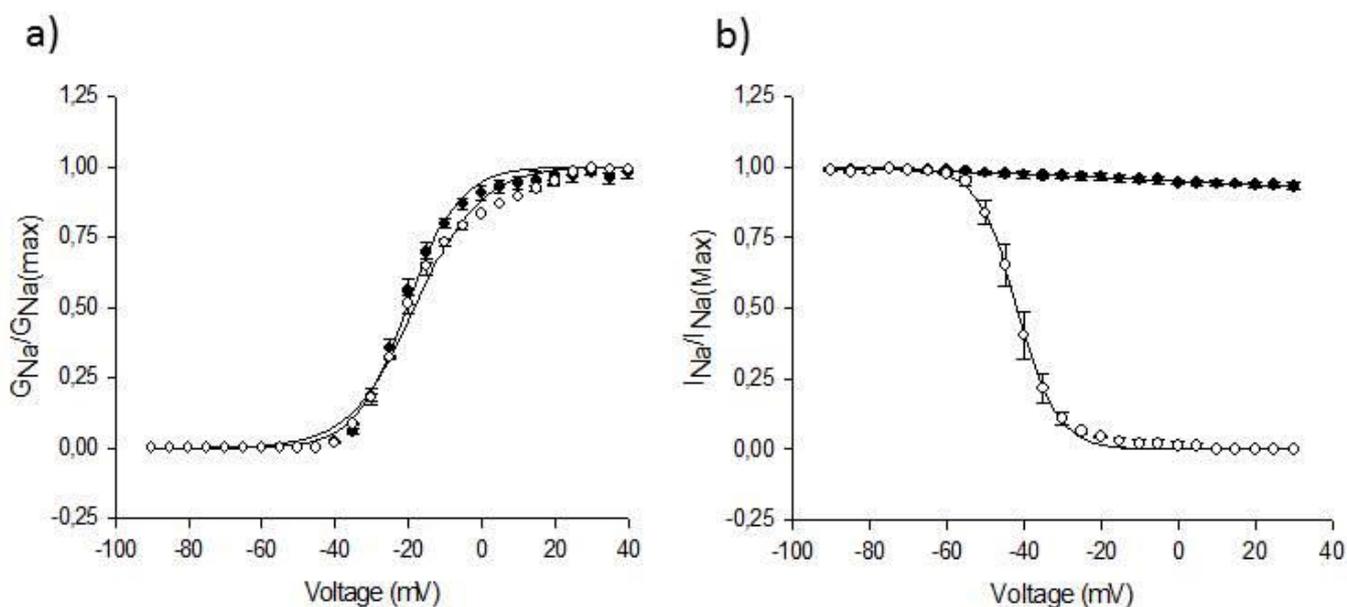


Figura 29 - Efeitos de rPnTx5(5-5) na cinética de ativação e de inativação do canal NavBg.

Curvas de ativação (a) e do estado estacionário da inativação (b) no controle (○) e na presença de 1 μM rPnTx4(5-5) (●). Os dados foram ajustados segundo a equação de Boltzmann.

Parâmetros	Controle	Toxina
V _g	-18,1±0,75	-20,2±0,99
K _g	8,9±0,1	7,03±0,43
V _h	-42,3±1,21	-36,3±7,87
K _h *	4,9±0,15	16,9±2,80
C*	0,015±7,3e-3	0,9±0,01

Tabela 4 - Parâmetros calculados a partir das curvas de ativação e do estado estacionário da inativação do canal NavBg, no controle e na presença da toxina rPnTx5(5-5).

Os dados estão representados como média ± SEM de três experimentos independentes, sendo $p < 0,05^*$.

A figura 30a mostra que a proporção de corrente persistente (I_{ss} de “sustained current”) em relação ao pico da corrente iônica (I_{peak}) aumenta com a concentração de toxina. Para quantificar a inibição da inativação induzida pela toxina, a relação I_{ss}/I_{peak} foi plotada em função de diferentes concentrações de toxina numa curva de dose-resposta. Os dados foram ajustados pela equação da hipérbole retangular resultando em um EC_{50} de 253nm e o efeito máximo de 88 (figura 30b).

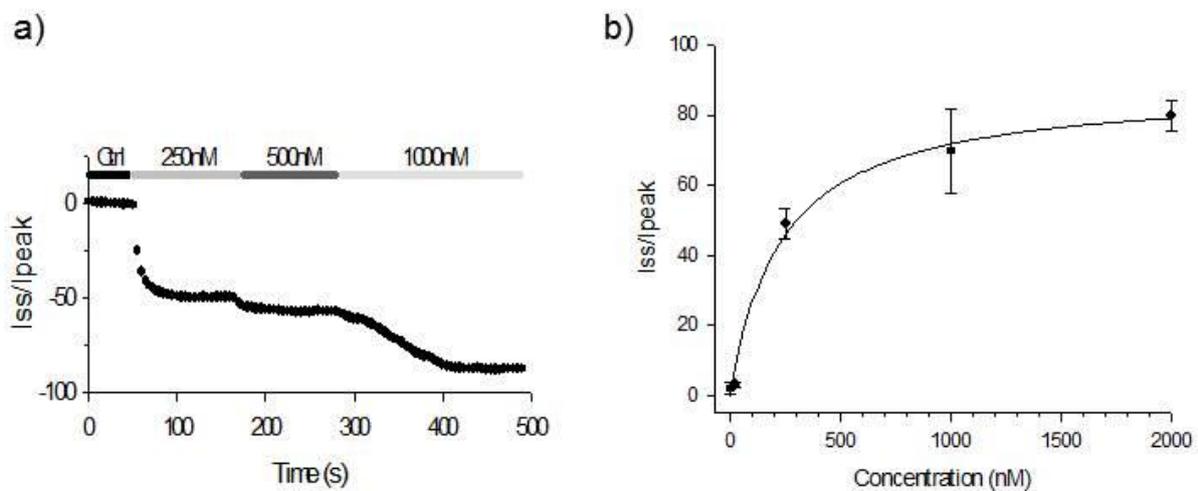


Figura 30 - Efeitos de diferentes concentrações de rPnTx5(5-5) no canal NavBg.

a) Aumento da proporção de corrente persistente (média da corrente entre 45 e 50 ms - I_{ss}) em relação ao pico da corrente (I_{peak}), em diferentes concentrações de rPnTx4(5-5). b) Curva dose resposta de rPnTx4(5-5). A curva foi obtida plotando-se os valores de (I_{ss}/I_{peak}) em função da concentração de toxina e ajustada pela equação da hipérbole retangular (EC_{50} = 253 nm).

5.5.2 Ação de rPnTx5(5-5) nos canais para sódio de mamífero

A toxina recombinante também foi testada nas isoformas de canais para sódio de mamífero $Na_v1.2$, 1.3 , 1.4 , 1.5 e 1.6 , expressos em ovócitos de *Xenopus*. Ao contrário do efeito observado no canal de inseto, na concentração de $1 \mu M$, a toxina apresentou efeito inibitório em todas as isoformas dos canais testados, com a seguinte ordem de eficácia: $Na_v1.3 > Na_v1.6 > Na_v1.5 > Na_v1.4 \geq Na_v1.2$ (Figura 31).

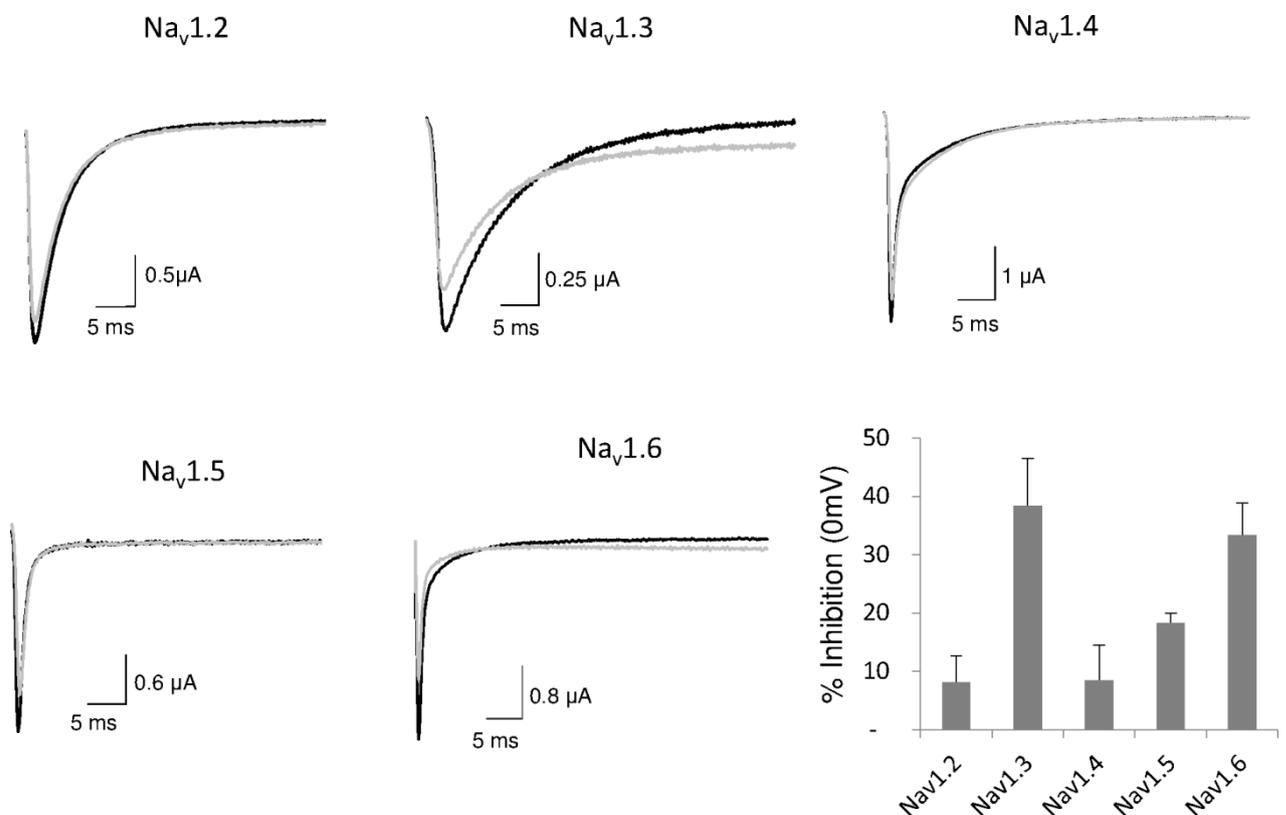


Figura 31 - Efeitos de rPnTx5(5-5) em diferentes isoformas de canais para sódio de mamífero, expressos em ovócitos de *Xenopus*.

Os traços são representativos da corrente no controle (preto) e na presença de $1 \mu M$ rPnTx5(5-5) (cinza). Na figura da parte inferior à direita, estão representadas as porcentagens médias de inibição, para cada isoforma de canal.

Devido ao maior efeito da toxina no canal Nav1.3, a porcentagem de inibição de corrente nesse canal foi calculada em função de diferentes concentrações de toxina, numa curva de dose-reposta. Os dados foram ajustados pela equação da hipérbole retangular, resultando em um IC_{50} de 1,5 μ M e uma inibição máxima de um $38.4 \pm 8.1\%$ (Figura 32).

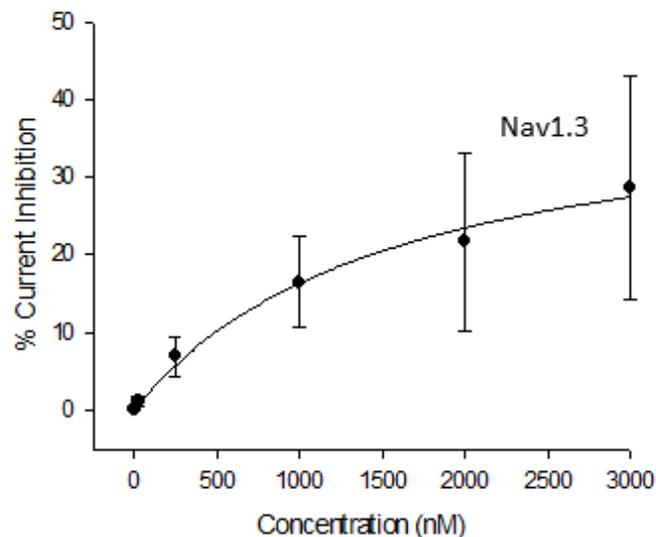


Figura 32 - Efeito de rPnTx4(5-5) na corrente do canal Nav1.3.

A curva foi obtida plotando-se a proporção de inibição de corrente em relação ao pico da corrente, em função da concentração de toxina, e ajustada pela equação da hipérbole retangular ($IC_{50} = 1.5 \mu$ M).

Para averiguar o efeito da toxina na dependência de voltagem dos canais para sódio de mamífero, foram analisados os parâmetros das curvas de ativação e do estado estacionário da inativação dos canais. Os valores dos parâmetros obtidos para cada canal estão listados na tabela 5. Através da análise da curva de ativação verificou-se que a toxina alterou de forma significativa o deslocamento da voltagem de 50% ativação máxima (V_g) dos canais Nav1.3 e 1.5 para potenciais mais despolarizados. Esse deslocamento não foi significativo para os canais Nav1.2, 1.4 e 1.6. No entanto, houve

alteração significativa para do fator de inclinação da curva de ativação (Kg) para todos os canais, exceto para Nav1.2.

Pela análise da curva do estado estacionário da inativação verificou-se que no canal Nav1.3, a toxina deslocou Vh de forma significativa, para valores hiperpolarizados, além de aumentar o fator de inclinação Kh (tabela 5). Além disso, para esse canal também foi necessário a adição de um componente não inativante (C), para o melhor ajuste da curva do estado estacionário da inativação (controle 0.04 ± 0.03 e rPnTx4(5-5) 0.135 ± 0.04). Também houve um aumento significativo de Kh para o canal Nav1.6. Para os outros subtipos de canais de mamífero não foram verificadas alterações significativas nos parâmetros de inativação (tabela 5). As curvas de ativação e do estado estacionário da inativação para os canais Nav1.3 e 1.5 estão representadas na figura 33.

		Vg (mV)	Kg	Vh (mV)	Kh
Nav1.2	Control	-25.6±0.9	3.3±0.6	-37.3±4.4	8.5±0.3
	PnTx4(5-5)	-23.9±1.0	4.0±0.9	-36.7±4.1	8.9±1.0
Nav1.3	Control	-19.7±0.6	3.8±0.2	-24.8±1.5	9.2±0.5
	PnTx4(5-5)	-14.1±0.4*	6.0±0.2*	-30.3±2.2*	11.5±0.5*
Nav1.4	Control	-26.5±1.7	6.9±0.7	-56.0±0.7	8.2±0.3
	PnTx4(5-5)	-26.7±2.4	7.5±0.8*	-55.0±0.9	8.1±0.5
Nav1.5	Control	-33.5±1.1	5.2±0.4	-58.2±0.6	7.8±0.1
	PnTx4(5-5)	-30.3±0.9*	6.5±0.3*	-57.5±1.2	6.5±0.3
Nav1.6	Control	-21.1±1.8	6.1±0.4	-53.2±0.4	5.8±0.1
	PnTx4(5-5)	-15.9±1.4	7.3±0.4*	-54.7±1.5	7.6±0.1*

Tabela 5 - Parâmetros calculados a partir das curvas de ativação e de inativação para as isoformas de canais para sódio de mamífero testadas, no controle e na presença da toxina rPnTx4(5-5).

Os dados estão representados como média \pm SEM de três experimentos independentes, sendo $p < 0,05^*$.

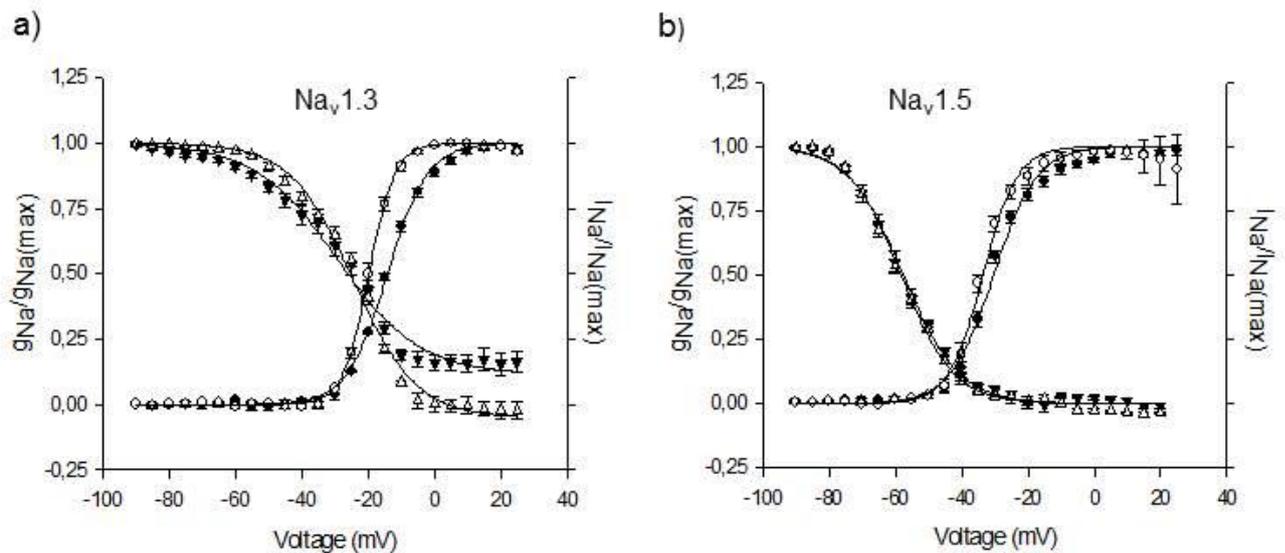


Figura 33- Efeitos de rPnTx4(5-5) na cinética de ativação e de inativação dos canais Na_v 1.3 e 1.5.

Curvas de ativação e do estado estacionário da inativação no controle (\circ e Δ , respectivamente) e na presença de $1 \mu\text{M}$ de rPnTx4(5-5) (\bullet and \blacktriangledown , respectivamente) para Nav 1.3 (a) and Nav 1.5 (b), ajustadas pela equação de Boltzmann.

5.5.3 Comparação dos efeitos das toxinas recombinante e nativa nos canais Na_v 1.3 e Na_v 1.5

Para confirmar se os efeitos da toxina recombinante nos canais para sódio de mamífero seriam realmente semelhantes ao da toxina nativa, comparamos os efeitos dessas toxinas nos canais Na_v 1.3 e 1.5. As figuras 34a e 34b mostram os registros representativos de correntes desses canais antes e após a adição de $1 \mu\text{M}$ da toxina PnTx4(5-5) nativa e recombinante. Pelos registros podemos observar que o efeito das duas toxinas foi bem semelhante. Além disso, a diferença da porcentagem de inibição média entre as toxinas nativa e recombinante em cada canal (Figura 34c) não foi significativa ($p > 0,05$) indicando que os efeitos da toxina recombinante sobre esses canais para sódio são comparáveis aos da toxina nativa.

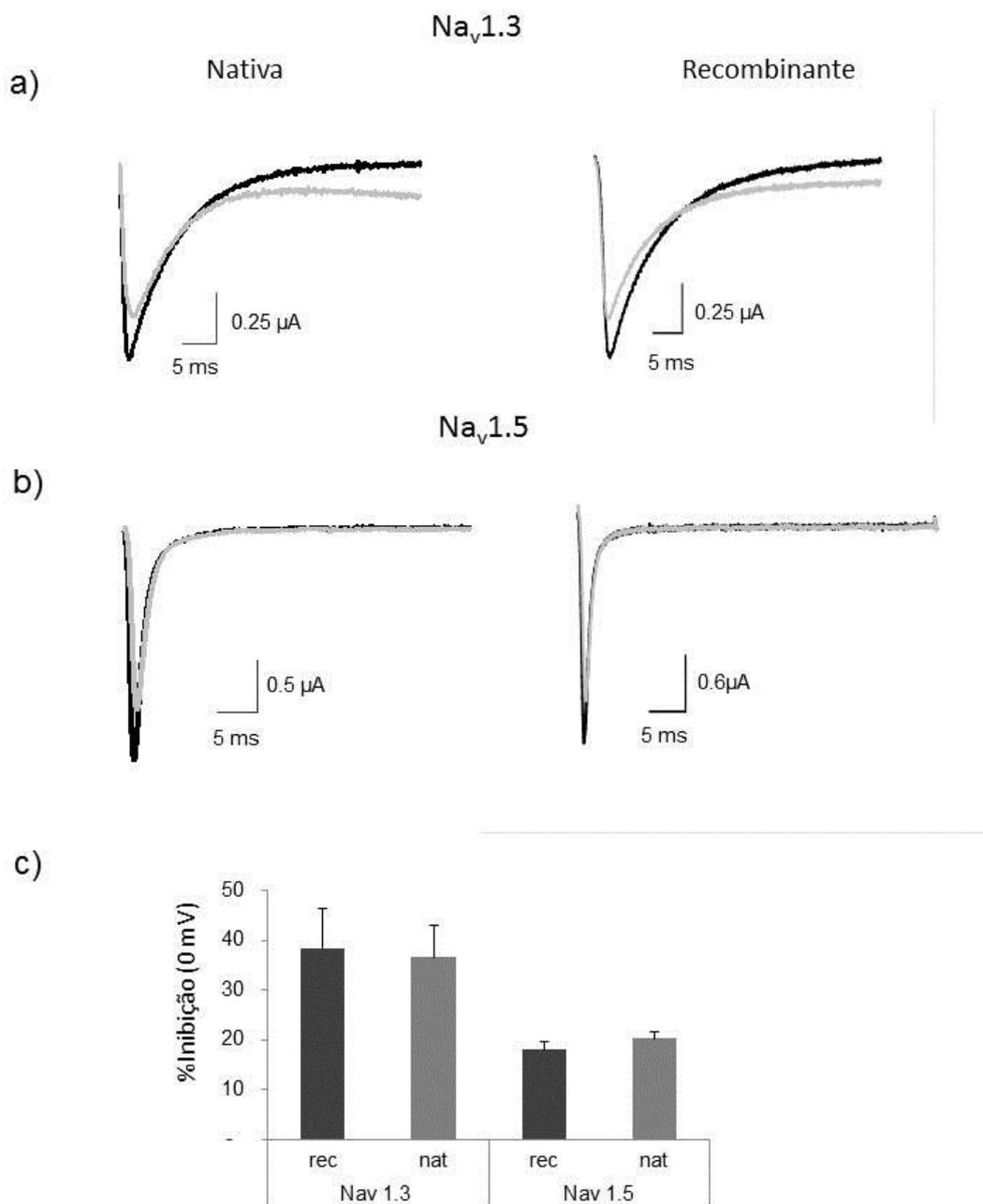


Figura 34 - Comparação dos efeitos de PnTx5(5-5) nativa e recombinante, nos canais Nav1.3 e Nav1.5.

Os traços são representativos da corrente celular de cada isoforma no controle (preto) e na presença de 1 μ M PnTx5(5-5) nativa ou recombinante (cinza) a) Efeito da toxina nativa (lado esquerdo) e recombinante (lado direito) em Nav1.3. b) Efeito da toxina nativa (lado esquerdo) e recombinante (lado direito) em Nav1.5. c) Porcentagem média de inibição das toxinas nativa e recombinante nos canais Nav1.3 e Nav1.5.

5.5.4 Ação dos mutantes da toxina no canal Na_vBg

Devido a menor ação da toxina PnTx4(5-5) nas isoformas de canais para sódio de mamífero e da pequena disponibilidade de material das toxinas mutantes, optamos por testar os mutantes Y24A, R32A e F36A apenas no canal para sódio de inseto (NavBg).

Os mutantes Y24A e F36A não apresentaram nenhum efeito no registro da corrente celular total neste canal, mesmo na concentração de 5 μM (resultados não mostrados). O mutante R32A na concentração de 1 μM teve uma ação menor no canal (Figura 35b) comparado à toxina recombinante original (Figura 35a), principalmente em relação ao aumento da amplitude da corrente para sódio. Concentrações de até 5 μM não alteraram o efeito do mutante nesse canal, pois não houve diferença significativa entre as razões de I_{ss}/I_{pico} nas concentrações de 1 e de 5 μM de toxina recombinante R32A.

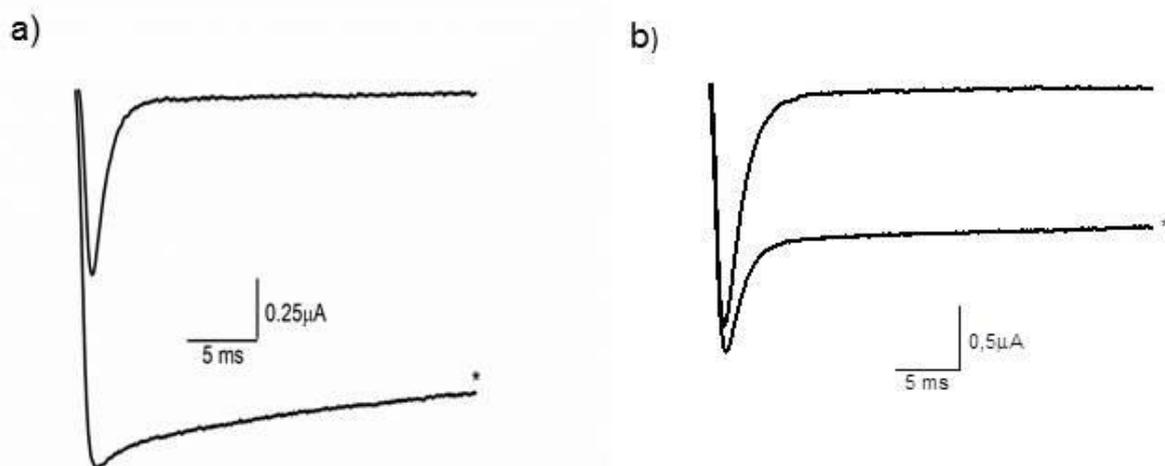


Figura 35 - Comparação dos efeitos de rPnTx5(5-5) e do mutante R32A, no canal para sódio de inseto, NavBg .

a) Corrente celular total no controle e após adição de 1 μM de rPnTx5(5-5) (*) b) Corrente celular total no controle e após adição de 1 μM do mutante R32A de rPnTx5(5-5) (*).

6 Discussão

Durante milhões de anos de evolução, as alterações da composição dos venenos de aranhas levaram-nas a adaptar-se a diferentes ambientes e permitiu que essas se tornassem predadoras generalistas (Chen et al, 2008). Os venenos de aranhas contêm uma grande diversidade de toxinas, com ação em diferentes alvos no sistema fisiológico de vertebrados e de invertebrados, constituindo assim uma rica fonte de moléculas com potencial farmacológico.

Um dos maiores obstáculos para o estudo de toxinas de aranhas é a dificuldade de obtenção dessas moléculas. Além do trabalho para a coleta em campo e a dificuldade de reprodução desses animais em cativeiro, cada aranha produz pequena quantidade de veneno. Por exemplo, de cada aranha da espécie *P. nigriventer*, obtém-se apenas cerca de 1 mg de proteína total por cada extração de veneno. Assim, para se conseguir quantidades razoáveis de toxinas para ensaios experimentais é necessária a captura e extração de veneno de centenas de aranhas. Além disso, a partir do veneno bruto, são necessárias várias etapas de cromatografia para a purificação das toxinas de interesse, o que resulta em perdas significativas durante o processo. Embora algumas destas toxinas possam ser sintetizadas quimicamente, existe uma limitação do número de resíduos a serem incorporados, além de outras dificuldades, como por exemplo, a correta formação das pontes dissulfeto, a formação de agregados de aminoácidos hidrofóbicos e a complexidade de incorporação de alguns resíduos como metionina, triptofano e cisteína (Kuliopolos & Walsh, 1994, Dobeli et al., 1998).

Assim, a produção de toxinas recombinantes vem se tornando uma importante ferramenta para superar o problema de obtenção dessas moléculas, sem depender da disponibilidade do veneno bruto e de laboriosas técnicas de purificação (Quintero-Hernandez et al., 2011, Meng et al., 2011, Bende et. Al, 2013, Sermadiras et al, 2013, Zang et al., 2015).

Nesse trabalho, a toxina PnTx4(5-5) da aranha *Phoneutria nigiventer* e três diferentes mutantes dessa molécula, foram expressos de forma

recombinante em *E. coli*. O sistema de expressão em *E. coli* é geralmente o mais utilizado para produção de proteínas recombinantes, devido a disponibilidade de linhagens bem caracterizadas e estabelecidas, além do rápido crescimento bacteriano, bem como a necessidade de um meio de cultivo simples e de baixo custo. Porém, o principal problema para a produção de toxinas recombinantes de aranha em bactéria, é que essas toxinas apresentam várias pontes dissulfeto que normalmente não são formadas no citoplasma bacteriano. Dessa forma, para a expressão da toxina PnTx4(-5-5) recombinante optamos por utilizar a linhagem *E. coli* BL21 Rosetta-gami (DE3) PlysS. Essa linhagem possui uma deficiência de produção da enzima tioreductase (*trxB*), permitindo a formação de pontes dissulfeto no citoplasma e aumentando consideravelmente o rendimento de toxinas corretamente enoveladas (Bessete et al., 1999).

Além disso, a expressão em *E. coli* frequentemente gera proteínas na forma insolúvel, formando os chamados “corpos de inclusão”. Isto ocorre devido aos altos níveis de expressão da proteína heteróloga, que podem se agregar formando um *pool* de proteínas não enoveladas (Reddi et al., 2002). Uma estratégia para aumentar a solubilidade da proteína e evitar a formação de corpos de inclusão é fusionar a mesma com outra proteína altamente solúvel, como Thioredoxina ou GST (La Vallie et al., 1995). Nesse trabalho, foi utilizado o vetor pET32c que expressa proteínas recombinantes em fusão com a tioredoxina. Essa estratégia demonstrou ser eficiente, visto que a toxina recombinante foi expressa em sua maior parte em forma solúvel (Figura 20), evitando-se assim, a necessidade de utilização de agentes desnaturantes e etapas posteriores de reenovelamento, que poderiam interferir na sua atividade.

Após a expressão da proteína em fusão, é necessária a utilização de uma protease para separação da proteína alvo da tioredoxina. Para a expressão da toxina PnTx4(5-5), o vetor pET32c foi modificado, substituindo-se a sequência codificante do sítio de clivagem da enzima enteroquinase (EK) pelo sítio da enzima TEV protease (Figura 15). Essa estratégia foi utilizada, pois verificou-se que, na expressão da toxina PnTx2-6 com vetor pET32c obteve-se um baixo rendimento de clivagem com a enzima EK (Torres, 2011),

além de se observar também clivagem inespecífica (Torres, 2011, Chen et al., 2013). Além disso, a enzima EK apresenta um alto custo, comparado à TEV protease, que foi produzida de forma recombinante, em nosso laboratório.

Após a clivagem da proteína em fusão pela enzima TEV protease e liberação da toxina rPnTx4(5-5), esta foi purificada por fase reversa. A análise por espectrometria de massas (figura 22) revelou que o peso molecular observado (5230,3) foi compatível com a massa teórica calculada para a toxina recombinante (5231,8) e também consistente com a formação de cinco pontes dissulfeto. O espectro de dicroísmo circular (CD), da toxina recombinante também foi bem semelhante ao da toxina nativa (figura 23), indicando que estas possuem praticamente a mesma estrutura secundária. Pela análise de CD foi observado que estas são compostas principalmente por folhas-beta apresentando um conteúdo de 39,9% na toxina recombinante e 41,1% na nativa. vvvvv

vvEnsaio biológico com rPnTx4(5-5) mostraram que essa tem características farmacológicas muito semelhantes às da toxina nativa. Foi observado que a toxina recombinante induziu em moscas, os mesmos sintomas que a toxina nativa (tabela 3). Além disso, rPnTx4(5-5) teve efeito similar ao da toxina nativa, no limiar antinociceptivo em ratos, quando se testou a dose de 2 µg. No entanto, não se pode afirmar que esse efeito é proporcional à dose, devido ao grande erro padrão encontrado quando se testou a dose de 1 µg. Assim, será necessário um maior número de ensaios (n) para se obter resultados conclusivos.

A toxina recombinante foi então testada em diferentes isoformas de canais para sódio de mamíferos ($Na_v1.2-1.6$) e também no canal para sódio da barata *Blattella germanica* (Na_vBg), todos expressos em ovócitos da rã *Xenopus laevis*. O efeito mais expressivo foi observado no canal de inseto, onde a toxina agiu inibindo a inativação rápida do canal, resultando em um aumento de $105,3 \pm 15,6$ % na amplitude do pico da corrente de sódio (figura 28). Essa ação explica os efeitos excitatórios produzidos pela toxina em inseto (tabela 3), que são consequência direta da ativação persistente do canal.

Normalmente, toxinas que causam retardo ou bloqueio da inativação, como as toxinas tipo α de peçonhas de escorpião, ligam-se ao sítio 3 do canal para sódio, que está localizado no “loop” entre os segmentos S3-S4 do domínio IV. A ligação dessas toxinas nesse local impede o movimento do segmento S4-DIV, inibindo-se as modificações conformacionais necessárias para ativação rápida do canal (Rogers et al, 1996, Cha et al. 1999, Sheets et al., 1999, Campos et al., 2008, Wang et al 2011, Capes et al., 2013).

O efeito de rPnTx4(5-5) no canal para sódio de inseto foi similar ao efeito das α -inseto toxinas de escorpião (Eitan et al.1990, Gordon et al, 1998) e também de outras toxinas de aranhas (Magi 4, Corzo et al., 2003; δ -atracotoxins, Nicholson et al., 2004, De Lima et al., 2002), algumas denominadas toxinas do tipo α -like. Segundo Martin-Euclaire e colaboradores (2014), as α -inseto toxinas não são tóxicas para mamíferos, mesmo em altas concentrações (Gordon et al., 1996; Cohen et al., 2006), enquanto que, as α -like toxinas são altamente tóxicas para insetos e mamíferos, quando injetadas tanto pela via intracerebral, quanto subcutânea (por, ex. Lqh III de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* e BmK M1 de *Buthus martensii* Karsch) (Krimm et al., 1999; Goudet et al., 2001).

As α -like toxinas Bom III e IV (de *Buthus occitanus mardochei*) retardam a inativação de canais para sódio de insetos, ocupando um sítio que se sobrepõe, parcialmente, ao sítio 3 (Gordon et al., 1996). De Lima e colaboradores (2002) demonstraram que a toxina PnTx4(6-1) compete com a toxina 125 I-Bom IV na ligação em uma preparação sinaptosomal de corda nervosa de barata (*Periplaneta americana*), além de retardar a inativação da corrente de sódio em axônio isolado deste mesmo inseto, de forma semelhante à Bom-IV. Além disso, recentemente foi mostrado pelo nosso grupo, que a toxina β/δ -PrIT1 da aranha *Phoneutria reidy*, que possui 77% de similaridade com PnTx4(5-5), também competiu com 125 I-Bom IV na mesma preparação sinaptosomal de corda nervosa de barata (Oliveira et al., 2015). Devido a alta similaridade nas sequencias de aminoácidos dessas toxinas com a sequência de PnTx4(5-5) é provável que todas elas ocupem o mesmo macrosítio no canal para sódio de inseto. No entanto, PnTx4(6-1), β/δ -PrIT1 e PnTx4(5-5) são,

aparentemente, não tóxicas para mamífero e parecem ser uma variante das α -like toxinas.

Enquanto que PnTx4(6-1) não demonstrou atividade quando testada nos subtipos de canais para sódio rBIIA de cérebro (Nav1.2) e rSkM1 de músculo esquelético (Nav1.4) de ratos, também expressos em ovócitos de *Xenopus* (De Lima et al, 2002), observou-se que rPnTx4(5-5) causou inibição em todos os subtipos de canais para sódio de mamífero testados (figura 31). Para os canais $Na_v1.3$ e $Na_v1.5$ foi detectada um pequeno, mas significativo ($p < 0,05$), deslocamento da voltagem de 50% da ativação máxima (V_g), para potenciais mais despolarizados (figura 33, tabela 5). Esse efeito também já havia sido observado para as toxinas ProTx-I e ProTx-II da aranha carangueira *Thrixopelma pruriens* (Middleton et al., 2002 Priest et al., 2007; Smith et al., 2007), bem como para outras toxinas de caranguejeiras como por exemplo: *Jingzhaotoxin-III* (Xiao et al, 2004), PaurTx3, CcoTx1 and CcoTx2, (Bosmans et al., 2006). Recentemente, Berkut et al. (2015) também descreveram um efeito semelhante para a forma recombinante da toxina Hm-3 da aranha *Heriades melloteei*. Estudos de mutação sítio dirigida em resíduos específicos de aminoácidos, em canais para sódio, indicaram que algumas dessas toxinas modificadoras de *gating* podem interagir com o sítio 4 destes canais (Xiao et al, 2008, 2010).

Toxinas clássicas do tipo β , como CSS-IV do veneno do escorpião *Centruroides suffusus suffusus*, ligam-se ao sítio 4 dos canais para sódio e deslocam o potencial de ativação para potenciais hiperpolarizados, por manter o segmento S4 do domínio II numa posição ativada (Cèstele et al., 1998). No entanto, acredita-se que essa nova classe de toxinas descritas anteriormente, que também se ligam ao sítio 4, atuam na alça extracelular entre os segmentos S3 e S4 do domínio II, mantendo o sensor de voltagem numa posição fechada ou voltado “para dentro” do canal, o que dificulta sua abertura e desloca a ativação para potenciais mais despolarizados (Sokolov et al., 2008; Xiao et al, 2008, Rong et al, 2011).

Foi observado que rPnTx4(5-5) também causou um pequeno retardo na inativação nos canais Nav1.3 e Nav1.6 (figura 31). O efeito duplo de

modulação pela toxina rPnTx4(5-5), tanto na ativação quanto na inativação, em isoformas específicas de canais para sódio de mamífero, foi também observado para outras toxinas, como as β/δ -agatoxins, da aranha *Agelena orientalis* (Billen et al., 2010) e para a toxina ProTx-II. Foi demonstrado que ProTx-II pode interagir com sensores de voltagem de três domínios (DI, DII, e DIV) em Nav1.2a (Bosmans et al. 2008) e de dois domínios (DII and DIV) em Nav1.7 (Xiao et al, 2010). A toxina JZTX-XI, da aranha caranguejeira *Chilobrachys jingzhao*, quando testada em Nav 1.5, também inibiu sua ativação, causando um deslocamento do potencial de ativação para potenciais despolarizados, além de retardar a inativação do canal. Foi sugerido que JZTX-XI poderia interagir com múltiplos domínios de $Na_v1.5$, incluindo os sensores de voltagem de DII e DIV (Tang et al, 2014).

No entanto, o efeito da rPnTx4(5-5) sobre a cinética de inativação dos canais para sódio de mamífero, foi discreto quando comparado ao efeito em canais de inseto (figura 28), ou ao efeito das toxinas clássicas do tipo α , como AaHII do veneno do escorpião *Androctonus australis Hector*, usadas para caracterizar o sítio 3 do canal de sódio de mamífero (Jover et al, 1978). Dessa forma, é possível que rPnTx4(5-5) não se ligue ao sítio 3 nas isoformas de canais para sódio de mamífero, mas sim ao sítio 4 e impeça que DIIS4 se mova rapidamente no início do pulso teste, aumentando a probabilidade dos canais se abrirem ao longo deste pulso, ao invés de abrirem no começo. Isto levaria a uma diminuição do pico da corrente e a uma redução da inativação aparente da corrente macroscópica, sem afetar o processo de inativação rápida. Para verificar essa hipótese, seriam necessários experimentos de canal unitário. Além disso, a visão tradicional de que apenas a ligação ao sítio 3 está relacionada à inibição da inativação, vem sendo questionada. Por exemplo, foi demonstrado que as δ -palutoxins da aranha *Paracoelotes luctuosus*, ligam-se ao sítio 4, embora exerçam ações típicas de neurotoxinas do sítio 3 (Corzo et al., 2005; Ferrat et al., 2005). Dessa forma, para elucidar o sítio, ou os sítios de ligação de rPnTx4(5-5) tanto em canais para sódio de inseto, quanto de mamífero, serão necessários experimentos adicionais, como de *binding*, por exemplo.

Para comparar os resultados obtidos nos ensaios eletrofisiológicos com a toxina recombinante, fizemos um teste com a toxina nativa nos canais $Na_v1.3$ e 1.5 . Devido a pouca disponibilidade da toxina nativa, não foi possível testá-la nas demais isoformas de canais para sódio, bem como analisar seus efeitos na dependência de voltagem da ativação ou inativação destes canais. Apesar disso, pelos registros representativos, pudemos observar que, a ação das toxinas nativa e recombinante, sobre os canais $Nav1.3$ e 1.5 , é bem semelhante (figura 34). Não houve diferença significativa entre as médias da porcentagem de inibição destas toxinas sobre os referidos canais, portanto, os efeitos da toxina recombinante sobre os canais para sódio de mamífero podem ser comparados ao da toxina nativa.

Apesar de várias toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* terem sido caracterizadas quanto às suas ações em canais iônicos (para revisão veja De Lima et al, 2015), pouco ainda se sabe sobre suas relações de estrutura e função. Isto se deve ao fato dessas toxinas apresentarem uma grande variedade de sequências, possuindo pouca similaridade com toxinas de outras aranhas, com estrutura já conhecida. Isto torna difícil a construção de modelos tridimensionais comparativos a partir de outras toxinas, que poderiam revelar quais aminoácidos seriam fundamentais para suas ações sobre os canais iônicos.

Vários estudos sobre a base molecular da afinidade de neurotoxinas em canais para sódio têm revelado que resíduos negativos na superfície do canal, interagem com regiões de resíduos positivos e resíduos apolares dessas toxinas, *via* interações eletrostáticas, ou pontes de hidrogênio (Wang et al., 2011c, Cestèle et al., 2006; Bosmans et al., 2010). Por exemplo, foi demonstrado que a superfície contendo resíduos hidrofóbicos e catiônicos da toxina ProTx-II é essencial para a interação com os canais para sódio (Smith et al., 2007). Estudos de mutação sítio dirigida também revelaram que os resíduos Lys 27 e Arg 29 estão envolvidos na interação entre algumas toxinas relacionadas de caranguejeiras (HNTX-V, HWTX-IV, PaurTx3, Ccotx1 e Ccotx2) e resíduos acídicos do sensor de voltagem do domínio II (Liu et al, 2004, Deng et al, 2013)

Trabalhos sobre a ação das toxinas PnTx1 e PnTx2-6, da aranha *Phoneutria nigriventer*, em canais para sódio, também sugerem que aminoácidos positivos e hidrofóbicos possam ser responsáveis pela interação das mesmas, com o canal. Ao comparar a sequência de aminoácidos da toxina PnTx1 com algumas μ -conotoxinas, Martin-Moutot e colaboradores (2006), sugeriram que os resíduos Trp33, Arg35 e Lys39 poderiam estar relacionados com a inibição do canal. Matavel e colaboradores (2009) também identificaram regiões hidrofóbicas rodeadas por cargas positivas semelhantes, ao comparar as superfícies preditas de PnTx2-5 e PnTx2-6 com as a toxinas do tipo α , AaHII e BmKM1. Os modelos tridimensionais mostraram que os resíduos aromáticos Phe36, Trp40 e Tyr41 estariam expostos ao solvente, rodeados pelos resíduos positivos Arg20, Arg32, Lys42, Lys47 e Lys48. Foi sugerido que essa superfície bioativa estaria envolvida na afinidade de PnTx2-6 pelos canais para sódio. Além disso, foi demonstrado que PnTx2-6 apresenta uma afinidade seis vezes maior para os canais para sódio, quando comparada à PnTx2-5. Como essas duas toxinas diferem em apenas cinco aminoácidos, foi sugerido que a maior afinidade de PnTx2-6 se deve à presença de alguns de aminoácidos apolares adicionais, ausentes na PnTx2-5.

Assim, baseado em análise bioinformática para predição de resíduos mais expostos e estudos sobre relação de estrutura e função em toxinas, identificamos alguns aminoácidos de PnTx4(5-5) que poderiam fazer parte de sua superfície bioativa e estar relacionados com sua ação em canais para sódio. Esses aminoácidos (Tyr24, Trp25, Lys30, Arg32 e Phe36) foram substituídos por alanina através de mutação sítio dirigida (Figura 8). A alanina é geralmente escolhida por ser um aminoácido neutro e com uma cadeia lateral que teoricamente se acomodaria bem dentro da estrutura da proteína.

Após a confirmação da substituição dos resíduos pelo sequenciamento, os mutantes foram transformados em células Rosetta-gami (DE3)PlysS e sua expressão foi induzida da mesma forma que para rPnTx4(5-5). Após as etapas de purificação e clivagem com TEV protease, devido a problemas de precipitação, estes apresentaram um rendimento mais baixo quando comparado a rPnTx4(5-5) e foi possível detectar, por espectrometria de massas, apenas os mutantes Tyr24, Arg32 e Phe36 (figuras 24-26). Além

disso, em virtude da pequena quantidade de material obtida desses mutantes, não foi possível caracterizá-los por dicroísmo circular e determinar se a alteração dos aminoácidos influenciou suas estruturas tridimensionais. A alteração da estrutura poderia explicar a precipitação das toxinas, após a clivagem com TEV protease. Alguns trabalhos também reportaram dificuldade na expressão e no baixo rendimento de alguns mutantes, quando comparados à toxina original, principalmente daqueles em que foram substituídos resíduos diretamente envolvidos na estrutura tridimensional da toxina (Sun et al, 2003, Liu et al, 2005, Cui et al, 2010).

Assim, também devido à pequena quantidade de amostra disponível, só foi possível testar os mutantes no canal para sódio de barata (Na_vBg). Foi observado que os mutantes Y24A e F36A, mesmo em concentrações de até 5 μM , não apresentaram nenhuma atividade sobre este canal. Estudos de mutação sítio dirigida, com diversas toxinas, têm demonstrado que resíduos aromáticos estão quase sempre envolvidos na estrutura/função da toxina. Cui e colaboradores (2010), reportaram que os resíduos Tyr38, Phe39 e Trp40 da toxina BmKAS do escorpião *Buthus martensii*, parecem estar envolvidos na estabilidade estrutural, sendo essenciais para o correto enovelamento da toxina, pois o rendimento desses mutantes após expressão foi bem menor quando comparados aos outros mutantes. Nesse mesmo trabalho, o ensaio biológico de atividade antinociceptiva também confirmou que a atividade da toxina foi dramaticamente reduzida após a substituição desses resíduos por glicina. Foi sugerido que isso pode ser devido à destruição da face hidrofóbica conservada desses resíduos aromáticos, que estariam envolvidos, tanto na função farmacológica, quanto na estabilidade estrutural (Cui et al, 2010).

Sun e colaboradores (2003), observaram que a toxicidade dos mutantes W38G e Y42G da toxina BMKM1 foi drasticamente reduzida e que estes foram os menos eficazes em retardar a inativação do canal para sódio. No entanto, os espectros de CD destes dois mutantes mostraram pequena alteração quando comparados a BMKM1 nativa. Foi sugerido que estes resíduos aromáticos conservados estariam envolvidos funcionalmente na ação da toxina. Além disso, o mutante W47G não foi expresso e o mutante Y5G foi expresso de forma instável, indicando que estes dois resíduos seriam

essenciais para a estrutura da toxina. De forma interessante, os mutantes com substituição para fenilalanina Y5F, Y35F e W37F foram expressos de forma comparável à rBMKM1. A caracterização eletrofisiológica mostrou que a atividade de todos os mutantes para fenilalanina (embora em diferentes graus) foram significativamente maiores do que a dos mutantes que perderam suas cadeias laterais aromáticas, por substituição por glicina, exceto Y5F que também mostrou atividade bem reduzida. Assim, por comparação de mutantes de glicina e fenilalanina de resíduos aromáticos conservados em BMK M1, foi demonstrado que as cadeias laterais aromáticas de Trp47 e Tyr35 são indispensáveis para manutenção da estrutura e função farmacológica da toxina. As estruturas tridimensionais de BMKM1 e de outras toxinas de escorpião, revelaram que Tyr5, Tyr35, Trp47 estão localizados nas fitas β 1, β 2 e β 3 respectivamente, da folha β -tripla. Assim, é plausível inferir que, devido à perda das interações entre estes anéis aromáticos, a folha- β pode ter sido desenovelada. O único aminoácido que parece ser insubstituível, tanto para a manutenção da estrutura quanto da atividade biológica, é Tyr5 (Sun et al., 2003). Wang e colaboradores (2003) também observaram que a mutação Y5G causou uma diminuição dramática da atividade da toxina BMKM1 em camundongos e da sua afinidade de ligação ao canal para sódio. Ao se inspecionar a estrutura tridimensional de BMKM1 foi verificado a existência de uma ponte de hidrogenio entre a hidroxila de Tyr5 e a cadeia lateral de Lys58/Arg58, que pode ser encontrada em todas as toxinas de cadeias longas de peçonhas de escorpiões. Assim, um anel aromático sem o grupo OH poderia interromper o arranjo terciário sutil entre a porção N-terminal e o segmento C-terminal, o que, por sua vez, afetaria a função farmacológica. Por isso, a importância de Tyr5 não estaria somente no anel aromático, mas também no grupo funcional hidroxila, sendo assim, altamente conservada entre as α -toxinas de peçonhas de escorpião.

Dessa forma, pode ser sugerido que os aminoácidos Tyr24 e Phe36 também tenham alguma função estrutural/funcional importante para a toxina PnTx4(5-5) e, por isso, não apresentaram nenhum efeito no canal para sódio de inseto. No entanto, como não foi determinado se houve alteração do espectro de CD, não é possível afirmar se essa perda de atividade deve-se a

uma alteração drástica da estrutura da toxina, ou se esses resíduos estariam relacionados à afinidade da toxina ao canal para sódio, mesmo em caso de conservação da estrutura.

Já o mutante R32A, na concentração de 1 μ M, apresentou uma diminuição da inibição da inativação no canal de barata, quando comparado à toxina com a sequência original (figura 35). Isso poderia indicar o possível envolvimento desse aminoácido na interação com o canal para sódio de inseto. Não se pode descartar também que, uma única mutação possa levar a uma desorganização da estrutura da toxina impedindo-a de se ligar com alta afinidade ao canal. No entanto, estas hipóteses só poderão ser melhor discutidas, após análise do espectro de CD desse mutante.

Vários estudos de mutação sítio dirigida corroboram a importância de cargas positivas em toxinas, para a afinidade pelo canal para sódio. Por exemplo, foi verificado que os mutantes K8A e R18A da toxina Lqh α IT apresentaram uma diminuição significativa de toxicidade para inseto e da afinidade pelo canal para sódio de barata. Como nem o espectro de CD nem o potencial eletrostático desses mutantes se alteraram drasticamente, foi sugerido que Lys8 e Arg18 tenham uma interação eletrostática direta com o sítio no receptor (Zilberberg et al., 1997). Ao estudar, por mutação sítio dirigida, a interação da toxina BmKM1 com canais para sódio de mamífero e de inseto, Wang e colaboradores (2003), determinaram que a substituição dos resíduos Lys8, Lys62 e His64 por alanina, diminuiu drasticamente, a toxicidade dessa toxina tanto para camundongos, quanto para insetos, mas tais substituições não causaram alterações significativas no espectro de CD. Nesse mesmo estudo, também foi reportada uma diminuição drástica de atividade em insetos no mutante R58A. O resíduo 58 é conservado como arginina ou lisina em várias toxinas do tipo α de escorpião e tem sido demonstrado ser essencial para a atividade de vários subgrupos de toxinas do tipo α (Darbon et al, 1983). Como foi observado alteração do espectro de CD do mutante R58A, foi sugerido que a diminuição da atividade se deve à mudança conformacional causada pela alteração da cadeia lateral. Em outro trabalho, foi verificado que os mutantes H28D e K32A da toxina HNTX-IV tiveram uma redução de afinidade de 17 e 170 vezes, respectivamente, em canais para sódio TTX-S

(sensíveis à TTX). No entanto, o espectro de CD indicou que estas substituições não afetaram a estrutura da toxina. Foi sugerido que a região positivamente carregada contendo His28 e Lys32 possa ser o sítio de ligação para a interação de HNTX-IV com os canais para sódio (Liu et al, 2012)

De forma interessante, Liu e colaboradores (2005), em outro estudo de mutação sítio dirigida também com a toxina BmKM1, reportaram que a substituição de alguns resíduos pode alterar até mesmo a especificidade da toxina. Por exemplo, a substituição da Gly43, altamente conservada, por alanina, torna a toxina totalmente inseto-específica (sem atividade no camundongo), embora menos potente que BmKM1 selvagem. Ao contrário, foi observado que a substituição H10Y torna a toxina altamente específica para mamífero, sem alteração do espectro de CD desses mutantes, em relação à toxina nativa. Dessa forma, foi sugerido que esses resíduos estariam envolvidos na especificidade da toxina para canais de mamífero ou de inseto.

Assim, de forma geral, os estudos de mutação sítio dirigida vem revelando que os resíduos importantes para a atividade biológica podem tanto ter um papel direto no reconhecimento do receptor, ou serem importantes na conformação estrutural da toxina, ou ambos (Wang et al, 2003).

Outro objetivo desse trabalho foi investigar uma possível relação entre a atividade antinociceptiva de PnTx4(5-5) e a ação em canais para sódio de mamífero. A busca por novos inibidores seletivos para determinados canais para sódio é de grande interesse para o tratamento da dor e vem sendo alvo de diversas pesquisas (Momim et al, 2008). Os quatro subtipos de canais para sódio que são de especial interesse, devido à sua distribuição restrita em nociceptores, são os canais sensíveis à tetrodotoxina (TTX-S), Na_v1.3 e Na_v1.7 e os canais resistentes à tetrodotoxina (TTX-R), Na_v1.8 e Na_v1.9. Em modelos animais de dor, a alteração de níveis de expressão e de propriedades destes subtipos de canais, indica que eles podem contribuir para uma alteração dos limiares de dor (Berta et al, 2008).

O canal Na_v1.3 é expresso em níveis mais elevados durante o desenvolvimento embrionário que em neurônios adultos. No entanto, estudos demonstram que sua expressão em neurônios sensoriais pode aumentar em decorrência de axotomia e inflamação (Waxman et al, 1994, Dib-Hajj et al,

1999). Assim, a re-expressão de Nav1.3, juntamente com o sua rápida recuperação da inativação, sugere que ele poderia desempenhar um papel na sustentação de rajadas de alta frequência de potenciais de ação, em condições de dor crônica. Em um estudo utilizando camundongos com expressão atenuada de Nav1.3, foi observada uma diminuição do comportamento de dor, associada tanto com lesão medular, como com a constrição crônica de nervo (Hains et al, 2004). Além disso, foi demonstrado que canais de sódio TTX-S desempenham um papel na patogênese específica em condições da dor neuropática, embora o papel de Nav1.3 como um dos principais contribuintes permaneça incerto (Nieto et al, 2008).

Nav 1.7 é um dos canais para sódio sensíveis à TTX mais altamente expresso em células DRG e, acredita-se, ser um importante contribuinte para a sinalização em neurônios nociceptivos (Krafte and Bannon, 2008). Certos distúrbios hereditários de dor, em humanos, foram relacionados a mutações no gene que codifica Nav1.7. Algumas mutações dominantes levam a um aumento da dor, por exemplo, na condição inflamatória crônica eritemalgia (Yang et al, 2004) e na desordem paroxística de dor extrema (*Paroxysmal extreme pain disorder* – PEPD) (Fertleman et al, 2006); ao passo que condições recessivas mais raras podem causar uma incapacidade de sentir dor (Cox et al, 2006). Na condição PEPD, onde a estimulação mecânica evoca dor excruciante, foram identificadas oito mutações diferentes em Nav1.7. A caracterização funcional de três destas mutações mostra a atenuação da inativação rápida de Nav1.7, resultando em correntes de sódio persistentes. Tal déficit na inativação pode promover um potencial de ação prolongado e disparo repetitivo em resposta a um estímulo. Além disso, três estudos independentes dos membros de uma família que exibem incapacidade congênita de sentir dor relacionaram o fenótipo da doença a mutações *nonsense* em Nav1.7 (Cox et al 2006, Ahmad et al 2007, Goldberg et al, 2007). Assim, mutações dominantes de ganho de função nos casos de eritemalgia e PEPD e o fenótipo livre de dor, associado com mutações recessivas de perda de função, demonstram que Nav1.7 é um componente crucial no processamento nociceptivo periférico, em seres humanos.

O subtipo Nav_v1.8 é notavelmente expresso, de modo específico, em neurônios sensoriais nociceptivos e atua como um dos principais contribuintes para o disparo de potenciais de ação (Renganathan et al, 2001). Foi também demonstrado um papel essencial de Nav_v1.8 em manter a excitabilidade dos nociceptores, em baixas temperaturas (Zimmermann et al, 2007). Estudos com oligonucleotídeos *antisense* mostraram um importante papel dos canais Nav_v1.8 na dor inflamatória (Khasar et al, 1998) e no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (Josh et al, 2006, Lai et al, 2002).

Nav_v1.9 é expresso em nociceptores e neurônios entéricos ativados em potenciais de membrana mais negativos (Dib-Hajj et al, 2002). Devido à dificuldade de expressar esse subtipo em sistemas heterólogos, seu papel em neurônios sensoriais tem sido estudado em neurônios sensoriais de camundongos *knockout*. Camundongos *knockout* para Nav_v1.9 têm hiperalgesia inflamatória induzida por mediadores inflamatórios, muito reduzida ou ausente (Priest et al, 2005, Amaya et al, 2006). Assim, Nav_v1.9 constitui um alvo atraente para o desenvolvimento de analgésicos para dor inflamatória.

A toxina rPnTx4(5-5) foi capaz de inibir a corrente em todas as isoformas de canais para sódio de mamíferos testadas (Nav_v1.2, 1.3, 1.4, 1.5 e 1.6). No entanto, dos canais envolvidos diretamente com a nocicepção, o único testado foi Nav_v1.3, onde a toxina foi capaz de inibir 38% da corrente nesse canal (Figura 31). Como mencionado anteriormente, o canal Nav_v1.3 estaria mais envolvido com os mecanismos de dor neuropática e inflamatória, sendo demonstrado uma elevação de sua expressão nesses casos. Assim, pode ser que esse canal esteja envolvido na antinocicepção causada por PnTx4(5-5) relacionada a lesão neuronal e agentes inflamatórios, principalmente quando injetada diretamente no SNC, pela via intratecal.

Figueiredo e colaboradores (2001), demonstraram que PnTx4(5-5) é capaz de inibir correntes geradas pelos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, do tipo NMDA. Estudos farmacológicos e moleculares indicam que esses canais iônicos exercem importante papel no controle de processos nociceptivos na medula espinhal e contribuem para o fenômeno de sensibilização central, em certos tipos de dor neuropática (Zhao et al., 2012; Zhou et al., 2011). Figueira (2013), investigou o efeito antinociceptivo central da

toxina PnTx4(5-5) em camundongos, assim como o envolvimento do receptor NMDA (NMDAR) na ação antinociceptiva. Foram comparados os efeitos de PnTx4(5-5) com o MK-801, um inibidor não competitivo do NMDAR em alguns modelos de dor. Os resultados sugerem a participação do NMDAR na atividade antinociceptiva de PnTx4(5-5), porém, tanto no modelo de nocicepção espontânea quanto no teste da formalina, PnTx4(5-5) foi mais potente e eficaz que o MK-801, sugerindo que a toxina possa apresentar afinidade por outros alvos. Isso pode ser explicado pelo fato da fase inflamatória do teste da formalina depender da participação não só do NMDAR, mas também de outros receptores e/ou canais iônicos (Hunskar & Hole, 1987; Mcnamara *et al.*, 2007).

Apesar de várias tentativas, durante os ensaios eletrofisiológicos não foi possível expressar os canais Nav1.7 e 1.8 e, como mencionado anteriormente, Nav1.9 é raramente expresso em sistema heterólogo. Uma alternativa para avaliar a ação de PnTx4(5-5) nos canais Nav1.8 e 1.9 seria realizar testes em canais TTX-R de neurônios DRG. No entanto, diante da dificuldade de se obter TTX, que está proibido pela Anvisa de ser comercializado no país, até o momento não foi possível realizar estes testes.

Algumas toxinas de caranguejeiras com mecanismo de inibição de canais para sódio semelhante à PnTx4(5-5), como ProTx-I and ProTx-II, dentre outras, foram capazes de inibir, de forma potente, os canais Nav1.7 e 1.8 (Gilchrist & Bosmans, 2012). Como a toxina PnTx4(5-5) também causou antinocicepção quando injetada pela via periférica (Oliveira *et al.*, 2010) e considerando-se que os receptores NMDA são encontrados mais frequentemente no SNC (Fundytus *et al.*, 2001, Henneberger *et al.*, 2013 Mothet *et al.*, 2015), pode ser que os canais para sódio Nav 1.7, 1.8 e 1.9 possam estar envolvidos com a antinocicepção periférica, causada por esta toxina. Essas hipóteses poderão ser confirmadas após o teste da toxina nesses canais, o que também contribuirá para esclarecer os mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva de PnTx4(5-5).

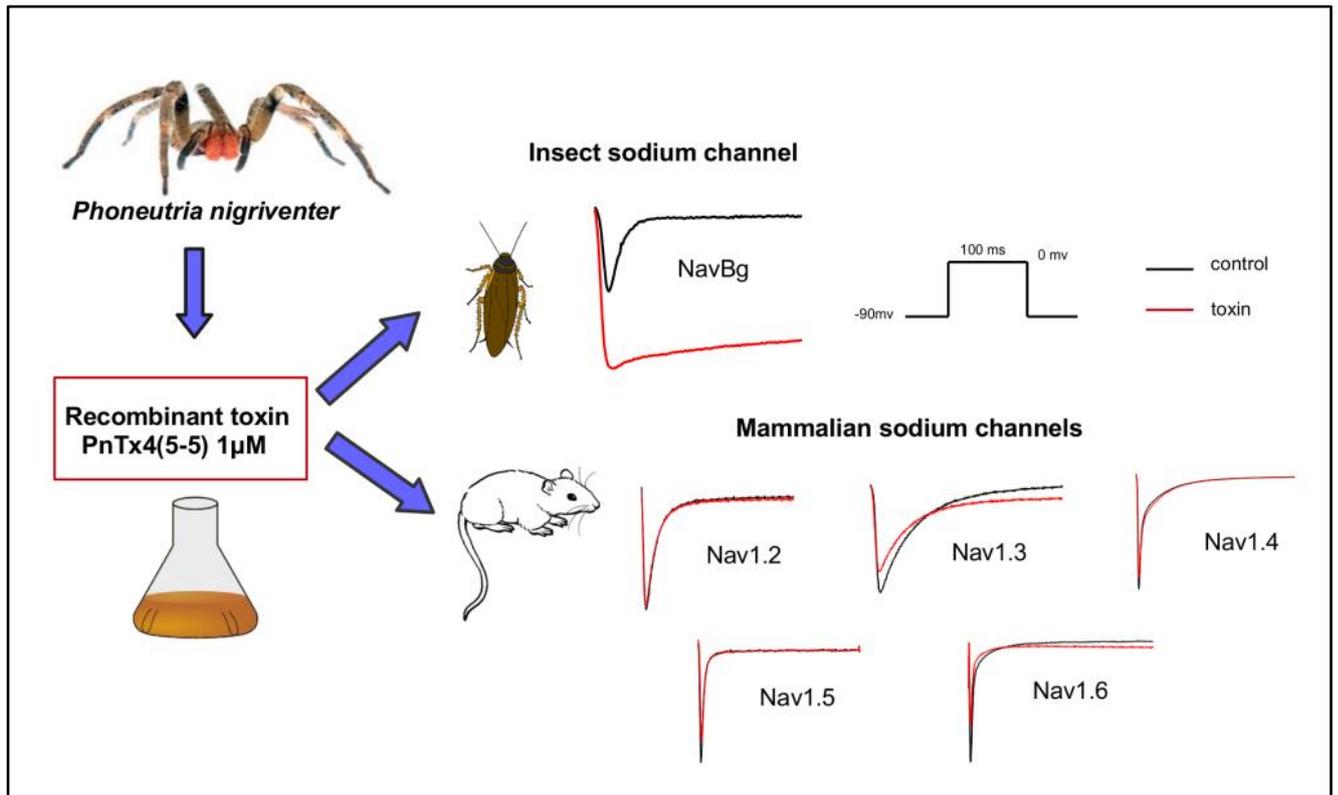


Figura 36 - Resumo esquemático dos principais resultados obtidos nesse trabalho (*Graphical abstract*)

7 Conclusões gerais

Nesse trabalho a toxina PnTx5(5-5) foi expressa de forma recombinante e apresentou estrutura secundária e atividade biológica similar à toxina nativa. A toxina recombinante foi testada pela primeira vez em canais para sódio de inseto (NavBg) e de mamífero (Nav1.2-1.6), e demonstrou ação em todos esses subtipos, agindo de maneira diferencial em inseto e mamífero. rPnTx5(5-5) foi capaz de retardar a inativação no canal para sódio de inseto e inibir a corrente de sódio nos canais de mamífero. Isso sugere que a toxina se ligue em sítios diferentes nos canais para sódio de inseto e de mamífero. O mutante R32A teve menor ação no canal para sódio de inseto quando comparado à toxina original, sugerindo que o aminoácido Arg32 pode estar envolvido na afinidade com o canal para sódio. A ação da toxina no canal Nav1.3 pode estar relacionada à sua atividade antinociceptiva, porém serão necessários testes em outros canais para sódio, envolvidos na nocicepção, para confirmar ou não, o papel desses canais na atividade antinociceptiva.

Os resultados deste trabalho contribuíram para o entendimento da ação farmacológica da toxina PnTx5(5-5) e abre novas perspectivas para a continuação dos estudos de estrutura e função da toxina. A compreensão do seu mecanismo farmacológico e da relação estrutura e função, são fundamentais para a possível utilização da mesma como modelo para desenvolvimento de novos fármacos.

8 Perspectivas

Com os resultados desse trabalho, vislumbramos as seguintes perspectivas, em um futuro próximo:

- Otimizar a expressão da toxina rPnTx4(5-5), de forma a obter maiores quantidades que possibilitem a realização de estudos estruturais;
- Tentar outras estratégias para expressão dos mutantes utilizando-se diferentes vetores e/ou sistemas de expressão;
- Testar a toxina rPnTx4(5-5) nos canais Nav1.7, 1.8 e em canais TTX-R de neurônios DRG;
- Testar a toxina rPnTx4(5-5) em outros canais iônicos envolvidos com a nocicepção, como potássio, cálcio, ASIC, TRPV1.

9 Referencias bibliográficas

AHMAD, S., DAHLLUND, L., ERIKSSON, A.B., HELLGREN, D., KARLSSON, U., LUND, P.E., MEIJER, I.A., MEURY, L., MILLS, T., MOODY, A. A stop codon mutation in SCN9A causes lack of pain sensation. *Hum Mol Genet*, 16: 2114-2121, 2007

AMAYA, F., WANG, H., COSTIGAN, M., ALLCHORNE, A.J., HATCHER, J.P., EGERTON, J., STEAN, T., MORISSET, V., GROSE, D., GUNTHORPE, M.J. The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci*, 26:12852-12860, 2006.

ARAÚJO, D.A.M., CORDEIRO, M.N., DINIZ, C.R., BEIRÃO, P.S.L. Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 347, 205-208, 1993.

BENDE, N.S., KANG, E., HERZIG, V., BOSMANS, F., NICHOLSON, G.M., MOBILI, M., KING, G.F. The insecticidal neurotoxin Aps III is an atypical knottin peptide that potently blocks insect voltage-gated sodium channels. *Biochem Pharmacol.*, 85:1542-54, 2013.

BERTA, T., POIROT, O., PERTIN, M., JI, R.R., KELLENBERGER, S., DECOSTERD, I. Transcriptional and functional profiles of voltage-gated Na(+) channels in injured and non-injured DRG neurons in the SNI model of neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci.*, 37:196-208, 2008.

BESSETTE P.H., ASLUND, F., BECKWITH, J., GEORGIU, G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1999.

BILLEN, B., VASSILEVSKI, A., NIKOLSKY, A., DEBAVEYE, S., TYTGAT, J., GRISHIN, E. Unique bell-shaped voltage modulation of Na⁺ channel gating by novel insect-selective toxins from the spider *Agelena orientalis*. *J Biol Chem.*, 285:18545-54, 2010.

- BORGES, M.H., de LIMA, M.E., STANKIEWISZ, M., PELHATE, M., CORDEIRO, M.N, BEIRAO, P.S.L. Structural and functional diversity in the venom of spiders of the genus Phoneutria. In: De LIMA, M.E., PIMENTA, A.M.C., ROCHAT, H. Animal Toxins: State of the Art. Perspectives on Health and Biotechnology. Belo Horizonte-MG. Editora UFMG. 313-322p, 2009.
- BOSMANS, F., RASH, L., ZHU, S., DIOCHOT, S., LAZDUNSKI, M., ESCOUBAS, P., TYTGAT, J. Four novel tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes. *Mol. Pharmacol*, 69: 419-429, 2006.
- BOSMANS, F., TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon*, 49:142–158, 2007.
- BOSMANS, F., MARTIN-EAUCLAIRE, M.F., SWARTZ, K.J. Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels. *Nature*, 456: 202–208, 2008.
- BOSMANS, F., SWARTZ, K.J. Targeting sodium channel voltage sensors with spider toxins. *Trends Pharmacol Sci.*, 31: 175–182, 2010
- CAMPOS, F.V., CHANDA, B., BEIRÃO, P.S.L., BENZANILLA, F. α - Scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels. *Journal of General Physiology*, 132: 251-263, 2008.
- CAO, Z.Y.; MI, Z.M, CHENG, G.F.; XIAO, X.; LIU, X.M.; LIANG, X.T.; YU, D.Q. Purification and characterization of a new peptide with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensi* Karch. *Journal of Peptide Research*; 64: 33–41, 2004.
- CAPES, D.L., GOLDSCHEN-OHM, M.P., ARCISIO-MIRANDA, M, BEZANILLA, F., CHANDA, B. Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels. *J Gen Physiol.*,142:101-12, 2013.
- CASSOLA, A. C., JAFFE, H., FALES, H. M., CASTRO, A. S., MAGNOLI, F., AND CIPOLLA-NETO, J. Omegaphonetoxin-IIA: A calcium channel blocker from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Pflugers Arch.*436, 545–552, 1998.

CATTERALL WA. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem.*, 55: 953-85, 1986.

CATTERALL, W.A. From Ionic Currents to Molecular Review Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron Review*, 26, 13–25, 2000.

CATTERALL, W.A., GOLDIN, A.L., WAXMAN, S.G. International union of pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationship of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*, 57: 397-409, 2005.

CATTERALL, W.A., CESTÈLE, S., YAROV-YAROVOY, V., YU, F.H., KONOKI, K., SCHEUER, T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49, 124–141, 2007.

CATTERALL, W.A. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol*, 590: 2577–2589, 2012.

CRAIK, D.J. Plant cyclotides: circular, knotted peptide toxins. *Toxicon*. 12:1809-1813, 2001

CESTÈLE, S., QU, Y, ROGERS, J.C, ROCHAT, H., SCHEUER, T., CATTERALL, W.A. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron*. (4):919-31, 1998.

CESTÈLE, S., CATTERALL, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, 82: 883-892, 2000.

CESTÈLE, S., YAROV-YAROVOY, V., QU, Y., SAMPIERI, F., SCHEUER, T., CATTERALL, W.A. Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin. *J. Biol. Chem.*, 281: 21332–21344, 2006.

CHA A, RUBEN PC, GEORGE AL JR, FUJIMOTO E, BEZANILLA F. Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na⁺ channel fast inactivation. *Neuron.*, 22: 73-87, 1999.

CHANDA, B., BENZANILLA, F. Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *Journal of General Physiology*, 120: 629-645, 2002.

CHAU, R., KALAITZIS, J. A., NEILAN, B. A. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquat. Toxicol.* 104: 61–72, 2011

CHEN, J.; FENG, X.H.; SHI, J.; TAN, Z.Y.; BAI, Z.T.; LIU, T.; JI, Y.H. The antinociceptive effect of BmK AS, a scorpion active polypeptide, and the possible mechanism on specifically modulating voltage-gated Na⁺ currents in primary afferent neurons. *Peptides*. 27: 2182–2192, 2006.

CHEN, J., ZHAO, L., JIANG, L., MENG, E., ZHANG, Y., XIONG, X., LIANG, S. Transcriptome analysis revealed novel possible venom components and cellular processes of the tarantula *Chilobrachys jingzhao* venom gland. *Toxicon*. 52(7):794-806, 2008.

CHEN, Z., HAN, S., CAO, Z., WU, Y., ZHUO, R., LI, W. Fusion expression and purification of four disulfide-rich peptides reveals enterokinase secondary cleavage sites in animal toxins. *Peptides*, 39:145-51, 2013.

COHEN, L., LIPSTEIN, N., GORDON, D. Allosteric interactions between scorpion toxin receptor sites on voltage-gated Na channels imply a novel role for weakly active components in arthropod venom. *FASEB J.* 20(11):1933-5, 2006.

CORDEIRO M.N., DINIZ C.R., VALENTIM A.C., VON EICKSTEDT , GILROY J., RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the brasilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *FEBS Lett.* 310: 153-156, 1992.

CORDEIRO, M.N., FIGUEIREDO, S.G., VALENTIM, A.C., DINIZ, C.R., VON EICKSTEDT, R.D., GILROY, J., RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of six TX3 type neurotoxins from the venom of Brazilian armed spider *Phoneutria nigriventer* (Keys.). *Toxicon* 31: 35-42, 1993.

CORZO, G, GILLES, N., SATAKE, H., VILLEGAS, E, DAI, L., NAKAJIMA, T, HAUPT, J. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. *FEBS Lett.*; 547(1-3):43-50, 2003.

CORZO, G, ESCOUBAS, P, VILLEGAS, E, KARBAT, I, GORDON, D, GUREVITZ, M, NAKAJIMA, T, GILLES, N. A spider toxin that induces a typical effect of scorpion alpha-toxins but competes with beta-toxins on binding to insect sodium channels. *Biochemistry.*, 44(5):1542-9, 2005.

COX, J.J., REIMANN, F., NICHOLAS, A.K., THORNTON, G., ROBERTS, E., SPRINGELL, K., KARBANI, G., JAFRI, H., MANNAN, J., RAASHID, Y. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*, 444: 894-898, 2006.

CUI, Y., SONG ,Y.B. , MA, L., LIU, Y.F., LI, G.D., WU, C.F., ZHANG, J.H. Site-directed Mutagenesis of the Toxin from the Chinese Scorpion *Buthus martensii* Karsch (BmKAS): Insight into Sites Related to Analgesic Activit. *Arch Pharm Res.*, 33 (10): 1633-1639, 2010.

CURY. Y., PICOLO, G. Are animal toxins good models for analgesics? In: De LIMA, M.E.; PIMENTA, A.M.C.; & ROCHAT, H. (Org.). *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives on Health and Biotechnology.* Belo Horizonte-MG. Editora UFMG. 661-678p, 2009.

DALMOLIN, G.D.; SILVA, C.R.; RIGO, F.K.; GOMES, G.M.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; SILVA, M.A.R.; PRADO, M.A.M.; GOMEZ, M.V.; FERREIRA, J. Antinociceptive effect of Brazilian armed spider venom toxin Tx3-3 in animal models of neuropathic pain. *Pain*, 152: 2224–2232, 2011.

DARBON, H., JOVER, E., COURAUD, F., ROCHAT, H. Alpha-scorpion neurotoxin derivatives suitable as potential markers of sodium channels. Preparation and characterization. *Int J Pept Protein Res.*,22(2):179-86, 1983.

- DE LIMA, M.E.; STANKIEWICZ, M.; HAMON, A.; FIGUEIREDO, S.G.;CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; MARTIN-EAUCLAIRE, M-F.; PELHATE, M. The toxin Tx4(6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na⁺current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3. *Journal of Insect Physiology.*, 48: 53–61, 2002.
- DE LIMA, M.E., FIGUEIREDO, S.G., MATAVEL, A., NUNES, K.P., SILVA, C.N., ALMEIDA, F.M., DINIZ, M.R.V., CORDEIRO, M.N., STANKIEWICZ, M., BEIRÃO, P.S.L. *Phoneutria nigriventer* Venom and Toxins: A Review. In: GOPALAKRISHNAKONE, P., CORZO, G.A., DIEGO-GARCIA, E., LIMA M.E., editors. *Spider Venoms*. Springer Dordrecht: Heidelberg, New York, London, 2015. pp 1-24
- DHAKA, A.,VISWANATH, V., PATAPOUTIAN, A. TRPion channels and temperature sensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 29,135–61, 2006.
- DENG, M., LUO, X., JIANG, L., CHEN, H., WANG, J., HE, H., LIANG, S. Synthesis and biological characterization of synthetic analogs of Huwentoxin-IV (Mu-theraphotoxin-Hh2a), a neuronal tetrodotoxin-sensitive sodium channel inhibitor. *Toxicon.*, 71:57-65. 2013.
- DIB-HAJJ, S.D., FJELL, J., CUMMINS, T.R., ZHENG, Z., FRIED, K., LAMOTTE, R., BLACK, J.A., WAXMAN, S.G. Plasticity of sodiumchannel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain*, 83: 591-600, 1999.
- DIB-HAJJ, S.D., TYRRELL, L., WAXMAN, S.G. Structure of the sodium channel gene SCN11A: evidence for intron-to-exon conversion model and implications for gene evolution. *Mol Neurobiol*, 26:235-250, 2002.
- DOBELI, H., BREYER, N., SIZMANN, D., ZUBER, M. T., WELNERT, B., WIPF,B. Recombinant fusion proteins for the industrial production of disulfide bridge containing peptides: purification, oxidation, whitout concatamer formation, and selective cleavage. *Protein. Expr. Purif.*, 12: 404-414, 1998.
- DOS SANTOS, R. G., VAN REBTERGHEN, C., MARTIN-MOUTOT, N., MASUELLE, P., CORDEIRO, M. N., DINIZ, C. R., MORI, Y., DE LIMA, M. E., SEAGAR, M. *Phoneutria nigriventer* omega Phonetoxin IIA blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with omega-conotoxin biding sites. *J. Biol.Chem.*, 277, 13856–13862.,2002.

ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*, 82: 893–907, 2000.

ESCOUBAS, P.; DE WEILLE, J.R.; LECOQ, A.; DIOCHOT, S.; WALDMANN, R.; CHAMPIGNY, G.; MOINIER, D.; MENEZ, A.; LAZDUNSKI, M. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.*, 275(33): 25116-25121, 2002.

EITAN, M., FOWLER, E., HERRMANN, R., DUVAL, A., PELHATE, M., AND ZLOTKIN, E. A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure, and mode of action. *Biochemistry* 29, 5941–5947, 1990.

FERRAT, G., BOSMANS, F., TYTGAT, J., PIMENTEL, C., CHAGOT, B., GILLES, N., NAKAJIMA, T., DARBON, H., CORZO, G. Solution structure of two insect-specific spider toxins and their pharmacological interaction with the insect voltage-gated Na⁺ channel. *Proteins.*, 59(2):368-79, 2005.

FERTLEMAN, C.R., BAKER, M.D., PARKER, K.A., MOFFATT, S., ELMSLIE, F.V., ABRAHAMSEN, B., OSTMAN, J., KLUGBAUER, N., WOOD, J.N., GARDINER, R.M., REES, M. SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron*, 52: 767-774, 2006.

FIGUEIRA, J. Efeito antinociceptivo espinhal da toxina PnTx4(5-5) purificada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

FIGUEIREDO, S.G., De Lima, M.E., VALENTIM, A.C., CORDEIRO, M.N., DINIZ, C.R., RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (keys). *Toxicon.*, 33: 83-93, 1995.

FIGUEIREDO, S.G., MAFRA, R.A., PIMENTA, A.M.C., CORDEIRO, M.N., DINIZ, C.R., De LIMA, M.E. Purification and pharmacological activity of two potent insecticidal neurotoxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom. *J. Venom. Anim. Toxins* 3: 231, 1997.

FIGUEIREDO, S.G., de LIMA, M.E., CORDEIRO, M.N., DINIZ, C.R., PATTEND, D., HALLIWELLD, R.F., GILROYD, J., RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA evoked currents in rat hippocampal neurons. *Toxicon*. 39, 309-317, 2001.

FONTANA, M.D. Pharmacology of *Phoneutria* venom. *Mem. Inst. Butantan* 52: 59-60, 1990.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate Receptors and Nociception Implications for the Drug Treatment of Pain. *CNS Drugs*, 15 (1): 29-58, 2001.

GOLDBERG, Y.P., MACFARLANE, J., MACDONALD, M.L., THOMPSON, J., DUBE, M.P., MATTICE, M., FRASER, R., YOUNG, C., HOSSAIN, S., PAPE, T. Loss-of-function mutations in the Nav1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. *Clin Genet*, 71:311-319, 2007.

GOLDIN, A. L. Resurgence of sodium channel research. *Annu. Rev. Physiol.*, 63, 871–894, 2001.

GOMEZ, R. S., CASALI, T. A., ROMANO-SILVA, M. A., CORDEIRO, M. N., DINIZ, C. R., MORAES-SANTOS, T., PRADO, M. A., AND GOMEZ, M. V. The effect of PhTx3 on the release of 3H-acetylcholine induced by tityustoxin and potassium in brain cortical slices and myenteric plexus. *Neurosci. Lett.*, 196: 131–133, 1995.

GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; GUATIMOSIM, C.; PRADO, M. A. M. *Phoneutria nigriventer* Venom: A Cocktail of Toxins that affect Ion Channels. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22: 579-588, 2002.

GORDON, D., MARTIN-EAUCLAIRE, M.F, CESTÈLE, S., KOPEYAN, C., CARLIER, E., KHALIFA, R.B., PELHATE, M, ROCHAT, H. Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J Biol Chem.*, 271(14):8034-45, 1996.

GORDON, D., SAVARIN, P., GUREVUTZ, M., ZINN-JUSTIN, S. Functionnel anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. *Journal of Toxicology, Toxin Reviews* 17, 131–160, 1998.

GOUDET, C., CHIB, C.W., TYTGAT, J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*, 40: 1239–1258, 2002.

GUAN, R.J.; WANG, C.G.; WANG, M; WANG, D.C. A depressant insect toxin with a novel analgesic effect from scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Biochimica and Biophysica Acta*; 1549(1): 9–18, 2001a.

GUAN, R.J.; WANG, C.G.; WANG, M; WANG, D.C. A new insect neurotoxin AngP1 with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensii* Karsch: purification and characterization. *Journal of Peptide Research*, 58(1): 27–35, 2001b.

GUATIMOSIM, C., ROMANO-SILVA, M. A., CRUZ, J. S., BEIRAO, P. S., KALAPOTHAKIS, E., MORAES-SANTOS, T., CORDEIRO, M. N., DINIZ, C. R., GOMEZ, M. V., AND PRADO, M. A. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br. J. Pharmacol.*, 122, 591–597, 1997.

GUY, H. R.; SEETHARAMULU, P. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 83,(2): 508-512, 1986.

HAINS BC, SAAB CY, KLEIN JP, CRANER MJ, WAXMAN SG: Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci.*, 24:4832-4839, 2004.

HEINEMANN, S. H. et al. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature [S.I.]*, v. 356, n. 6368, p. 441-443, 1992.

HENNEBERGE, C., BARD, L., KING, C., JENNINGS, A., RUSAKOV, D. A. NMDA Receptor Activation: Two Targets for Two Co-Agonists. *Neurochem. Res.*, 38:1156–1162, 2013

HILLE, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd. ed. Sunderland, USA: Sinauer Associates, Inc., 2001.

HOGG, R.C. Novel approaches to pain relief using venom-derived peptides. *Curr. Med. Chem.*, 13: 3191-3201, 2006

HUNSKAR, S., HOLE, K. The formalin test: association between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30:103-114, 1987.

GILCHRIST, J., BOSMANS, F. Animal Toxins Can Alter the Function of Nav1.8 and Nav1.9. *Toxins*, 4: 620-632, 2012.

KHASAR, S.G., GOLD, M.S., LEVINE, J.D. A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. *Neurosci Lett*, 256:17-20, 1998.

JOVER, E., MARTIN-MOUTOT, N., COURAUD, F., ROCHAT, H. Scorpion toxin: specific binding to rat synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85: 377–382, 1978.

KRAFTE, D. S., BANNON, A.W. Sodium channels and nociception: recent concepts and therapeutic opportunities. *Curr Opin Pharmacol.*, 8(1):50-6, 2008.

KRIMM, I., GILLES, N., SAUTIÈRE, P., STANKIEWICZ, M., PELHATE, M., GORDON, D., LANCELIN, J.M. NMR structures and activity of a novel alpha-like toxin from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. *J Mol Biol.* 285(4):1749-63, 1999.

KLINT, J.K., SENFF, S., RUPASINGHE, D.B., ER, S.Y., HERZIG, V., NICHOLSON, G.M., KING, G.F. Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon*, 60: 478–491, 2012

KULIOPULOS, A., WALSH, C. T. Production, purification and cleavage of tandem repeats of recombinant peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 4599-4607, 1994.

KUSHMERICK, C., KALAPOTHAKIS, E., BEIRAO, P. S., PENAFORTE, C. L., PRADO, V. F., CRUZ, J. S., DINIZ, C. R., CORDEIRO, M. N., GOMEZ, M. V., ROMANO-SILVA, M. A., AND PRADO, M. A. Phoneutria nigriventer toxin Tx3-1 blocks A-type K⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells. *J. Neurochem.*, 72: 472–1481, 1999.

LA VALLIE, E. R., DIBLASIO, E. A.; KOVACIC, S.; GRANT, K. L.; SCHENDEL, P. F.; McCOY, J. M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/ Technology* 11, 187-193, 1993.

LAI, J., GOLD, M.S., KIM, C.S., BIAN, D., OSSIPOV, M.H., HUNTER, J.C., PORRECA, F: Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, Nav1.8. *Pain*, 95:143-152, 2002.

LAN, Z.D.; DA, I. L.; ZHUO, X.L.; FENG, J.C.; XU, K.; CHI, C.W. Gene cloning and sequencing of BmK AS and BmK AS-1, two novel neurotoxins from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*, 37(5): 815–823, 1999.

LEAO, R. M., CRUZ, J. S., DINIZ, C. R., CORDEIRO, M. N., AND BEIRAO, P. S.. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-Phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology*, 39:1756–1767, 2000.

LEIPOLD, E., HANSEL, A., BORGES, A., HEINEMANN, S. H. Subtype specificity of scorpion s-toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain 3. *Mol. Pharmacol.* 70: 340–347, 2006.

LIU, Y.F., MA, R.L., WANG, S.L., DUAN, Z.Y., ZHANG, J.H., WU, L.J., WU, C.F. Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 27: 253–258, 2003.

LIU, L. H., BOSMANS, F., MAERTENS, C., ZHU, R. H., WANG, D. C., AND TYTGAT, J., Molecular basis of the mammalian potency of the scorpion alpha-like toxin, BmK M1. *FASEB J.*, 19, 594-596, 2005.

LIU, Y., LI, D., WU, Z., LI, J, NIE, D., XIANG, Y., LIU, Z. A positively charged surface patch is important for hainantoxin-IV binding to voltage-gated sodium channels. *J Pept Sci.*, 18(10):643-9, 2012.

MAFRA, R.A., FIGUEIREDO, S.G., DINIZ, C.R., CORDEIRO, M.N., CRUZ, J.D., DE LIMA, M.E. PhTx4, a new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom, inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes. *Brain, Res.*, 831: 297, 1999.

MARTIN-EAUCLAIRE, M.F., ABBAS, N., CÉARD, B., ROSSO, J.P., BOUGIS, P.E. Androctonus Toxins Targeting Voltage-Gated Sodium Channels. In: GOPALAKRISHNAKONE, P., SCHWARTZ, E.F., POSSANI, L.D., DE LA VEGA R.C.R., editors. Scorpion venoms. Springer Dordrecht: Heidelberg, New York, London; 2014. pp 1-25.

MARTIN-MOUTOT, N., MANSUELLE, P., ALCARAZ, G., DOS SANTOS, R.G., CORDEIRO, M.N., DE LIMA, M.E., SEAGAR, M., VAN RENTERGHEM, C. Phoneutria nigriventer Toxin 1: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with μ -conotoxin binding sites. *Mol. Pharmacol.*, 69(6): 1931-1937, 2006.

MATAVEL, A., CRUZ, J.S., PENAFORTE, C.L., ARAUJO, D.A.M., KALAPOTHAKIS, E., PRADO, V.F., DINIZ, C.R., CORDEIRO, M.N., BEIRÃO, P.S.L. Electrophysiological characterization and molecular identification of the Phoneutria nigriventer peptide toxin PnTx2-6. *FEBS Lett.*, 523: 219– 223, 2002.

MATAVEL, A.C.; FLEURY, C.; OLIVEIRA, L.C.; MOLINA, F.; de LIMA, M.E.; CRUZ, J.S.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; RAMOS, C.; BEIRÃO, P. S. L. Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics. *Biochemistry*, 48: 3078-3088, 2009.

MCGIVERN, J.G. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatric Disease and Treatment.*, 3(1): 69–85, 2007.

MCMAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; JULIUS, D.; MORAN, M.M.; FANGER, C.M. TRPA1 mediate formalin-induced pain. *Proc Nat Acad Sci USA*. 104(33):13525-13530, 2007.

MENG, E., CAI, T.F., LI, W.Y., ZHANG, H., LIU, Y.B., PENG, K., LIANG, S., ZHANG, D.Y. Functional expression of spider neurotoxic peptide huwentoxin-I in *E. coli*. *PLoS One.*, 6(6): e21608, 2011.

MESTRE, C.; PELISSIER, T.; FIALIP, J.; WILCOX, G.; ESCHALIER, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 32: 197-200, 1994.

MIDDLETON, R.E., WARREN, V.A., KRAUS, R.L., HWANG, J.C., LIU, C.J., DAI, G., BROCHU, R.M., KOHLER, M.G., GAO, Y.D., GARSKY, V.M. Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. *Biochemistry*, 41:14734–14747, 2002.

MILJANICH G.P., RAMACHANDRAN J. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 35: 707–734, 1995

MINTZ, I. M.; VENEMA, V. J.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; BEAN, B. P.; ADAMS, M.E. P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -aga-IVA. *Nature*. 355(6363), 827-829, 1992b.

MOMIM, A., WOOD, J. N. Sensory neuron voltage-gated sodium channels as analgesic drug targets. *Curr Opinion in Neurobiology*, 18, 383–388, 2008.

MOTHET, J.P., LE BAIL, M. ,BILLARD, J.M Time and space profiling od NMDA receptor co-agonists functions. *J Neurochem.*,135 (2):210-25, 2015.

NARAHASHI, T. Tetrodotoxin: a brief history. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 84, 147–154, 2008.

NICHOLSON, G.M., LITTLE, M.J., BIRINYI-STRACHAN, L.C. Structure and function of delta-atracotoxins: lethal neurotoxins targeting the voltage-gated sodium channel. *Toxicon.*, 43 (5): 587-599, 2004.

NGUYEN, H. M.; GOLDIN, A. L. Sodium Channel Carboxyl-terminal Residue Regulates Fast Inactivation. *Journal of Biological Chemistry.*, 285 (12): 9077-9089, 2010.

NIETO, F.R., ENTRENA, J.M., CENDAN, C.M., POZO, E.D., VELA, J.M., BAEYENS, J.M. Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. *Pain*, 137: 520-531, 2008.

NORTON, R.S., PALLAGHY, P.K. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon.*, 36(11):1573-83, 1998.

OLIVEIRA, L.C., DE LIMA, M.E., PIMENTA, A.M.C., MANSUELLE, P., ROCHAT, H., CORDEIRO, M.N., RICHARDSON, M., FIGUEIREDO, S.G. PnTx3-4, a new insect toxin from *Phoneutria nigriventer* venom elicits the glutamate uptake inhibition exhibited by PhTx4 toxic fraction. *Toxicon* 42, 793-800, 2003.

OLIVEIRA, C. F. B.; Estudo da ação antinociceptiva da toxina PnTx4(5-5) do veneno da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1981). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

OLIVEIRA, L.C., CAMPOS, F.V., FIGUEIREDO, S.G., CORDEIRO, M.N., ADAIME, B.R., RICHARDSON, M., PIMENTA, A.M., MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F., BEIRÃO, P.S., DE LIMA, M.E. β/δ -PrIT1, a highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria reidy*. *Toxicon*. 104:73-82, 2015.

PARK, S.P.; KIM, B.M.; KOO, J.Y.; CHO, H.; LEE, C.H.; KIM, M.; NA, H.S.; OH, U. A tarantula spider toxin, GsMTx4, reduces mechanical and neuropathic pain. *Pain*, 137, 208-217, 2008.

PENAFORTE, C. L., PRADO, V. F., PRADO, M. A. M., ROMANO-SILVA, M. A., GUIMARÃES, P. E., DE MARCO, L. A., GOMEZ, M. V., AND KALAPOTHAKIS, E. Molecular cloning of cDNAs encoding insecticidal neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, 38, 1443–1449, 2000.

PRADO, M.A.M., GUATIMOSIM, C., GOMEZ, M.V., DINIZ, C.R., CORDEIRO, M.N., ROMANO-SILVA, M.A. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: The toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem. J.*, 314,145–150, 1996.

PRIEST, B.T., MURPHY, B.A., LINDIA, J.A., DIAZ, C., ABBADIE, C., RITTER, A.M., LIBERATOR, P., IYER, L.M., KASH. S.F., KOHLER, M.G. Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel Nav1.9 to sensory transmission and nociceptive behaviour. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:9382-9387, 2005.

PRIEST B.T., BLUMENTHAL, K.M., SMITH, J.J., WARREN, V.A., SMITH, M.M. ProTx-I and ProTx-II: gating modifiers of voltage-gated sodium channels. *Toxicon*, 49: 194–201, 2007.

QUINTERO-HERNÁNDEZ, V., ORTIZ, E., RENDÓN-ANAYA, M., SCHWARTZ, E.F., BECERRIL B., CORZO G., POSSANI L.D. Scorpion and spider venom peptides: Gene cloning and peptide expression *Toxicon*, 58, 644–663, 2011.

RAHMAN, W., DICKENSON, A. H. Voltage gated sodium and calcium channel blockers for the treatment of chronic inflammatory pain. *Neuroscience Letters*, 557, 19–26, 2013.

RANDALL, L.O., SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. *Arch. Int. Pharmacody.* 111, 409-419, 1957.

REDDI, H., BHATTACHARYA, A., KUMAR, V. The calcium-binding protein of *Entamoeba histolytica* as fusion partner for expression of peptides in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 36: 213-218, 2002.

RENGANATHAN, M., CUMMINS, T.R., WAXMAN, S.G. Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J Neurophysiol.*, 86:629-640, 2001.

RESENDE JR, L.; CORDEIRO, M.N.; OLIVEIRA, E.B., DINIZ, C.R. Isolation Of Neurotoxic Peptides from the Venom of the Armed Spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, 29(10). 1225-1233, 1991.

RICHARDSON, .M, PIMENTA, A.M.C., BEMQUERER, M.P., BEIRÃO, P.S.L., DE LIMA, M E., FIGUEIREDO, S.G., BLOCH, C.J., VASCONCELOS, E., CAMPOS, F., CORDEIRO, M.N. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142, 173-187, 2006.

ROGERS, J.C., QU, Y., TANADA, T.N., SCHEUE, T., CATTERALL, W.A., Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Nav channel alpha subunit. *J. Biol. Chem.*, 1271: 15950-15962, 1996.

RONG, M., CHEN, J., TAO, H., WU, Y., JIANG, P., LU, M., SU, H., CHI, Y., CAI, T., ZHAO, L., ZENG, X., XIAO, Y., AND LIANG, S. Molecular basis of the tarantula toxin

jingzhaotoxin-III (_-TRTX-Cj1_) interacting with voltage sensors in sodium channel subtype Nav1.5. *FASEB J.*, 25, 3177–3185, 2011.

SAMBROOK, J., FRITSH, E. F., MANIATS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. Vol. 1, 2, 3. Press Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.

SERMADIRAS, I., REVELL, J., LINLEY, J.E., SANDERCOCK, A., RAVN, P. Recombinant expression and in vitro characterisation of active Huwentoxin-IV. *PLoS One.*, 8(12):e83202, 2013.

SILVA, A.O., PEIGNEUR, S., DINIZ, M.R.V., TYTGAT, J., BEIRÃO, P.S.L. Inhibitory effect of the recombinant *Phoneutria nigriventer* Tx1 toxin on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, 94: 2756-2763, 2012.

SMITH, J.J., CUMMINS, T.R., ALPHY, S., BLUMENTHAL, K.M. Molecular interactions of the gating modifier toxin ProTx-II with NaV 1.5: implied existence of a novel toxin binding site coupled to activation. *J. Biol. Chem.*, 282, 12687–12697, 2007.

SORKIN, L. S., YAKSH, T. L., DOOM, C. M. Pain models display differential sensitivity to Ca²⁺-permeable non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Anesthesiology*. 95(4), 965-975, 2001.

SOKOLOV, S., KRAUS, R.L., SCHEUER, T., CATTERALL, W.A. Inhibition of sodium channel gating by trapping the domain II voltage sensor with protoxin II. *Mol Pharmacol.*, 73: 1020–1028, 2008.

SONG, W., DU, Y., LIU, Z., LUO, N., TURKOV, M., GORDON, D., GUREVITZ, M., GOLDIN, A. L., DONG, K. Substitutions in the domain III voltage-sensing module enhance the sensitivity of an insect sodium channel to a scorpion s-toxin. *J. Biol.Chem.*, 286, 15781–15788, 2011.

SORENSEN, B. *Animais peçonhentos*. Editora Livraria Atheneu, São Paulo, p. 50-53, 1990.

SOUZA, A. H., FERREIRA, J., CORDEIRO, M. N., VIEIRA, L. B., De CASTRO, C. J., TREVISAN, G., REIS, H., SOUZA, I. V., RICHARDSON, M., PRADO, M. A. M., PRADO, V.F., GOMEZ, M.V. Analgesic effect in rodents of native and recombinant

Ph α 1 β toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain*, 140, 115–126, 2008.

SOUZA, A.H., LIMA, M.C., DREWES, C.C., DA SILVA, J.F., TORRES, K.C. L., PEREIRA, E.M.R., de CASTRO JUNIOR, C.J., VIEIRA, L.B., CORDEIRO, M.N., RICHARDSON, M., GOMEZ, R.S., ROMANO-SILVA, M.A., FERREIRA, J., GOMEZ, M.V. Antiallodynic effect and side effects of Pha1b, a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*: Comparison with u-conotoxinMVIIA and morphine. *Toxicon*, 58, 626–633, 2011.

STEPHAN, M. M., POTTS, J. F., AND AGNEW, W. S. The microskeletal muscle sodium channel: mutation E403Q eliminates sensitivity to tetrodotoxin but not to μ -conotoxins GIIIA and GIIIB. *J. Membr. Biol.* 137, 1–8, 1994.

STEVENS, M., PEIGNEUR, S., TYTGAT, J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Front Pharmacol.*, 9 (2):71, 2011.

SUN, Y.M., BOSMANS, F., ZHU, R.H., GOUDET, C., XIONG, Y.M., TYTGAT, J., WANG, D.C. Importance of the Conserved Aromatic Residues in the Scorpion α -Like Toxin BmK M1. The hydrophobic surface region revisited. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278 (26), pp. 24125-24131, 2003.

TAN, Z.Y., XIAO, H., MAO, X., WANG, C.Y., ZHAO, Z.Q., JI, Y.H. The inhibitory effects of BmK IT2, a scorpion neurotoxin on rat nociceptive flexion reflex and a possible mechanism for modulating voltage-gated Na⁺ channels. *Neuropharmacology*, 40, 352–357, 2001.

TANG, C., ZHOU, X., HUANG, Y., ZHANG, Y., HU, Z., WANG, M., CHEN, P., LIU, Z., LIANG S. The tarantula toxin jingzhaotoxin-XI (κ -theraphotoxin-Cj1a) regulates the activation and inactivation of the voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Toxicon*; 92: 6-13, 2014.

TERLAU, H. et al. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Letters.*, 293, 1–2, 93-96, 1991.

TORRES, F.S., SILVA, C.N., LANZA, L.F., AGENOR V. SANTOS, PIMENTA, A.M.C., DE LIMA, M.E., DINIZ, M.R.V.. Functional expression of a recombinant toxin – rPnTx2-6 – active in erectile function in rat. *Toxicon.*, 56 (7),1172-1180, 2010.

VIJVERBERG, H. P., AND LAZDUNSKI, M. A new scorpion toxin with a very high affinity for sodium channels. An electrophysiological study. *J. Physiol. (Paris)* 79, 275–279, 1984.

WANG, C.Y., TAN, Z.Y., CHEN, B., ZHAO, Z.Q., JI, H. Antihyperalgesia effect of BmK IT2, a depressant insect-selective scorpion toxin in rat by peripheral administration. *Brain Research Bulletin*, 53, 335–338, 2000.

WANG, C.G., GILLES, N., HAMON, A., LE GALL, F., STANKIEWICZ, M., PELHATE, M., XIONG, Y.M., WANG, D.C, CHI, C.W. EXPLORATION OF THE FUNCTIONAL SITE OF A SCORPION ALPHA-LIKE TOXIN BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS. *BIOCHEMISTRY*. 42 (16):4699-708, 2003.

WANG, Y., WANG, L., CUI, Y., SONG, Y.B., LIU, Y.F., ZHANG, R., WU, C.F., ZHANG, J.H. Purification, characterization and functional expression of a new peptide with an analgesic effect from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch (BmK AGP-SYPU1) *Biomedical chromatography*, 25, 801–807, 2011a.

WANG, Y., HAO, Z., SHAO, J., SONG, Y., LI, C., LI, C., ZHAO, Y., LIU, Y., WEI, T., WU, C., ZHANG, J. The role of Ser54 in the antinociceptive activity of BmK9, a neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon* 58, 527–532, 2011b.

WANG J, YAROVYOY VY, KAHN R, GORDON D, GUREVITZ M, SCHEUER T, CATTERALL, WA. Mapping the receptor site for α -scorpion toxins on a Nav channel voltage sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108: 15426-15431, 2011c.

WAXMAN SG, KOCSIS JD, BLACK JA: Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol.*, 72:466-470, 1994.

WEST, J.W., PATTON, D.E., SCHEUER, T., WANG, Y., GOLDIN, A.L., CATTERALL, W.A. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel

inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 10910–10914, 1992.

XIAO, Y., TANG, J., YANG, Y., WANG, M., HU, W., XIE, J., ZENG, X., LIANG S. Jingzhaotoxin-III, a novel spider toxin inhibiting activation of voltage-gated sodium channel in rat cardiac myocytes. *J Biol Chem.*, 279: 26220–26226, 2004.

XIAO, Y., BINGHAM, J.P., ZHU, W., MOCZYDLOWSKI, E., LIANG, S., CUMMINS, T.R. Tarantula huwentoxin-IV inhibits neuronal sodium channels by binding to receptor site 4 and trapping the domain II voltage sensor in the closed configuration. *J Biol Chem.*, 283: 27300–27313, 2008.

XIAO, Y., BLUMENTHAL, K., JACKSON, J.O., LIANG, S., CUMMINS, T.R. The tarantula toxins ProTx-II and huwentoxin-IV differentially interact with human Nav1.7 voltage sensors to inhibit channel activation and inactivation. *Mol Pharmacol.*, 78(6):1124-34, 2010.

YANG, Y., WANG, Y., LI, S., XU, Z., LI, H., MA, L., FAN, J., BU, D., LIU, B., FAN, Z. Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythralgia. *J Med Genet.*, 41:171-174, 2004.

YU, F., CATTERALL, W. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4 (3) : 207, 2003.

ZHANG. X.Y., BAI, Z.T., CHAI Z.F., ZHANG J.W., LIU, Y., JI, Y.H. Suppressive Effects of BmK IT2 on Nociceptive Behavior and c-Fos Expression in Spinal Cord Induced by Formalin. *Journal of Neuroscience Research*, 74, 167–173, 2003.

ZHANG, H., HUANG, P.F., MENG, E., LI, W.Y., ZHOU, L., ZHU, L.Y., WU, L., LI, M.J., LIANG, S.P., ZHANG, D.Y. An efficient strategy for heterologous expression and purification of active peptide hainantoxin-IV. *PLoS One.*,10 (2): e0117099, 2015.

ZHAO, Y.L., CHEN, S.R., CHEN, H., PAN, H.L. Chronic opioid potentiates presynaptic but impairs postsynaptic N-methyl-D-aspartic acid receptor activity in spinal cords: implications for opioid hyperalgesia and tolerance. *J Biol Chem.*, 287(30):25073-85, 2012.

ZHOU, H.Y., CHEN, S.R., PAN, H.L. Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 4 (3):379-88, 2011.

ZILBERBERG, N., FROY, O., LORET, E., CESTELE, S., ARADI, D., GORDONI, D., GUREVITZ, M. Identification of Structural Elements of a Scorpion α -Neurotoxin Important for Receptor Site Recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (23): 14810-14816, 1997.

ZIMMERMANN, K., LEFFLER, A., BABES, A., CENDAN, C.M., CARR, R.W., KOBAYASHI, J., NAU, C., WOOD, J.N., REEH, P.W. Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature*, 447:855-858, 2007.

10 Anexos

10.1 Resumos publicados em anais de congressos

- Relacionados a tese:

PAIVA, A.L.B , MATAVEL, A., PEIGNEUR, S., CORDEIRO, M.N., TYTGAT, J. DINIZ, M.R.V, DE LIMA, M.E. Differential effects of the recombinant toxin PnTx4(5-5) from the spider *Phoneutria nigriventer* on mammalian and insect sodium channels. XIII Congress of the Brazilian Society of Toxinology, Campos do Jordão, 2015.

PAIVA, A.L.B , MATAVEL, A., PEIGNEUR, S., CORDEIRO, M.N., TYTGAT, J. DINIZ, M.R.V, DE LIMA, M.E. Spider toxin distinguish between mammalian and insect sodium channels. 18th World Congress of the International Society on Toxinology, Oxford, 2015.

PAIVA, A.L.B, MATAVEL, A., DE LIMA, M.E., DINIZ, M.R.V. Functional expression and purification of PnTx4(5-5), an insecticidal toxin from the spider *Phoneutria nigriventer*. XI Congress of the Pan American Section of the International Society on Toxinology and the XII Congress of the Brazilian Society of Toxinology, Guarujá, 2013.

- Não relacionados a tese:

DINIZ, M. R. V.; MACHADO, C. R. L. ; MUDADO, M. A. ; PAIVA, A. L. B. .Comparative Analysis of Transcriptomes of *Phoneutria pertyi* and *P. nigriventer* Venom Glands. 17th World Congress of the International Society on Toxinology & 4th International Scientific Symposium on All Things Venomous, Hawaii, 2012.

PAIVA, A. L. B.; MACHADO, C. R. L. ; MUDADO, M. A. ; DINIZ, M. R. V. Preliminary Transcriptome Analysis of the Spider *Phoneutria pertyi* Venom Glands and Comparison with the Transcriptome of the Spider *Phoneutria nigriventer*. XLI Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, Foz do Iguaçu, 2012.

10.2 Patentes

DE LIMA, M.E.; PAIVA, ALB ; BATISTA, C. F. ; ALVEA, D. P. ; DINIZ, M.R.V ; GOMEZ M.V. ; SILVA, J. F.; CASTRO JR, C. J. ; VIEIRA, L. B.; RIBEIRO, F. M.; CORDEIRO, M.N.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; BINDA, N. S.; DUARTE, I.D.G; FIGUEIREDO, S.G ; TEIXEIRA, E. H.; DE LIMA, M.E. Composição Farmacêutica com Atividade Analgésica à base de uma toxina de aranha, proteína de fusão, vetor de expressão dessa toxina e usos. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140314814, data de depósito: 16/12/2014. Instituição de registro: INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

10.3 Artigos completos em periódicos

- Manuscrito submetido à revista *Biochimie* e submetido novamente após pequenas correções sugeridas pelo revisor:

Differential effects of the recombinant toxin PnTx4(5-5) from the spider *Phoneutria nigriventer* on mammalian and insect sodium channels

Ana L. B. Paiva ^{a,c}, Alessandra Matavel ^a, Steve Peigneur ^b, Marta N. Cordeiro ^a, Jan Tytgat ^b, Marcelo R.V. Diniz ^a, Maria Elena de Lima ^{c*}.

^a Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Toxicology and Pharmacology, KU Leuven, Leuven, Belgium.

^c Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

- *Corresponding author: Maria Elena de Lima – Lab.Venenos e Toxinas Animais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. melenalima@icb.ufmg.br, lima.mariaelena@gmail.com

Abbreviations: NMDA: N-methyl-D-aspartate, VGSCs: Voltage-gated sodium channels, EK: enteroquinase, TEV: Tobacco Etch Virus,

Abstract

The toxin PnTx4(5-5) from the spider *Phoneutria nigriventer* is extremely toxic/lethal to insects but has no macroscopic behavioral effects observed in mice after intracerebral injection. Nevertheless, it was demonstrated that it inhibits the N-methyl-D-aspartate (NMDA) - subtype of glutamate receptors of cultured rat hippocampal neurons. PnTx4(5-5) has 63% identity to PnTx4(6-1), another insecticidal toxin from *P. nigriventer*, which can slow down the sodium current inactivation in insect central nervous system, but has no effect on Na_v1.2 and Na_v1.4 rat sodium channels. Here, we have cloned and heterologously expressed the toxin PnTx4(5-5) in *E. coli*. The recombinant toxin rPnTx4(5-5) was tested on the sodium channel Na_vBg from the

cockroach *Blattella germanica* and on mammalian sodium channels Na_v1.2-1.6, all expressed in *Xenopus laevis* oocytes. We showed that the toxin has different affinity and mode of action on insect and mammalian sodium channels. The most remarkable effect was on Na_vBg, where rPnTx4(5-5) strongly slowed down channel inactivation (EC₅₀=212.5 nM), and at 1 μM caused an increase on current peak amplitude of 105.2 ± 3,1%. Interestingly, the toxin also inhibited sodium current on all the mammalian channels tested, with the higher current inhibition on Na_v1.3 (38.43 ± 8.04%, IC₅₀= 1.5 μM). Analysis of activation curves on Na_v1.3 and Na_v1.5 showed that the toxin shifts channel activation to more depolarized potentials, which can explain the sodium current inhibition. Furthermore, the toxin also slightly slowed down sodium inactivation on Na_v1.3 and Na_v1.6 channels. As far as we know, this is the first araneomorph toxin described which can shift the sodium channel activation to more depolarized potentials and also slows down channel inactivation.

Keywords:

Phoneutria nigriventer

PnTx4(5-5)

Recombinant toxin

Insecticide toxin

Sodium channel

1. Introduction

Voltage-gated sodium channels (VGSCs) are responsible for the initiation of action potentials in neurons and other excitable cells. They are integral heteromeric membrane proteins composed of a pore-forming α-subunit of 220 to 260 kDa and auxiliary β-subunits of 30 to 40 kDa [1]. The α-subunit consists of four homologous domains (I-IV), each containing six transmembrane segments (S1-S6). The S5-S6 segments collectively form the central ion conduction pore for Na⁺, with the S1-S4 segments forming the surrounding voltage sensors [2,3]. Because of key physiological roles of VGSCs in excitability of vertebrates and invertebrates, they are frequently targeted by a variety of toxins from diverse venomous animals. The ability of such toxins to discriminate between closely related molecular isoforms renders them important tools to study sodium channels. Elucidating their mechanism of action and identifying their molecular binding sites are the first challenges to overcome before considering toxins as potential lead compounds for drug discovery.

The venom from the South American spider *Phoneutria nigriventer* contains several neurotoxic disulfide-rich peptides of 30-80 amino acid residues, which act on ion channels and other receptors of neurological and neuromuscular systems of insects and mammals. In the first studies of identification of these neurotoxins, the venom was separated by bioassay-guided purifications in four main chromatographic fractions: PhTx1, PhTx2, PhTx3 and PhTx4 [4,5]. Toxins from fraction PhTx1 and PhTx2 are very toxic to mice and it has been demonstrated that they can inhibit or modulate mammalian sodium channels [6–9], for a review see [10]. Unlike the other fractions, PhTx4 has a much weaker toxic effects on mice but is extremely toxic/lethal to insects, causing hyperactivity and paralysis preceded by excitatory effects. Toxins PnTx4(6-1) and PnTx4(5-5), purified from PhTx4 fraction, have high insecticidal activity and no macroscopic behavioral effects when injected intracerebral in mice [5,11]. PnTx4(6-1) stimulated glutamate release at neuromuscular junctions in cockroach [12] and slowed down sodium current inactivation in insect central nervous systems [13]. However, PnTx4(6-1) had no apparent effects on mammalian neuronal or skeletal muscle sodium channels reconstituted in *Xenopus* oocytes [13].

The toxin PnTx4(5-5) has 47 amino acid residues, including ten cysteines. Despite the fact that this toxin does not show apparent toxicity to mice, it can inhibit the NMDA subtype of the ionotropic glutamate receptors of cultured rat hippocampal neurons [11]. PnTx4(5-5) shares 63% sequence identity with toxin PnTx4(6-1) (Fig. 1), that was previously shown to act on the insect sodium channel. Thus, we decided to investigate if the insecticidal effect of PnTx4(5-5) is also due to an action on the insect sodium channel and furthermore, if it could act on mammalian sodium channels. However, the difficulty in obtaining large amounts of venom and isolating its toxins represent a limiting factor for carrying out studies on *P. nigriventer* toxins. To overcome this problem, in this study we have cloned and heterologously expressed the toxin PnTx4(5-5) in *E. coli*. The recombinant toxin (rPnTx4(5-5)) was tested on the mammalian sodium channel isoforms Na_v1.2-1.6 and on Na_vBg from the cockroach *Blattella germanica*, expressed in *Xenopus leavis* oocytes. Interestingly, our results show that this toxin exhibits differential affinity and mode of action on insect and mammalian sodium channels. These results might be useful in understanding the molecular mechanisms of spider gating modifier toxins involved on selectivity for insect and mammalian sodium channels.

```

          10          20          30          40
PnTx4(5-5) CADINGACKSDCDCCGDSVTCDCYWSDSCKCRESNFKIGMAIRKKF-C
PnTx4(6-1) CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSKSKCKREAAIVIYTAPKKKLTG
          *   *   *           ****           *           ***** ** ** **

```

Figure 1- Sequence alignment between *Phoneutria nigriventer* toxins PnTx4(5-5) and PnTx4(6-1). Their overall identity is 63%. Cystein residues are highlighted in grey. Different amino acids are denoted by an asterisk (*).

2. Materials and Methods

2.1. Expression vector construction

In order to express the rPnTx4(5-5), we constructed a modified vector pET32c(+). The recognition site of EK (Enterokinase) protease was switched for the TEV (Tobacco Etch Virus) protease recognition site between the coding sequences for the fusion partner thioredoxin and for the rPnTx4(5-5) (Fig. 2A). This strategy was used to optimize the posterior cleavage of the thioredoxin-rPnTx4(5-5) fusion protein, since EK was observed to have lower cleavage yielding and produce unspecific cleavage in some proteins [14]. We designed a specific forward iniciador containing the sequence codifying for the recognition site of TEV protease (bold): 5' **GGTACCGAAAATCTGTATTTCCAGGGA** TGCGCCGATATTAACGGT 3' and a specific reverse iniciador: 5' CTCGAGTTAACAGAATTTCTTTCTGAT 3'. The forward and reverse iniciadors also contained KpnI and XhoI restriction enzyme sites respectively (underlined) and were used to amplify the sequence codifying for PnTx4(5-5) from the first strand cDNA. The cDNA was previously synthesized from total RNA isolated from *Phoneutria nigriventer* venom glands, using the RT-PCR kit SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen). The amplified product was cleaved with KpnI and XhoI and ligated into similarly digested pET32c(+). The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* DH5 α and positive clones were confirmed by DNA sequencing using the automated sequencer ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

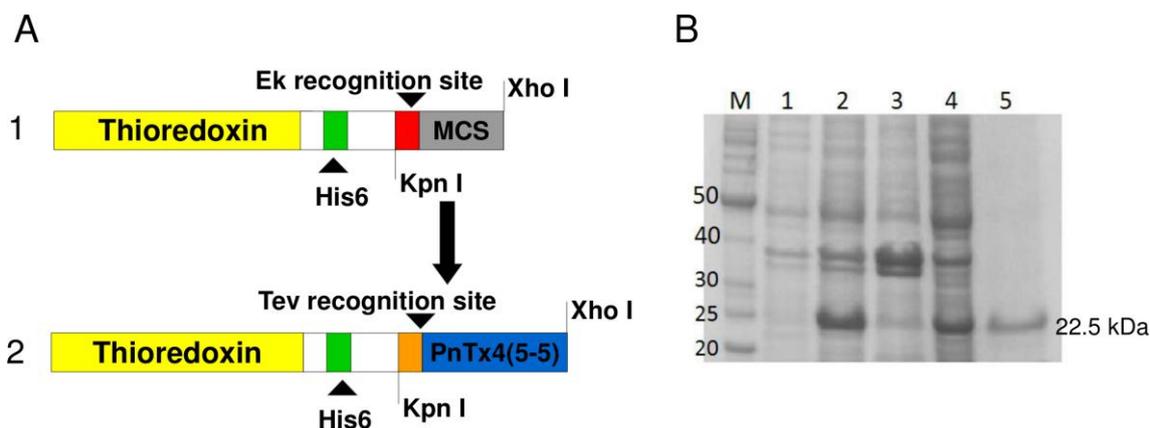


Figure 2- Initial steps of the production of the recombinant toxin rPnTx4(5-5). A) Schematic representation of the construct in the vector pET32c for the expression of rPnTx4(5-5) fused to Thioredoxin. The sequence codifying for the recognition site for enterokinase present in the original vector (1) was switched by the recognition site for TEV protease in the vector with the construct (2). MCS: Multiple cloning site. B) SDS-PAGE showing the expression and purification of the fusion protein thioredoxin-rPnTx4(5-5). Lane M: Molecular weight markers, Lane 1: Cell culture extract before induction, Lane 2: Cell culture extract after 3h IPTG induction, Lane 3: Cell lysate pellet, Lane 4: Cell lysate supernatant, Lane 5: Eluate from Ni-chelating affinity chromatography of the fusion protein.

2.2. Protein expression and purification

E. coli (Rosetta-gami (DE3) pLysS) transformed with the recombinant plasmid were cultured in LB medium containing 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol at 37° C until the OD₆₀₀ value was between 0.6 - 0.7. 1mM IPTG was then added to induce the expression of the fusion protein thioredoxin-rPnTx4(5-5) and cells continued to grow at a temperature of 25° C for 4h. After growing, cells from the induced culture were harvested by centrifugation, the pellets were resuspended in binding buffer (30 mM imidazole, 500 mM NaCl and 20 mM NaHPO₄, pH 7.4) and lysed by sonication. The supernatant containing the recombinant fusion protein was loaded into the Ni-chelating affinity column HisTrap HP (GE Healthcare). Unbound proteins were eluted from the column with binding buffer and the recombinant fusion proteins were eluted with a stepwise gradient of 0 to 100% of Elution buffer (500 mM imidazole, 500 mM NaCl and 20 mM NaHPO₄, pH 7.4). The chromatographic fractions were analyzed by SDS-PAGE 12.5%. The fractions containing the thioredoxin-

rPnTx4(5-5) fusion protein were pooled and solubilized in Tris 50 mM, EDTA 0.5 mM, by filtration gel chromatography, in the column HiTrap HP Desalting (GE Healthcare). Subsequently, the fusion protein was digested by TEV protease overnight at room temperature, in the same buffer containing 3 mM glutathione/0.3 mM oxidized glutathione to maintain TEV protease activity and promote folding of the protein. Products were subjected to reverse-phase HPLC on the column Sephasil Peptide C18 5 μ ST 4.6/250 (Amersham) using a gradient of 20–60% Solvent B (0.1% trifluoroacetic acid –TFA, in acetonitrile) in Solvent A (0.1% TFA in water) over 100 min.

2.3. Mass spectrometry analysis

After reverse-phase HPLC purification, the recombinant toxin rPnTx4(5-5) released from fusion to thioredoxin, was detected by mass spectrometry (MS) using a MALDI-TOF/TOF MS AutoFlex III (Bruker Daltonics, USA) instrument in positive/reflector mode controlled by Flex-Control software. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid was used as matrix and instrument calibration was achieved by using Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics, USA) as reference. Samples were spotted to MTPAnchorChip-400/384 (Bruker Daltonics, USA) targets using standard protocols for the dried droplet method. MS data analysis was performed by using the Flex-Analysis software (Bruker Daltonics, USA).

2.4. Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectra of the recombinant and native PnTx4(5-5) were obtained on a JASCO J-815 spectropolarimeter (Jasco). The spectra were measured at room temperature, from 260 to 190 nm, with a 1 mm path-length cell. The toxins were dissolved in water at a concentration of 0.15 mg/ml. Data were collected at 1 nm with a scan rate of 100 nm/min and a time constant of 1 s. CD spectra measurement was performed by averaging three scans.

2.5. Insect toxicity assay

To evaluate if the recombinant toxin has biological activity similar to the native one, we performed insecticidal activity assay on houseflies (*Musca domestica*) as described by Figueiredo and colleagues (1996). We injected doses of 5 ng, 10 ng (corresponding to

the LD₅₀ of 9,3ng/housefly for the native toxin) and 100 ng in groups of ten houseflies each.

2.6. Electrophysiological recordings

For expressing VGSCs in *Xenopus laevis* oocytes, rNa_v1.2/pCLT1, rNaV1.3/pNa3T, rNaV1.4/pUI-2, hNaV1.5/pSP64T, mNaV1.6/pLCT1, hβ1/pGEM-HE, rβ1/pSP64T, BgNaV1.1/pGH19 and tipE/pGH19 linearized vectors were transcribed using T7 or SP6 mMMESSAGE-mMACHINE transcription kits (Ambion, USA). Oocytes were surgically removed from anaesthetized adult frogs and treated as described previously [15]. Stage V and VI oocytes were manually selected, and injected with up to 50 nl of cRNA at a concentration of 1 ng/nl using a micro-injector (Drummond Scientific, USA). The cells were kept at 16° C for 1-5 days in ND96 solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4 with NaOH) supplemented with 50 mg/l gentamycin sulfate and 180 mg/l theophylline.

Whole-cell currents were recorded using the two-electrode voltage-clamp technique in a GeneClamp 500 amplifier (Axon Instruments, USA), controlled by a pClamp data acquisition system (Axon Instruments, USA). Voltage and current electrodes were filled with 3M KCl and had resistances between 0.7 and 1.5 MΩ. Data were sampled at a frequency of 20 kHz and low-pass filtered at 2 kHz using a 4-pole low-pass Bessel filter. Leak was subtracted using a $-P/4$ protocol. Representative whole-cell currents were elicited by a 100 ms voltage pulse to 0 mV from a holding potential of -90 mV. Current–voltage (I-V) relationships were determined by 100 ms step depolarization ranging from -90 to 65 mV with 5-mV increments. The sodium conductance (g_{Na}) was calculated according to equation 1: $g_{Na} = I_{Na}/(V - V_{rev})$, where I_{Na} represents the Na⁺ current peak amplitude at a given test potential V , and V_{rev} is the reversal potential. The values of g_{Na} were normalized and plotted as a function of voltage and fitted using the Boltzmann equation (equation 2): $g_{Na}/g_{Na(max)} = [1 + (\exp(Vg - V)/k)]^{-1}$, where $g_{Na(max)}$ represents maximal sodium conductance, Vg is the voltage corresponding to half-maximal conductance, and k is the slope factor. To examine the toxin-induced effects on the steady-state inactivation process, a standard two-step voltage protocol was applied consisting of 100 ms conditioning, 5 mV step prepulses ranging from -90 to 65 mV, followed by 50 ms test pulse to 0 mV. Data were normalized and plotted against prepulse potential. Experiments with non-inactivating component were fitted using the modified Boltzmann equation (equation 3): $I_{Na}/I_{Na(max)} = \{(1 - C)/[1 + \exp(V - Vh)/k]\} + C$, where Vh is the voltage corresponding to half-maximal inactivation, V is the prepulse voltage, k is the slope factor, and C is the non-

inactivating sodium current fraction. Control experiments were fitted using ordinary Boltzmann equation, where the C component was suppressed (equation 4): $I_{Na}/I_{Na(max)} = (1 - C)/[1 + \exp(V - V_h)/k]$.

The dose response effect for Na_vBg was calculated by plotting the proportion of sustained current (mean of the current as measured between 45 to 50 ms, designated as *I_{ss}*) in respect to the peak of the ionic current (*I_{peak}*) as a function of toxin concentration. For Na_v1.3 the dose response effect was calculated by plotting the proportion of current inhibition in respect to the peak of the ionic current (*I_{peak}*) as a function of toxin concentration. The data were fitted with the simple rectangular hyperbolic equation (equation 5): $y = P_{max} * [toxin] / (EC_{50} + [toxin])$, where P_{max} is the maximum toxin-induced effect, [toxin] is the toxin concentration and EC_{50} is the toxin concentration at half-maximal efficacy. All data were analyzed using Clampfit 10.4 (Molecular Devices, USA), Origin 9.0 (OriginLab, USA) and SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Germany) software. Paired student t test was applied for assessment of statistical significance ($p < 0.05$). Data are shown as averages \pm SEM of at least of 3 experiments.

3. Results

3.1. rPnTx4(5-5) expression and purification

The recombinant toxin rPnTx4(5-5) was expressed in fusion with thioredoxin in the N-terminal portion, mostly in the soluble form. Protein expression and purification were analyzed under denaturing conditions by SDS-PAGE (Fig. 2B). Extracts from the induced culture showed the presence of a protein band of approximately 22.5 kDa, which is consistent with the theoretical molecular weight calculated for the thioredoxin-rPnTx4(5-5) fusion protein. After sonication, the soluble cytoplasm extracts were subjected to affinity chromatography which led to the partial purification of the 22.5 kDa product. The product of the fusion protein digestion by TEV protease was applied to reverse phase Sephasil Peptide C18 5 μ ST4.6/250 column and rPnTx4(5-5) appeared as a major peak in the RP-HPLC chromatogram, eluted 38 min after injection (Fig. 3A). The final yield of the recombinant protein was 0.2 mg/ liter of culture.

3.2. Characterization by MS

The chromatographic fraction containing rPnTx4(5-5) was further analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). The observed mass for the recombinant toxin was 5230.3 Da which is in accordance with the calculated mass of 5231.38 Da, considering that all cysteine residues are oxidized (Fig. 3B). Mass spectrometry analysis also confirmed the presence of an additional glycine residue in the N-terminal when compared to native toxin (5176 Da). This extra residue in the recombinant toxin is a vestige of the cleavage site of TEV protease.

3.3. CD spectra

As showed by Fig. 3C, the CD spectra of the recombinant and native PnTx4(5-5) are superimposed, indicating that their secondary structures are very similar. Both proteins have a minimum at 205 nm and a maximum at 191 nm. Estimation of secondary structure contents from their CD data revealed that the recombinant and native toxins have 39.9% and 41.1% of beta-sheet content respectively. It was not possible to construct a homology based model of this toxin because of the lower degree of homology to toxins deposited so far in the Protein Data Bank (PDB). Despite that, based on its cysteine framework and its beta sheet content we can speculate that it adopts the Inhibitor Cystine Knot (ICK) motif.

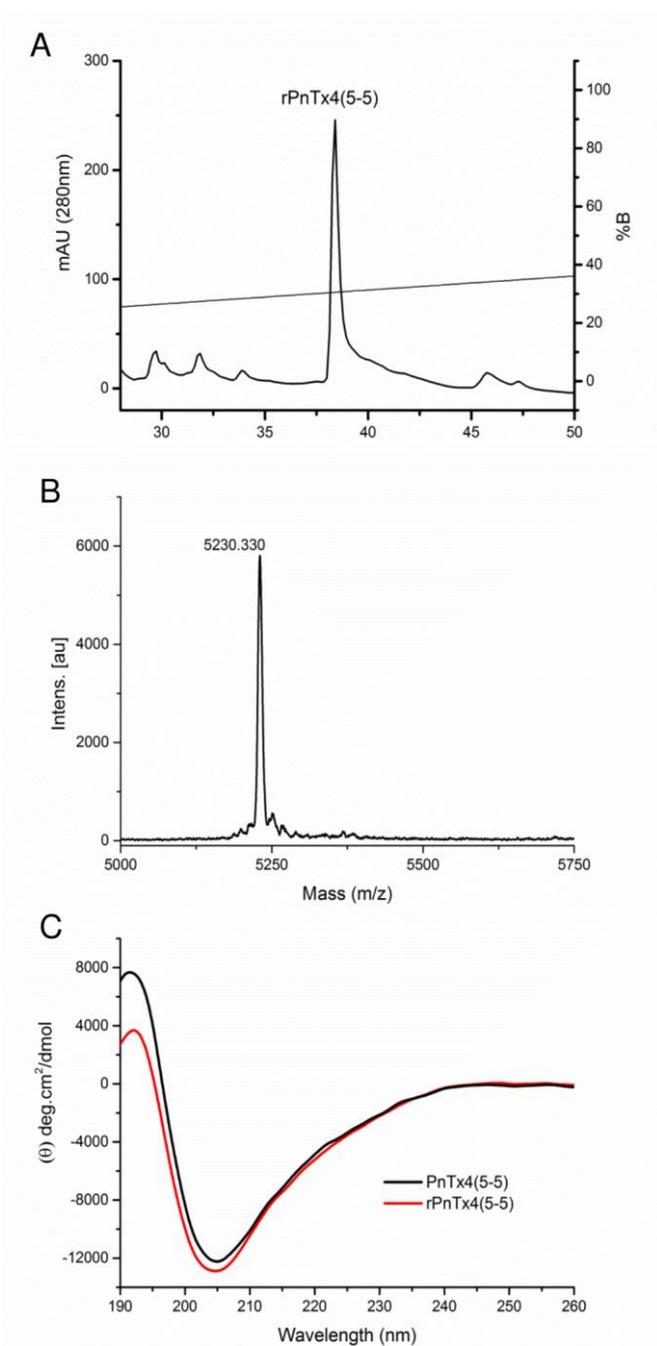


Figure 3 - Purification and characterization of rPnTx4(5-5). A) RP-HPLC chromatogram showing the purification of rPnTx4(5-5) after releasing from fusion protein by TEV protease. The recombinant toxin was eluted with gradient of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid. B) MALDI TOF/TOF MS analysis after rPnTx4(5-5) RP-HPLC purification. The expected mass was 5231.38 Da, and the measured mass was 5230.33 Da. C) Comparison of CD spectra of native and recombinant PnTx4(5-5).

3.4. Biological activity of rPnTx4(5-5)

The results from the insect toxicity assay showed that the recombinant toxin has biological activity similar to the native one. We injected three different doses (5, 10, 100ng) of rPnTx4(5-5) in houseflies and monitored them during 24 h. It was observed that rPnTx4(5-5) elicited the same symptoms of the native toxin: knock-down and incapacity to re-invert, trembling with uncoordinated movements, active movements of the legs, active extensions and contractions of the proboscis and even death. As for the native toxin, the duration and intensity of the effects were dosage-dependent. No symptoms were observed in the control group.

3.5. Pharmacological effects of rPnTx4(5-5) on voltage-gated sodium channels

We evaluated the pharmacological effects of the recombinant toxin rPnTx4(5-5) on mammalian $\text{Na}_v1.2-1.6$ and cockroach (*Blattella germanica*) Na_vBg sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. We observed that rPnTx4(5-5) has different affinity and mechanism of action on insect and mammalian sodium channels that have been tested.

The most remarkable effect of the recombinant toxin was on the inactivation kinetics and peak amplitude of the insect sodium channel, as illustrated by the whole-cell Na^+ currents (Fig. 4A). rPnTx4(5-5) (1 μM) strongly slowed down inactivation of the channel, resulting in an increase in Na^+ peak-amplitude by $105.2 \pm 3.09\%$ at -5 mV ($n = 3$; $p < 0.05$), as shown in the IV curve (Fig. 4B), and it reflects the increase of $122.3 \pm 21.3\%$ in the channel conductance. Toxin-induced increase in I_{Na} was not associated with a shift in the midpoint of activation (V_g), since the voltage for half activation did not change significantly. However, the slope factor (kg) became more steep in the activation curve (8.9 ± 0.19 in the control condition and 7.0 ± 0.43 in the presence of 1 μM rPnTx4(5-5)) (Fig. 4C). Since the channel did not inactivate during the conditioning pulse, it is meaningless to show the steady-state inactivation curve.

Figure 4D shows that the ratio of sustained current (I_{ss} means the average of the non-inactivating current measured at the end of the test pulse) for the peak of the ionic current (I_{peak}). In higher toxin concentration, the non-inactivating component becomes as large as the peak amplitude. To quantify the toxin-induced removal of fast inactivation, $I_{\text{ss}}/I_{\text{peak}}$ was plotted as a function of toxin concentrations in a dose-response curve. Fits of the obtained data for Na_vBg with the rectangular hyperbolic

equation resulted an EC_{50} of 212.5 nM and the maximum effect was obtained with 1 μ M (88%) (Fig. 4E).

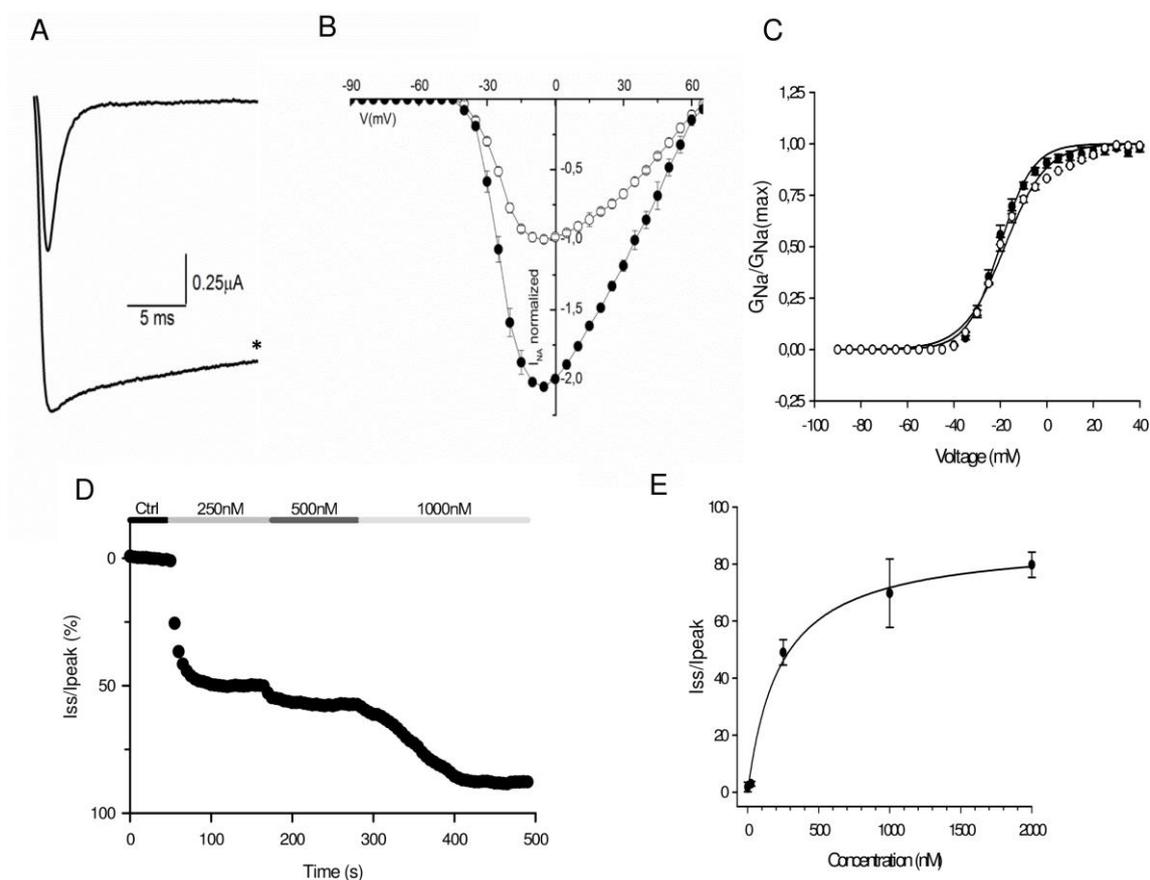


Figure 4 - Effects of rPnTx4(5-5) on the cockroach *B. germanica* sodium channel (Na_vBg) expressed in *X. leavis* oocytes. A) Representative whole-cell current traces in control and in presence of 1 μ M rPnTx4(5-5) (*). B) Current–voltage ($I \times V$) relationships in control (\circ) and in presence of 1 μ M rPnTx4(5-5) (\bullet). C) Activation of the conductance in control (\circ) and in presence of 1 μ M rPnTx4(5-5) (\bullet), fitted with the Boltzmann equation. D) Ratio of the sustained current (current mean between 45 to 50 ms – I_{ss}) for the peak of the ionic current (I_{peak}) increase with the rPnTx4(5-5) concentration. E) Dose response curve of rPnTx4(5-5). The curve was obtained by plotting the relative I_{ss}/I_{peak} values in function of the toxin concentration, fit with rectangular hyperbolic equation (EC_{50} = 212.5 nm, maximal effect 88%). Each point is the average of at least 3 experiments in oocytes.

In contrast with the effect observed on the insect channel, rPnTx4(5-5) (1 μ M) inhibited the peak amplitude of all the mammalian channels tested (Fig. 5). The highest current inhibition was observed for Na_v1.3 (38.4 \pm 8.1%), in which the channel conductance (g_{NA}) was significantly reduced from 16 \pm 1.8 to 12 \pm 0.9. However, in all other mammalian channels conductance was not modified. Thus, current inhibition on mammalian channels is probably due to the small but significant shift in V_g to more depolarized potentials, as observed on the channels Na_v1.5 and Na_v1.3 (Figs. 6A and B). V_g was shifted on Na_v1.3 from -19.7 \pm 0.6 to -14.1 \pm 0.4 mV and on Na_v1.5 from -33.5 \pm 1.0 to -30.3 \pm 0.9 in control conditions and after the addition of 1 μ M of toxin, respectively. This shift could have potentiated the inhibition seen on Nav1.3 (Fig. 5). The percentage of Na_v1.3 current inhibition was plotted against the toxin concentration and fitted using the rectangular hyperbolic equation, resulting in an IC₅₀ of 1.5 μ M (Fig. 6C).

Furthermore, we observed that rPnTx4(5-5) also slowed down the inactivation of Na_v1.3 and Na_v1.6 channels (Fig. 5), that reached 12.0 \pm 1.5 % of non-inactivating component in the end of the pulse test on Na_v1.3 channel. Analysis of the steady-state inactivation curves revealed that the toxin had significant effect on all parameters of the steady-state inactivation on Na_v1.3 (n=5, p < 0.05); it negatively shifted V_h (control -24.8 \pm 1.5 and rPnTx4(5-5) -30.3 \pm 2.2), increased the slope factor (kh) of the voltage dependence (control 9.2 \pm 0.46 and rPnTx4(5-5) 11.5 \pm 0.54) and caused the appearance of a sustained component of the inactivation (C) in the presence of the toxin (0.135 \pm 0.04).

In order to confirm if the effects of the recombinant toxin are comparable to the native PnTx4(5-5), we tested the native toxin on Na_v1.3 and Na_v1.5 channels (Fig. 7A) and compared with the recombinant one. The percentage of maximal inhibition at 1 μ M on Nav1.3 was 38.4% \pm 8.1 and 36.7 \pm 6.3 and on Nav1.5 it was 18.3% \pm 1.6 and 20.3 \pm 1.2 for the recombinant and native toxin, respectively (Fig. 7B). Our results show that, when compared in the same channel, the effect of both were not statistically different (p>0.05).

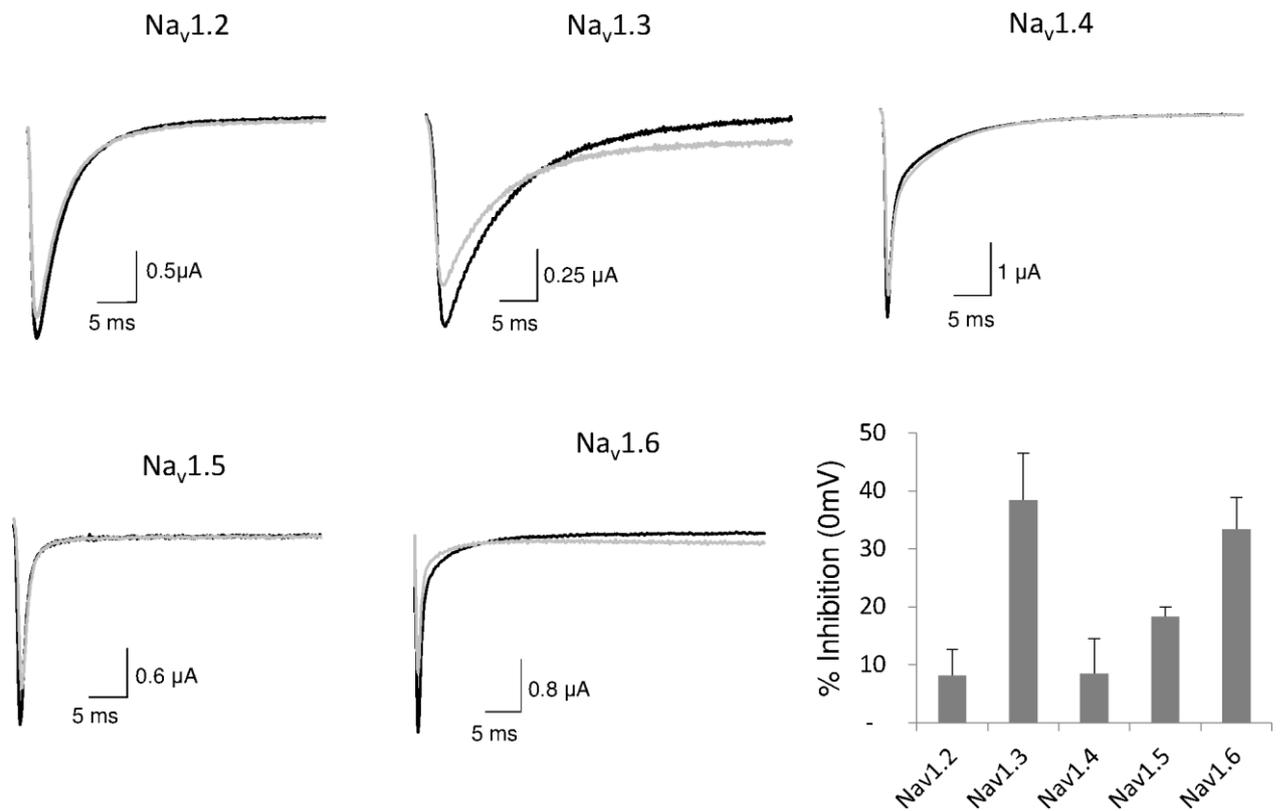


Figure 5 - Effect of rPnTx4(5-5) on mammalian sodium channel subtypes Nav1.2-Nav1.6 expressed in *X. leavis* oocytes. Representative whole-cell current traces in control (black traces) and in presence of 1 μM rPnTx4(5-5) (gray traces). The bar chart at the bottom-right shows the percentage of peak current inhibition for each channel. Data are showed as the mean ± SEM of at least three independent experiments (n ≥ 3).

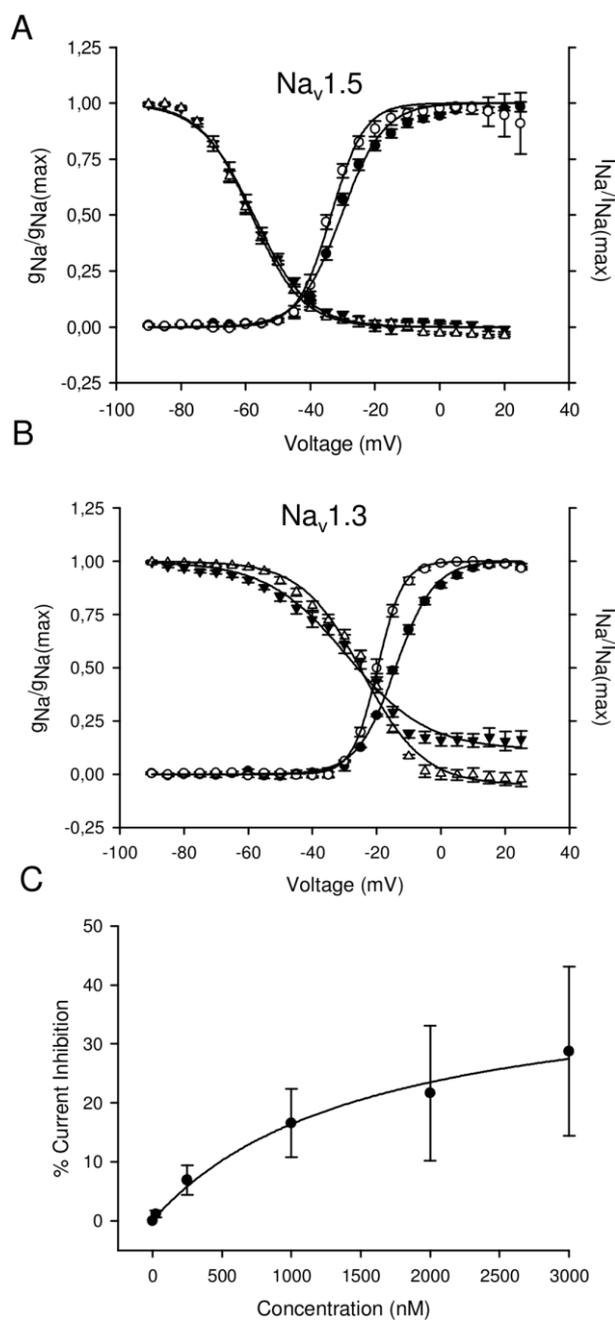
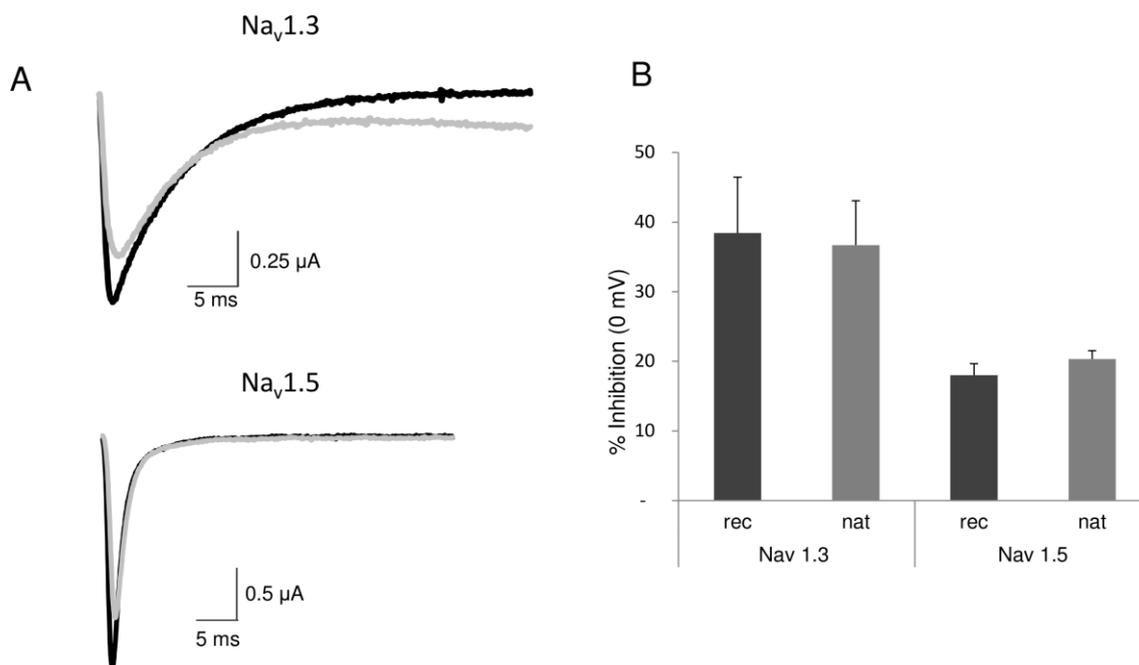


Figure 6 – Effects of rPnTx4(5-5) on Nav 1.5 and Nav1.3. Activation and steady-state inactivation curves in control (\circ and Δ , respectively) and in presence of $1 \mu\text{M}$ rPnTx4(5-5) (\bullet and \blacktriangledown , respectively) for Nav 1.5 (A) and Nav 1.3 (B), fit with the Boltzmann equation. C) Dose-response curve of rPnTx4(5-5) for Nav1.3. The curve was obtained by plotting current inhibition as a function of toxin concentration, the points were fitted using rectangular hyperbolic equation ($\text{IC}_{50}=1.5\mu\text{M}$). Data are showed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments ($n \geq 3$).



7- Effects of native PnTx4(5-5) on Nav1.3 and Nav1.5 channels. A) Representative whole-cell current traces in control (black traces) and in presence of 1 μ M PnTx4(5-5) (gray traces). B) Average percentage of native PnTx4(5-5) peak current inhibition for Nav1.3 and Nav1.5 compared to the recombinant toxin. The effects of PnTx4(5-5) native and recombinant on both channels were not statistically different ($p > 0.05$).

4. Discussion

Spiders venoms represent a rich source of bioactive peptides, however, studies on these molecules are limited by the tiny amounts of material obtained by conventional chromatographic separation. To overcome this limitation, in this study, PnTx4(5-5), a characterized insect toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* [11], was produced by recombinant techniques. Analysis of mass spectrometry and circular dichroism spectrum (Figs. 3B e 3C) indicated that the recombinant toxin was properly folded and has a secondary structure similar to the native toxin. Biological assays on houseflies (*Musca domestica*) also revealed that the recombinant toxin elicited the same symptoms than the native one. rPnTx4(5-5) was tested on mammalian (Nav1.2-1.6) and cockroach (NavBg) voltage-gated sodium channels, expressed in *Xenopus* oocytes. The effects of the rPnTx4(5-5) on the channels Nav1.3 and Nav1.5 were very similar to the native one (Fig.7), indicating that the pharmacological effects of the recombinant toxin on sodium channels can be comparable to the native toxin.

Electrophysiological experiments showed that rPnTx4(5-5) is a voltage-gated sodium channel modifier and has differential effects and affinity on insect and mammalian voltage-gated sodium channels. We showed that rPnTx4(5-5) causes a dramatic blockage of the cockroach channel (NavBg) fast inactivation, which induces a remarkable increase of the current amplitude upon depolarization (Figs 4A and 4B). It has been well established that toxins that block or delay sodium channel inactivation (i.e. α -toxins) bind to the site 3 on sodium channels surface, located in the loop between DIV-S3-S4. The binding of the toxins to this site impair the outward movement of the DIV-S4 transmembrane segment, which inhibits the conformational changes that trigger fast inactivation [16–21]. The effect of rPnTx4(5-5) on the insect sodium channel was similar to the α -insect toxins from scorpions [22,23] and some other spiders toxins which inhibit channel inactivation [24,25], some called α -like toxins. According to Martin-Eauclaire and colleagues [26] the α -like toxins and the α -insect toxins are distinct from each other in that α -insect toxins are non-toxic to mammals when injected into the brain, even at high concentration, and the α -like toxins are highly toxic for both mammals and insects by intracerebral and subcutaneous injections (e.g., Lqh III from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* and BmK M1 from *Buthus martensii* Karsch) [27,28]. The α -like scorpion toxins, Bom III and IV (from *Buthus occitanus mardochei*), slow down sodium channel inactivation in insects by occupying a site that partially overlap or be in a close proximity to site 3 [29]. De Lima and collaborators [13] demonstrated that

the toxin PnTx4(6-1) competes with the α -like toxin ^{125}I -Bom IV for binding on the insect sodium channel. Furthermore, recently we showed that β/δ -PrIT1, an insect toxin purified from the venom of *Phoneutria reidy* with a resolved partial sequence, has similarity with PnTx4(5-5) and fully competed with ^{125}I -Bom IV in nerve cord synaptosomal preparation from cockroach. [30]. Due the high similarity in amino acid sequence between those toxins and PnTx4(5-5) (i.e. Fig.1) it is likely that they act in the same macrosite on the insect sodium channel. However, PnTx4(5-5), PnTx4(6-1) and β/δ -PrIT1 have no macroscopic behavioural effects on mammals when injected via intracerebral, and seem to be variants from the α -like toxins.

Unlike PnTx4(6-1), which did not show activity when tested on the $\text{Na}_v1.2$ and $\text{Na}_v1.4$ mammalian sodium channels, we showed that rPnTx4(5-5) was able to inhibit sodium current on all mammalian sodium channels tested with the following order of blockage efficacy: $\text{Na}_v1.3 > \text{Na}_v1.6 > \text{Na}_v1.5 > \text{Na}_v1.4 \geq \text{Na}_v1.2$ (Fig. 5). For $\text{Na}_v1.3$ and $\text{Na}_v1.5$, we detected a small but significant shift of V_g to more depolarized potentials and an increase in the activation curve slope factor (Figs. 6A and 6B). This effect was also observed on the toxin ProTx-II from the spider *Thrixopelma pruriens* [31–33] and on some other tarantula toxins (e.g., *Jingzhaotoxin-III* [34]; PaurTx3, CcoTx1 and CcoTx2, [35]. More recently, this effect was also described for the toxin Hm-3 from the araneomorph spider *Heriades melloteei* [36]. Analysis by site-directed mutagenesis on specific sodium channels amino acids residues indicated that some of these gating modifier toxins can interact with receptor site 4 [37,38]. Classical β -toxins, such as Ccs-IV from the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, bind to the site 4 and shift the activation potential to hyperpolarized voltages by trapping the DII-S4 to the activated position [39]. However, it has been proposed that this new class of toxins can bind to the extracellular linker between DII-S3-S4, trapping the voltage sensor in the inward, closed configuration, which reduces the open probability of the channel and shifts the activation potential to more depolarized voltages [37,40,41].

Furthermore, rPnTx4(5-5) was able to slightly inhibit inactivation on $\text{Na}_v1.3$ and $\text{Na}_v1.6$. This dual effect in modulating both activation and inactivation of specific sodium channels isoforms has also been identified for the toxin ProTx-II. It was demonstrated that ProTx-II can interact with the voltage sensors from three domains (DI, DII, and DIV) in rNav1.2a [42] and the voltage sensors of two domains (DII and DIV) in hNav1.7 [38]. Another spider toxin, JZTX-XI, when tested on Nav 1.5, also inhibited channel activation causing a depolarizing shift of the activation curve and a slowing down of the inactivation. It was suggested that JZTX-XI is a multi-site binding

toxin, interacting with multiple domains of Na_v1.5, including the voltage sensors in both DII and DIV [43].

As far as we know, PnTx4(5-5) is the first araneomorph toxin described which can shift the sodium channel activation to more depolarized potentials and also slows down channel inactivation. However, the effect seen in the mammalian sodium channel inactivation kinetic for rPnTx4(5-5) in our experiments was small, when compared with insect or the classical α -toxin AaIII, used to characterized the site 3 [44]. Then, we hypothesized that in mammals, the toxin binds to site 4 and impair DII-S4 to move as fast as it usually does, increasing the probability of sodium channels to open in the middle of the pulse test, instead of open in the beginning. This could lead to a decrease in the peak of the current and to a reduction of the apparent inactivation of the macroscopic current, without affecting the fast inactivation process. To verify this hypothesis, single channel experiments should be performed.

We point out that the toxin β/δ -PrIT1 has also a dual effect on insect sodium channel, but unlike PnTx4(5-5), it shifts the channel activation to more hyperpolarized potentials. Furthermore, β/δ -PrIT1 displaced about 30% of ¹²⁵I-Css IV, a beta toxin, in synaptosomes of rat brain, suggesting an effect on mammalian sodium channels [30]. These results indicate that this toxin may interact with different sites on sodium channels, including the domains IV (by blocking the fast inactivation process) and domains II and/or III (by promoting voltage sensor activation). PnTx4(5-5), as well as other insecticide toxins, which target both insect and mammalian sodium channels, represent important tools to study structure-function relationships related to the different affinity of some toxins on mammalian and insect sodium channels.

Although several toxins from the spider *Phoneutria nigriventer* have been characterized for their action on ion channels, little is known about their structure-function relationship. This is mainly due to their great variety of sequences and the low similarity to other spider toxins. Thus, it is difficult to construct homology-based structures, which could reveal key amino acids for their activity on ion channels. Most of the studies regarding the molecular basis for toxin affinity on sodium channels report that acidic residues on the sodium channel surface interact with basic residues and vicinal apolar amino acids of the toxin, via electrostatic interactions or hydrogen bonds [20,45,46]. For example, ProTx-II displays a bioactive surface containing hydrophobic and cationic residues found to be essential for binding to sodium channels [33]. Furthermore, two basic residues Lys or Arg at positions 27 and 29 are also involved in the interaction between closely related toxins isolated from tarantula venoms (including HNTX-V, HWTX-IV, PaurTx3, Ccotx1, and Ccotx2) and mainly acidic residues in the

voltage sensor of sodium channels domain II [47,48]. Thus, based on those previous studies from gating modifier toxins, we can speculate that the aromatic residues Y24, W25, F36 and positive residues K30 and R32 in PnTx4(5-5) could be involved in the interaction with the sodium channels. Site direction mutagenesis studies are in course in our laboratory and will be helpful to elucidate the structure-function of PnTx4(5-5) and clarify the basis for its differential selectivity for mammalian and insect sodium channels.

In conclusion, *Phoneutria nigriventer* toxin PnTx4(5-5) could be successfully expressed in heterologous system and presented secondary structure and pharmacological activity similar to the native one. rPnTx4(5-5) modified mammalian sodium channel like the native toxin, despite to an additional glycine in the N-terminus. Recombinant toxin showed a typical effect of site 3 α -toxin in insect sodium channel, blocking the channel fast inactivation kinetics and increasing the peak of the current. In addition, it inhibited mammalian sodium channels with the following order of potency $\text{Na}_v1.3 > \text{Na}_v1.6 > \text{Na}_v1.5 > \text{Na}_v1.4 \geq \text{Na}_v1.2$, suggesting that it binds in another site on the mammalian channel surface, likely site 4. Site-directed mutagenesis studies are in progress and will be helpful to elucidate the key amino acids involved in toxin-channel interaction.

Acknowledgments

We are grateful to D. Santos (UFMG, Brazil) for helping with MS experiments and to J. Magalhães and their students (UFMG, Brazil) for helping with CD analysis. The authors also thank Goldin (University of California, Irvine, CA, USA) for sharing rNaV1.2 and mNaV1.6; G. Mandel (State University of New York, Stony Brook, NY, USA) for sharing rNaV1.4; R. G. Kallen (Roche Institute of Molecular Biology, Nutley, NJ, USA) for sharing hNaV1.5; S. H. Heinemann (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany) for sharing the rat β 1 subunit; S. C. Cannon (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) for sharing the h β 1 subunit and Martin S. Williamson (Rothamsted Research, Harpenden, UK) for providing the tipE clone. J.T. was supported by the following grants: G.0433.12 and GOE3414N (F.W.O. Vlaanderen), IUAP 7/10 (Inter-University Attraction Poles Program, Belgian State, Belgian Science Policy) and OT/12/081 (KULeuven). ALBP was recipient of a PhD fellowship from FAPEMIG and CNPq. This work was supported by Brazilian fund agencies, as CAPES, CNPq and Fapemig, besides INCTTOX.

References

- [1] W. A. Catterall, From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels., *Neuron*. 26 (2000) 13–25. doi:10.1016/S0896-6273(00)81133-2.
- [2] S. Cestèle, W. A. Catterall, Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels, *Biochimie*. 82 (2000) 883–892. doi:10.1016/S0300-9084(00)01174-3.
- [3] W. A. Catterall, S. Cestèle, V. Yarov-Yarovoy, F.H. Yu, K. Konoki, T. Scheuer, Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins, *Toxicon*. 49 (2007) 124–141. doi:10.1016/j.toxicon.2006.09.022.
- [4] D.C. Rezende Júnior L, Cordeiro MN, Oliveira EB, Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the “armed” spider *Phoneutria nigriventer*, *Toxicon*. 29 (1991) 1225–33.
- [5] S.G. Figueiredo, M.E.L. Garcia, A. C. Valentim, M.N. Cordeiro, C.R. Diniz, et al., Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4 (6-1) from the venom of the “armed” spider *Phoneutria nigriventer*, *Toxicon*. 33 (1995) 83–93.
- [6] A. Matavel, J.S. Cruz, C.L. Penaforte, F. Prado, C.R. Diniz, M.N. Cordeiro, et al., Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2-6 1, *FEBS Lett*. 523 (2002) 219–223.
- [7] N. Martin-Moutot, P. Mansuelle, G. Alcaraz, R.G. Dos Santos, M.N. Cordeiro, M.E. De Lima, et al., *Phoneutria nigriventer* toxin 1: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with microconotoxin binding sites., *Mol. Pharmacol*. 69 (2006) 1931–1937. doi:10.1124/mol.105.021147.
- [8] A. Matavel, C. Fleury, L.C. Oliveira, F. Molina, M.E. De Lima, J.S. Cruz, et al., Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics, *Biochemistry*. 48 (2009) 3078–3088. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-65249116952&partnerID=40&md5=f287e7d37394064374fbfc00af80e2ab>.
- [9] A.O. Silva, S. Peigneur, M.R. V Diniz, J. Tytgat, P.S.L. Beirão, Biochimie Inhibitory effect of the recombinant *Phoneutria nigriventer* Tx1 toxin on voltage-gated sodium channels, *Biochimie*. 94 (2012) 2756–2763. doi:10.1016/j.biochi.2012.08.016.
- [10] M. E. De Lima, S. Gomes, A. Matavel, K. Pedrosa, C. Nunes, Spider Venoms, (2015) 1–24. doi:10.1007/978-94-007-6646-4.
- [11] S. G. Figueiredo, M. E. De Lima, M. Nascimento, C. R. Diniz, et al., Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the

- Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurones, *Toxicon*. 39 (2001) 309–317.
- [12] M.E. De Lima, S.G. Figueiredo, R.A. Mafra, A.M.C. Pimenta, M.N. Cordeiro, C.R. Diniz, Purification and pharmacological activity of two potent insecticidal neurotoxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom., *J. Venom. Anim. Toxins*. 3 (1997) 231-233.
- [13] M.E. De Lima, M. Stankiewicz, A. Hamon, S.G. De Figueiredo, M.N. Cordeiro, The toxin Tx4 (6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na⁺ current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3, *J. Insect Physiol*. 48 (2002) 53–61.
- [14] Z. Chen, S. Han, Z. Cao, Y. Wu, R. Zhuo, W. Li, Fusion expression and purification of four disulfide-rich peptides reveals enterokinase secondary cleavage sites in animal toxins, *Peptides*. 39 (2013) 145–151. doi:10.1016/j.peptides.2012.11.013.
- [15] H.P. Liman ER, Tytgat J, Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs, *Neuron*. 9 (1992) 861–871.
- [16] J.C. Rogers, Y. Qu, T.N. Tanada, T. Scheue, W.A. Catterall, Molecular Determinants of High Affinity Binding of α -Scorpion Toxin and Sea Anemone Toxin in the S3-S4 Extracellular Loop in Domain IV of the Na⁺ Channel Subunit, *J. Biol. Chem*. 271 (1996) 15950-15962. doi:10.1074/jbc.271.27.15950.
- [17] A. Cha, P.C. Ruben, A.L. George, E. Fujimoto, F. Bezanilla, Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na⁺ channel fast inactivation, *Neuron*. 22 (1999) 73–87.
- [18] M.F. Sheets, J.W. Kyle, R.G. Kallen, D.A. Hanck, The Na channel voltage sensor associated with inactivation is localized to the external charged residues of domain IVS4, *Biophys. J*. 77 (1999) 747–757.
- [19] B. Chanda, F. V Campos, B. Chanda, P.S.L. Beir, F. Bezanilla, Alpha scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels, *J Gen Physiol*. 132 (2008) 251- 263. doi:10.1085/jgp.200809995.
- [20] J. Wang, V.Y. Yarovoy, R. Kahn, D. Gordon, M. Gurevitz, T. Scheuer, W.A. Catterall, Mapping the receptor site for α -scorpion toxins on a Na⁺ channel voltage sensor Mapping the receptor site for α -scorpion toxins on a Na⁺ channel voltage sensor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 108 (2011). doi:10.1073/pnas.1112320108.
- [21] D. L. Capes, M. P. Goldschen-Ohm, M. Arcisio-Miranda, F. Bezanilla, B. Chanda, Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels, *J. Gen. Physiol*. 142 (2013) 101–112.
- [22] M. Eitan, E. Fowler, R. Herrmann, A. Duval, M. Pelhate, E. Zlotkin, A Scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure, and mode of action, *Biochemistry*. 29 (1990) 5941–5947.

- [23] D. Gordon, P. Savarin, M. Gurevutz, S. Zinn-Justin, Functional Anatomy of Scorpion Toxins Affecting Sodium Channels, *J. Toxicology* 17 (1998) 131-160. doi:10.3109/15569549809009247.
- [24] G. Corzo , N. Gilles , H. Satake , E. Villegas , L. Dai , T. Nakajima , J. Haupt , Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel, *FEBS Lett.* 547 (2003) 43-50. doi:10.1016/S0014-5793(03)00666-5.
- [25] G.M. Nicholson, M.J. Little, L.C. Birinyi-Strachan, Structure and function of delta-atracotoxins: lethal neurotoxins targeting the voltage-gated sodium channel, *Toxicon.* 43 (2004) 587–599.
- [26] M.F. Martin-Eauclaire, N. Abbas, B. Céard, J.P. Rosso, P.E. Bougis, Androctonus Toxins Targeting Voltage-Gated Sodium Channels, In: P. Gopalakrishnakone, E.F. Schwartz, L.D. Possani, R.C.R. de la Vega, editors. *Scorpion venoms*, Springer Dordrecht, Heidelberg, New York, London, 2014, pp 1-25.
- [27] I. Krimm, C. Bernard, I. Krimm, N. Gilles, P. Sautie, M. Stankiewicz, et al., NMR structures and activity of a novel alpha-like toxin from the scorpion *Leiurus Quinquestriatus* NMR Structures and Activity of a Novel α -Like Toxin from the Scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, (1999). doi:10.1006/jmbi.1998.2418.
- [28] C. Goudet, I. Huys, C. Goudet, I. Huys, E. Clynen, L. Schoofs, et al., Electrophysiological characterization of BmK M1 , an α -like toxin from *Buthus martensi Karsch venom*, *J Mol Biol.* 285 (2001) 1749-63. doi:10.1016/S0014-5793(01)02365-1.
- [29] D. Gordon, M.F. Martin-Eauclaire, S. Cestèle, C. Kopeyan, E. Carlier, R. Ben Khalifa, et al., Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 8034–8045. doi:10.1074/jbc.271.14.8034.
- [30] L.C. de Oliveira, F.V. Campos, S.G. Figueiredo, M.N. Cordeiro, B.R. Adaime, M. Richardson, et al., β/δ -PrIT1, a highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria reidy* (F.O. Pickard-Cambridge, 1897), *Toxicon.* 104 (2015) 73–82.
- [31] R.E. Middleton, V.A. Warren, R.L. Kraus, J.C. Hwang, C.J. Liu, G. Dai, et al., Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels, *Biochemistry.* 41 (2002) 14734–14747.
- [32] B.T. Priest, K.M. Blumenthal, J.J. Smith, V. a. Warren, M.M. Smith, ProTx-I and ProTx-II: Gating modifiers of voltage-gated sodium channels, *Toxicon.* 49 (2007) 194–201. doi:10.1016/j.toxicon.2006.09.014.
- [33] J.J. Smith, T.R. Cummins, S. Alphy, K.M. Blumenthal, Molecular interactions of the gating modifier toxin ProTx-II with Na v1.5: Implied existence of a novel toxin binding site coupled to activation, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12687–12697. doi:10.1074/jbc.M610462200.

- [34] Y. Xiao, J. Tang, Y. Yang, M. Wang, W. Hu, J. Xie, et al., Jingzhaotoxin-III, a novel spider toxin inhibiting activation of voltage-gated sodium channel in rat cardiac myocytes, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26220–26226. doi:10.1074/jbc.M401387200.
- [35] F. Bosmans, L. Rash, S. Zhu, S. Diochot, M. Lazdunski, P. Escoubas, et al., Four novel tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes., *Mol. Pharmacol.* 69 (2006) 419–429. doi:10.1124/mol.105.015941.
- [36] A. A. Berkut, S. Peigneur, M.Y. Myshkin, A.S. Paramonov, E.N. Lyukmanova, A.S. Arseniev, et al., Structure of Membrane-active Toxin from Crab Spider *Heriades melloteei* Suggests Parallel Evolution of Sodium Channel Gating Modifiers in Araneomorphae and Mygalomorphae, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 492–504. doi:10.1074/jbc.M114.595678.
- [37] Y. Xiao, J.P. Bingham, W. Zhu, E. Moczydlowski, S. Liang, T.R. Cummins, Tarantula huwentoxin-IV inhibits neuronal sodium channels by binding to receptor site 4 and trapping the domain II voltage sensor in the closed configuration, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 27300–27313. doi:10.1074/jbc.M708447200.
- [38] Y. Xiao, K. Blumenthal, J.O. Jackson, S. Liang, T.R. Cummins, The tarantula toxins ProTx-II and huwentoxin-IV differentially interact with human Nav1.7 voltage sensors to inhibit channel activation and inactivation., *Mol. Pharmacol.* 78 (2010) 1124–1134. doi:10.1124/mol.110.066332.
- [39] S. Cestèle, Y. Qu, J.C. Rogers, H. Rochat, T. Scheuer, W.A. Catterall, Voltage sensor-trapping: Enhanced activation of sodium channels by β - scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II, *Neuron.* 21 (1998) 919–931.
- [40] S. Sokolov, R.L. Kraus, T. Scheuer, W. a Catterall, Inhibition of sodium channel gating by trapping the domain II voltage sensor with protoxin II., *Mol. Pharmacol.* 73 (2008) 1020–1028. doi:mol.107.041046 [pii]r10.1124/mol.107.041046.
- [41] M. Rong, J. Chen, H. Tao, Y. Wu, P. Jiang, M. Lu, et al., Molecular basis of the tarantula toxin jingzhaotoxin-III (β -TRTX-Cj1 α) interacting with voltage sensors in sodium channel subtype Nav1.5., *FASEB J.* 25 (2011) 3177–3185.
- [42] F. Bosmans, M.-F. Martin-Eauclaire, K.J. Swartz, Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels., *Nature.* 456 (2008) 202–208.
- [43] C. Tang, X. Zhou, Y. Huang, Y. Zhang, Z. Hu, M. Wang, et al., The tarantula toxin jingzhaotoxin-XI (κ -theraphotoxin-Cj1a) regulates the activation and inactivation of the voltage-gated sodium channel Nav1.5, *Toxicon.* 92 (2014) 6–13. doi:10.1016/j.toxicon.2014.09.002.
- [44] E. Jover, N. Martin-Moutot, F. Couraud, H. Rochat, Scorpion toxin: specific binding to rat synaptosomes., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85 (1978) 377–382.
- [45] S. Cestèle, V. Yarov-Yarovoy, Y. Qu, F. Sampieri, T. Scheuer, W.A. Catterall, Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin., *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 21332–21344.

- [46] F. Bosmans, K.J. Swartz, Targeting voltage sensors in sodium channels with spider toxins, *Trends Pharmacol. Sci.* 31 (2010) 175–182. doi:10.1016/j.tips.2009.12.007.
- [47] D. Li, Y. Xiao, X. Xu, X. Xiong, S. Lu, Z. Liu, et al., Structure--activity relationships of hainantoxin-IV and structure determination of active and inactive sodium channel blockers, *J Biol Chem.* 279 (2004) 37734–37740. doi:10.1074/jbc.M405765200 [pii].
- [48] M. Deng, X. Luo, L. Jiang, H. Chen, J. Wang, H. He, et al., Synthesis and biological characterization of synthetic analogs of Huwentoxin-IV (Mutheraphotoxin-Hh2a), a neuronal tetrodotoxin-sensitive sodium channel inhibitor, *Toxicon.* 71 (2013) 57–65. doi:10.1016/j.toxicon.2013.05.015.

