



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



---

**Caracterização química e farmacológica de compostos não peptídicos  
presentes na peçonha da aranha caranguejeira *Lasiodora sp.***

Rafael Donadélli Melani

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alberto Schwartz

**Co-orientador:** Prof. Dr. Osmindo Rodrigues Pires Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Animal  
como requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre em Biologia animal.

Brasília, 2012

“Todo grande progresso da ciência resultou  
de uma nova audácia da imaginação.”

John Dewey

**Dedicatória:**

À minha família, referência de valores para a vida, fonte de inspiração e motivação.

A todos os apaixonados pela ciência.

## **Agradecimentos**

À toda minha família pelo amor incondicional infinito que sempre me foi dado, pelo apoio em todos os momentos da minha vida e na minha jornada acadêmica desde quando entrei na universidade, pela compreensão nos momentos difíceis da vida e pelo eterno incentivo.

Aos meus pais Nelma e Marcelo por me mostrarem os caminhos da vida e me ensinarem a como andar por eles. Ao meu irmão Rodrigo que de uma maneira ou de outra sempre esteve ao meu lado. Aos meus avós Margarida e Nelson que sempre me acompanharam e me enchem de amor, ternura, carinho e generosidade.

À minha querida Carol por todo o amor, companheirismo, incentivo, ajuda dada para a realização deste trabalho e pela compreensão nos momentos difíceis. Sem todos vocês ao meu lado e me fortalecendo eu não teria conseguido subir mais esse degrau na minha vida.

Aos amigos e também orientadores Prof. Dr. Carlos Alberto Schwartz e Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior que me apresentaram a ciência e me incentivaram a fazê-la. “Saibam que deu certo, eu me encantei por ela.” A todas as conversas, sugestões, discussões e aprendizados, que foram muitos, durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Antonio Sebben, pelas inúmeras ajudas na montagem das preparações fisiológicas, pelos incentivos e contribuições a este trabalho.

Aos professores do Laboratório de Toxinologia: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Castro, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Schwartz e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Mortari pela ajuda e disposição.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eloisa Dutra Caldas por abrir as portas do Laboratório de Toxicologia – UnB, e a Érica Pacheco por toda a ajuda com as análises de LC-ESI-MS/MS.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Motta, Laboratório de Aracnídeos, pela paciência e ajuda na identificação dos animais.

Ao Prof. Dr. Marcelo Valle responsável pelo Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, por permitir a utilização dos equipamentos de MALDI-TOF/TOF. Ao Prof. Dr. Magno Junqueira pelas sugestões, conversas sobre este trabalho e ajuda nas análises de massa. Ao Nuno pela ajuda e paciência com as análises de massa e pelas conversas sobre tecnologia.

Ao Prof. Dr. Gilberto Domont por possibilitar o uso de equipamentos de espectrometria de massa em seu laboratório, Laboratório de Química de Proteínas – UFRJ. Ao Gabriel pela ajuda nas análises e interpretação dos dados.

Ao Prof. Dr. César Koppe Grisolia e seus alunos que nos acolheram várias vezes para utilização de equipamentos.

À fazenda Jatobá, que nos ofereceu todo apoio logístico e técnico para coleta dos animais utilizados neste trabalho. Ao Dr. André Mendonça e à Dr<sup>a</sup>. Adriana Bocchiglieri pela ajuda na coleta dos animais, companheirismo e amizade.

Aos meus grandes amigos: Rafael Felix e Pollyanna pelo apoio e ajuda em todas as horas, e Thompson pela ajuda na coleta e nas várias etapas da realização deste projeto. A todos os meus demais amigos e amigas que sempre me incentivaram.

À Carla Simone e à Fernanda Lima pelo início da trajetória do estudo da peçonha de *Lasiadora* sp.

Aos amigos do Laboratório de Toxinologia: Carol Barbosa, Harry, Cláudia, Jéssica, Andréa, César, Priscila, Luciana, Karla, Lilian, Jaque e Flávia pela ótima convivência e pelas boas horas que passamos juntos. Ao Cristiano pelo incentivo, pelo apoio e pelas diversas conversas acadêmico-filosóficas que tivemos durante esses anos. Ao Jimmy pela companhia nas farras, pelas diversas conversas dos mais variados

assuntos, pela amizade e pela alegria. Ao Cleidson pela ajuda e por me incentivar na eletrônica. À Natiela, companheira de laboratório por vários anos, pelo companheirismo e alto astral sempre presente.

A todos os estagiários e companheiros que ajudaram das mais variadas maneiras possíveis e imagináveis na execução deste trabalho durante esses dois anos. Pedro, Ana Carolina, Vitor, Gabriel, Helena, Júlia, João, Zé, Loyane e Mariana.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Comparada de Vertebrados – UnB, Leandro, Pedro Ivo, Tainã e Lucélia, pelas alegrias, aprendizados e pelos incontáveis empréstimos de material cirúrgico entre outros.

Ao Washington e ao Cesinha pelas inúmeras horas memoráveis que passamos juntos conversando ou fazendo churrasco. À Dona Maria, pela organização e limpeza do laboratório, além da sua preocupação materna para conosco.

Aos responsáveis e mantenedores do biotério do Instituto de Ciências Biológicas.

À Universidade de Brasília pelo apoio financeiro, logístico e estrutural.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por todo o suporte oferecido, em especial à Dani e à Ana por todo apoio e disposição aos alunos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao fundo de amparo a pesquisa da Família Donadelli Melani e Pires Jr/Schwartz.

Por fim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização desse trabalho. **Á TODOS vocês o meu MUITO OBRIGADO!**

*Se duas mãos podem construir coisas incríveis,*

*o que não fazem várias juntas!*

## Sumário

<b>Capítulo1: Efeito da peçonha de <i>Lasiadora</i> sp. sobre receptores de acetilcolina do tipo muscarínicos</b> .....	1
1 – Introdução .....	2
1.1 – Sistema circulatório e coração .....	2
1.2 – Cardiotoxinas .....	9
2 – Justificativa .....	12
3 – Objetivos .....	13
3.1 – Objetivo geral .....	13
3.2 – Objetivos específicos .....	13
4 – Material e métodos.....	14
4.1 – Animais.....	14
4.2 – Obtenção das peçonhas.....	14
4.3 – Fracionamento por filtração em centrífuga.....	15
4.4 – Fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> – HPLC) .....	16
4.5 – Espectrometria de Massas.....	16
4.5.1 – Sistema MALDI-TOF/TOF.....	16
4.5.2 – Sistema LC-ESI-MS/MS .....	17
4.6 – Ensaios farmacológicos .....	18
4.6.1– Preparação de coração de rã <i>in situ</i> .....	18
4.6.2 – Preparação de fatia de ventrículo de rã.....	19
4.7 – Teste de degradação de ésteres de colina.....	20
4.7.1 – Degradação química .....	20
4.7.2 – Degradação biológica .....	21
4.8 – Ajustes e análises estatísticas.....	21
5 – Resultados .....	22
5.1 – Fracionamento da peçonha bruta .....	22
5.2 – Atividade da peçonha e frações em coração <i>in situ</i> . .....	24
5.2 – Atividade da peçonha e frações sobre fatia de ventrículo.....	27
5.3 – Identificação e quantificação do composto ativo .....	31
5.4 – Teste de degradação de acetilcolina.....	36
5.5 – Presença de acetilcolina e colina em outras peçonhas .....	37
6 – Discussão .....	39
7 – Conclusões .....	47

8 – Referências Bibliográficas .....	48
--------------------------------------	----

**Capítulo 2: Efeito da peçonha de *Lasiadora* sp. sobre receptores de acetilcolina do tipo nicotínicos.....53**

1 – Introdução .....	54
1.1 – Junção neuromuscular.....	54
1.2 – Neurotoxinas que atuam na JNM.....	60
2 – Justificativa .....	64
3 – Objetivos .....	65
3.1 – Objetivos Gerais .....	65
3.2 – Objetivos Específicos .....	65
4 – Material e métodos.....	66
4.1 – Animais.....	66
4.2 – Obtenção da peçonha .....	66
4.3 – Fracionamento por filtração em centrífuga.....	67
4.4 – Fracionamento por cromatografia de camada delgada ( <i>Thin Layer Chromatography</i> – TLC).67	
4.5 – Fracionamento por cromatografia líquida em coluna aberta de baixa pressão .....	68
4.6 – Preparação de músculo reto abdominal de rã.....	68
4.7 – Teste de degradação de ésteres de colina.....	69
4.7.1 – Degradação química .....	69
4.7.2 – Degradação biológica .....	70
4.8 – Ajustes e análises estatísticas.....	70
4.9 – Espectrometria de Massa .....	70
4.9.1 – Sistema MALDI-TOF/TOF.....	70
4.9.2 – Sistema ESI-MS/MS .....	71
5 – Resultados .....	72
5.1 – Efeito da peçonha e frações no músculo reto-abdominal.....	72
5.2 – Cromatografia de camada delgada (TLC).....	74
5.3 – Cromatografia líquida em coluna aberta de baixa pressão.....	78
5.4 – Testes de degradação .....	81
5.5 – Presença de compostos similares em outras peçonhas.....	82
5.6 – Análises por espectrometria de massa .....	84
6 – Discussão .....	85
7 – Conclusão.....	96
8 – Referências Bibliográficas .....	97



## **Lista de Abreviações**

**Abs** – Absorbância

**Ach** – Acetilcolina

**AChE** – Acetilcolinesterase

**AV** – Atrioventricular

**bpm** – Batimentos por Minuto

**CAD** – Collisionally Activated Dissociation

**cDNA** – DNA complementar

**Ch** – Colina

**E-C** – Excitação Contração

**E<sub>M</sub>** – Potencial de Membrana

**ESI-MS/MS** – Electrospray Ionization Mass Spectrometry/Mass Spectrometry

**FB** – Fração de Baixa Massa Molecular <3 kDa

**HCCA** – Ácido  $\alpha$ -ciano4-hidroxi-cinâmico

**JNM** – Junção Neurmuscular

**LC** – Liquid Chromatography

**LD<sub>50</sub>** – Dose Letal para 50% dos indivíduos

**MALDI-TOF/TOF** – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/  
Time of Flight

**MEPP** – Potenciais em Miniatura da Placa Motora

**p** – Peso

**PA** – Potencial de Ação

**RP-HPLC** – Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography

**SA** – Sinoatrial

**SNA** – Sistema Nervoso Autônomo

**TFA** – Ácido Trifluoroacético

**TTX** – Tetrodotoxina

**v** – Volume

## Resumo

A peçonha de aranhas é um conjunto de diferentes moléculas bioativas usadas para subjugar a presa e como mecanismo de defesa. Essas moléculas atuam de forma variada em diversos sistemas biológicos, porém pouco se sabe sobre as peçonhas de aranhas caranguejeiras do Brasil. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química e farmacológica de alguns componentes bioativos não peptídicos presentes na peçonha de *Lasiadora* sp. A peçonha bruta de *Lasiadora* sp. apresenta efeito inotrópico e cronotrópico negativos em preparação de coração *in situ* de rã e de contração e diminuição da resposta de acetilcolina (Ach) em relação ao controle, em preparação de músculo reto abdominal de rã. O efeito sobre o coração é atribuído ao acúmulo de Ach na peçonha na concentração de  $8,75 \pm 0,45$  µg/mg de peçonha bruta, quantificada analiticamente por LC-MS/MS. A presença de Ach também foi constatada na peçonha de outras aranhas e outros animais peçonhentos como escorpiões e lacraias. O efeito sobre o músculo ocorre nos receptores nicotínicos para Ach e está relacionado à presença de ésteres de colina com núcleos imidazólicos. Os compostos foram identificados quimicamente através de diferentes revelações após cromatografia de camada delgada e por espectrometria de massa. Este estudo contribui para a compreensão da diversidade e complexidade de moléculas de baixa massa molecular não peptídicas presentes na peçonha da aranha *Lasiadora* sp., bem como preenche lacunas até então não esclarecidas.

## Abstract

The spiders venoms are a diverse set of bioactive molecules used for predation and as a defense mechanism. Although these molecules act on many biological systems by different means, little is known about the tarantula spiders venoms from Brazil. Thus, the objective of this study was to characterize chemically and pharmacologically some of the non-peptide bioactive components present in the venom of *Lasiadora* sp. The crude venom of *Lasiadora* sp. presents inotropic and chronotropic negative effects in *in situ* frog heart preparation. In frog rectus abdominis preparation the crude venom led to contraction and decrease of the action of acetylcholine (Ach). The effect on the heart is attributed to Ach accumulation on the venom at a concentration of  $8.75 \pm 0.45$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  of crude venom, analytically quantified by LC-MS/MS. The presence of Ach was also found in the venom of other spiders and other venomous animals such as scorpions and centipedes. The effect on the muscle occurs on nicotinic Ach receptors and is related to the presence choline esters with imidazole nuclei. The compounds were chemically identified by various spraying reagents after thin layer chromatography and by mass spectrometry. This study contributes to understand the molecular diversity and complexity of non-peptide compounds with low molecular weight present in the venom of the spider *Lasiadora* sp. and fills unexplained gaps in the study of tarantula venoms.

**Capítulo1: Efeito da peçonha de *Lasiadora* sp. sobre receptores de acetilcolina do tipo muscarínicos**

## **1 – Introdução**

### **1.1 – Sistema circulatório e coração**

Em vertebrados os sistemas circulatório, nervoso e endócrino são as principais vias de coordenação e integração do organismo. Dentre esses, o sistema circulatório é responsável por transportar e distribuir substâncias essenciais aos órgãos e tecidos e retirar os subprodutos do metabolismo celular. Além disso, participa intrinsecamente nos processos de homeostasia, controle da temperatura corporal, comunicação humoral e ajuste do suprimento de oxigênio e nutrientes (Pappano, 2009).

O sistema circulatório de vertebrados é fechado e composto pelos seguintes elementos: (1) vasos sanguíneos (artérias, veias e capilares), que conduzem o sangue pelo corpo do organismo; (2) sangue, meio pelo qual são transportadas as substâncias essenciais e subprodutos metabólicos; e (3) coração, que impulsiona o sangue através dos vasos sanguíneos. O coração apresenta um projeto simples com a função de bombeamento, com amplos limites de atividade e capacidade funcional, realizando uma ampla quantidade de trabalho sem necessidade de repouso (Cingolani *et al.*, 2004).

A estrutura do coração em mamíferos é composta por quatro câmaras, sendo dois átrios, direito e esquerdo, que tem paredes finas de baixa pressão com função de reservatório sanguíneo para os ventrículos, e dois ventrículos, direito e esquerdo, que apresentam paredes grossas, responsáveis pela propulsão do sangue. Na entrada de cada átrio, na comunicação átrio-ventrículo e na saída dos ventrículos estão presentes válvulas unidirecionais que impedem o refluxo e garantem a direção da corrente sanguínea. O átrio e ventrículo direito são responsáveis pela circulação pulmonar enquanto o conjunto esquerdo, mais espesso, é responsável pela circulação sistêmica (Katz, 2011).

O coração é um órgão muscular formado pelo miocárdio, que é constituído de células musculares estriadas cardíacas que são ultra-estruturalmente caracterizadas pela presença de sarcômeros (de linha Z a linha Z), filamentos de miosina (faixa A), finos filamentos de actina, uma grande quantidade de mitocôndrias, sarcolema e discos intercalados (Cingolani *et al.*, 2004). A contração é dada pelo encurtamento do mecanismo de deslizamento dos filamentos de actina sobre os filamentos de miosina sustentados pela ciclagem das pontes cruzadas interpostas aproximando as linhas Z. O processo de contração do coração é chamado de sístole e o processo de relaxamento de diástole (Klabunde, 2011).

O miocárdio atua como um sincício funcional, pois consegue propagar o potencial de ação (PA) e contração de todo o miocárdio com resposta “tudo ou nada”, por meio de fibras interconectadas e ramificadas. Porém, o músculo não é um sincício anatómico, uma vez que as fibras adjacentes são separadas lateralmente pelos sarcolemas e nas extremidades por discos intercalados, contínuos ao sarcolema (Pappano, 2009).

Os discos intercalados são estruturas complexas de adesão e são responsáveis pela interconexão das fibras musculares do coração. Nesta estrutura é possível se identificar três tipos diferentes de junções célula-célula: (1) junções aderentes, ancoradas por filamentos de actina; (2) desmosomas, ancoradas por filamentos intermediários; e (3) junções comunicantes, responsáveis pelo compartilhamento eletroquímico e metabólico, permitindo a passagem de íons e outras moléculas orgânicas, tornando o músculo cardíaco um sincício funcional (Franke *et al.*, 2006).

São as junções comunicantes as responsáveis pela propagação do potencial de ação cardíaco através do coração. Este apresenta dois tipos de potenciais de ação (PA),

um potencial de resposta lenta associado ao controle do ritmo de contração e um potencial de resposta rápida responsável pelo processo de contração do coração. O potencial de resposta rápida tem início no nodo sinoatrial e se propaga pelo coração através das células musculares e das fibras de Purkinje (Rohr, 2004).

Como nas demais células excitáveis do organismo, o potencial de ação cardíaco resulta de mudanças sequenciais da permeabilidade da membrana celular a diferentes íons, através da abertura e fechamento de canais iônicos, com duração média de 250 ms.

O potencial de ação ventricular é dividido esquematicamente em cinco fases e tem início na fase 4 que corresponde ao potencial de membrana ( $E_M$ ) na ausência de atividade elétrica, também chamado de potencial de repouso (-80 mV). Esta fase é caracterizada pelo influxo de  $K^+$  mediante correntes retificadoras (Pappano, 2009).

A fase seguinte é a fase 0 ou de despolarização rápida, onde o  $E_M$  é deslocado para valores positivos entre 15 e 25 mV através do influxo de  $Na^+$  pela abertura de canais rápidos para  $Na^+$  voltagem dependentes. Esta etapa dura aproximadamente 1 ms e após a despolarização da membrana ocorre o fechamento dos canais mediante processo de inativação. A inativação é seguida de uma repolarização transitória rápida, denominada fase 1, fazendo com que os valores do  $E_M$  cheguem próximos a zero. Esta diminuição do  $E_M$  é proporcionado, em sua maioria, pelo efluxo de  $K^+$  e em menor proporção pelo influxo de  $Cl^-$  (Klabunde, 2011).

A próxima etapa é a principal marca do potencial de ação ventricular fase 2 ou platô responsável por aproximadamente 70% da duração do PA cardíaco. O platô é caracterizado por um influxo de  $Ca^{2+}$ , despolarizante, que passa a neutralizar as correntes repolarizantes de  $K^+$  e  $Cl^-$ , mantendo o  $E_M$  em aproximadamente 0 mV. A corrente de  $Ca^{2+}$  é dada pela abertura de dois tipos de canais para  $Ca^{2+}$ , canais do tipo L

(abertura longa) e T (abertura rápida e transitória). Esta fase é fundamental durante o acoplamento excitação-contração, pois o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos intracelulares, que é indispensável para ativação das proteínas contráteis (Katz, 2011).

Na fase 3, repolarização rápida e final, o  $E_M$  retorna aos valores iniciais de repouso devido à corrente gerada pela abertura lenta dos canais para  $\text{K}^+$  tardios ou retificadores retardados e pela inativação dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$ , desequilibrando as correntes balanceadas na fase anterior. Ao retornar ao potencial de repouso, o potencial de ação retorna à fase 4 (Figura 1) (Cingolani *et al.*, 2004).

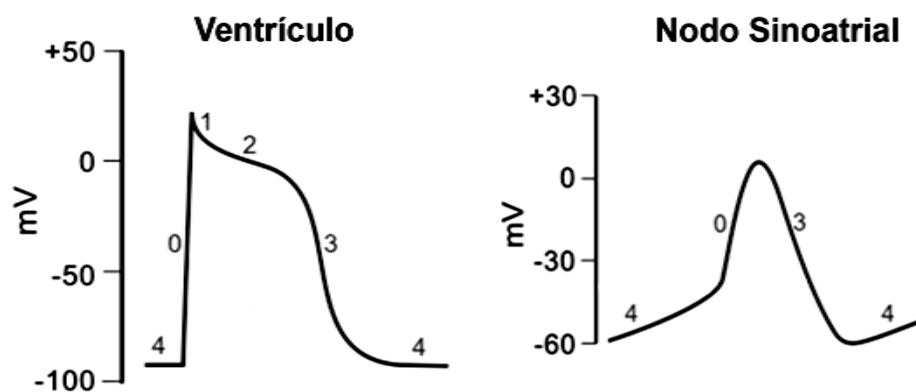


Figura 1: Potencial de ação cardíaco em células ventriculares (Esquerda) e células do nodo sinoatrial (Direita). Os números indicam as fases do potencial. Fase 0: despolarização; Fase 1: inativação e repolarização transitória; Fase 2: platô; Fase 3: repolarização rápida; Fase 4: potencial de membrana. (Adaptado de Klabunde, 2011).

Para que ocorra contração do coração é necessário o acoplamento entre o potencial de ação (excitação) e o processo de contração (acoplamento E-C). Para tal, são necessárias concentrações adequadas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  extracelular. Ocorrendo falta de  $\text{Na}^+$ , o coração torna-se não excitável pela ausência de influxo de  $\text{Na}^+$  e não contrai. A falta de  $\text{K}^+$  não interfere substancialmente na excitação, já o aumento de sua concentração acarreta despolarização da membrana celular com perda de excitabilidade



e parada cardíaca em diástole. Para  $\text{Ca}^{2+}$ , sua remoção resulta em diminuição da força contrátil e eventualmente parada cardíaca em diástole e a elevação da sua concentração induz o aumento da força contrátil e, em concentrações muito elevadas, pode acarretar parada cardíaca em sístole (Cingolani *et al.*, 2004).

Os potenciais de ação são gerados espontaneamente em células específicas distribuídas em diversas zonas do tecido especializado, chamadas células marcapasso. Nesse grupo celular o potencial cardíaco é diferente do encontrado no ventrículo, sendo que a principal diferença ocorre na fase 4 que se apresenta em forma de rampa por essas células não apresentarem um potencial de membrana estável (Figura 1). O principal grupo celular que possui frequência intrínseca mais elevada é o nodo sinoatrial (SA), que dita a frequência e a força de contração dos batimentos cardíacos. São essas células as responsáveis pelas atividades de automatismo (a capacidade de iniciar seu próprio batimento) e ritmicidade (a regularidade da atividade marcapasso) do tecido cardíaco (Di Francesco, 1993; Cho *et al.*, 2003).

Entretanto, o automatismo cardíaco é modulado instante a instante para adequá-lo às necessidades dos tecidos e órgão periféricos através da ação do sistema nervoso autonômico (SNA). O SNA exerce seu controle modulando a atividade marcapasso principalmente sobre o nodo SA de maneira inibitória por meio da inervação parassimpática e de forma excitatória pela inervação simpática, que são encontradas innervando todo o coração. Ambos os sistemas simpáticos e parassimpáticos atuam de maneira recíproca, porém, o efeito parassimpático se sobrepõe ao efeito simpático quando em repouso (Koizumi *et al.*, 1983; Talman & Kelkar, 1993).

As fibras simpáticas são originárias da medula espinhal nas colunas intermédio-laterais dos quintos ou sexto seguimentos torácicos superiores e primeiro e segundo

segmentos cervicais inferiores, se unem no gânglio estrelado e se dividem novamente em vários ramos que inervam o coração e outras regiões. As fibras que são enraizadas do lado esquerdo do organismo atuam sobre a contractilidade do miocárdio e as enraizadas do lado direito aumentam a frequência do coração (Katz, 2011).

O sistema simpático atua liberando noradrenalina como neurotransmissor, que pode atuar em dois tipos de receptores presentes no coração, receptores tipo alfa ou beta adrenérgicos. Porém, ocorre a predominância de receptores do tipo beta que são responsáveis pelo efeito cronotrópico positivo (aumento da frequência cardíaca) gerado pelo aumento da permeabilidade de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  na fase 4 do potencial de ação cardíaco. Os receptores do tipo alfa, juntamente com os do tipo beta são responsáveis pelo efeito inotrópico positivo (aumento da força de contração). No tipo beta o efeito é desencadeado pela fosforilação de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes acarretando um aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e aumento na duração da fase 2 do potencial de ação cardíaco (Klabunde, 2011).

Todo aumento de frequência deve ser acompanhado de um encurtamento da duração do ciclo cardíaco, principalmente na duração da diástole. Dessa forma, o efeito sobre a condução e excitabilidade é dado pelo aumento da velocidade da fase 0, da amplitude do potencial de ação, da velocidade de condução e do encurtamento do período refratário (Pappano, 2009).

As fibras parassimpáticas são originárias do bulbo cerebral em células do núcleo motor dorsal ou núcleo ambíguo, variando de espécie para espécie. Elas chegam ao coração através do nervo vago para fazer sinapse com células pós-ganglionares situadas no próprio coração. As células ganglionares estão situadas próximas ao nodo SA e ao tecido de condução atrioventricular (AV). O vago direito afeta predominantemente o

nodo SA e sua estimulação produz bradicardia sinusal ou mesmo parada completa da atividade SA por alguns segundos. O vago esquerdo influencia principalmente o tecido de condução AV impedindo a condução do potencial de ação. Ao nível ventricular não são registradas diferenças entre a estimulação direta ou esquerda do vago, ambos diminuem a contratilidade (Katz, 2011).

O sistema parassimpático atua liberando Ach como neurotransmissor, que atua diretamente sobre receptores do tipo muscarínicos pertencentes ao subtipo M<sub>2</sub>. Os receptores M<sub>2</sub> interagem diretamente com canais para K<sup>+</sup> operados por Ach aumentando sua probabilidade de abertura. Quando abertos, no PA cardíaco é observada uma hiperpolarização e maior velocidade de repolarização, com encurtamento de duração. Ocorre também uma inibição dos canais para Ca<sup>2+</sup> operados por voltagem, explicando o efeito inotrópico negativo (diminuição da força de contração) (Dhein *et al.*, 2001).

No nodo SA a estimulação vagal causa hiperpolarização e diminuição da inclinação da fase 4, explicando o efeito cronotrópico negativo (diminuição da frequência cardíaca). A diminuição na frequência é seguida por um aumento da duração do ciclo cardíaco, principalmente na diástole. Estimulando o vago de maneira a causar uma parada cardíaca, os ventrículos, mas não os átrios, começam a contrair-se novamente após um curto espaço de tempo ainda que continue a estimulação. Este fenômeno é chamado de escape vagal (Jalife *et al.*, 1983).

Nota-se uma diferença na intensidade de liberação dos neurotransmissores das inervações simpáticas e parassimpáticas. Tal fato se deve aos mecanismos diferentes de recaptação de neurotransmissores que cada diferente sistema de inervação possui. No sistema simpático a noradrenalina é recaptada sem ser degradada, ficando mais tempo em contato com os receptores, enquanto que no sistema parassimpático a Ach assim que

é liberada já começa a ser degradada pela ação enzimática de acetilcolinesterases presentes em abundância no espaço intersticial. A colina resultante da degradação é recaptada e assim a Ach fica menos tempo em contato com os receptores (Cingolani *et al.*, 2004).

## 1.2 – Cardiotoxinas

O complexo mecanismo de acoplamento E-C do coração e as vias do sistema nervoso autonômico de controle envolvem uma grande variedade de tipos e subtipos de canais iônicos e outros mecanismos celulares. Tal complexidade fornece um rico campo para a ação de diferentes toxinas que são componentes de diversos venenos e peçonhas de origem animal (Lima *et al.*, 2009).

Cardiotoxinas podem atuar de maneira direta sobre as estruturas cardíacas que promovem o acoplamento E-C ou nos mecanismos nervosos de controle da atividade cardíaca. No processo de acoplamento E-C elas podem agir sobre canais para  $\text{Na}^+$ , como a Jingzhaotoxina-I, isolada da aranha caranguejeira a *Chilobrachys jingzhao*, que inibe a sua inativação e aumentam a força de contração cardíaca (Xiao *et al.*, 2005). As cardiotoxinas também podem agir sobre canais para  $\text{Ca}^{2+}$ , como é o caso da toxina de aranha  $\omega$ -Aga-IIIa, isolada de *Agelenopsis aperta*, que é capaz de inibir canais para  $\text{Ca}^{2+}$  cardíacos do tipo L (Mintiz *et al.*, 1991).

Nos canais para  $\text{K}^+$ , pode-se citar como exemplo a ErgTx, isolada de *Centruroides noxius*, que age sobre canais de  $\text{K}^+$  do tipo ERG aumentando o tempo necessário para repolarização da membrana, deixando o PA cardíaco mais longo (Gurrola *et al.*, 1999). Diretamente sobre a membrana de células musculares cardíacas

essas toxinas podem formar poros que despolarizam a membrana, como ocorre com as cardiotoxinas de cobras do gênero *Naja* (Harvey *et al.*, 1982; Fletcher & Jiang, 1993).

Nos mecanismos de regulação do ritmo cardíaco as toxinas agem diminuindo o potencial de membrana necessário para ativar os canais iônicos voltagem dependentes das fibras nervosas, tornando-as mais facilmente excitáveis e fazendo-as liberar seus neurotransmissores na porção terminal dos nervos colinérgico e/ou adrenérgicos, promovendo descontrole na função cardíaca. A toxina Ts-1, isolada de *Tityus serrulatus*, é um exemplo de toxina que apresenta este tipo de ação (Almeida *et al.*, 1992).

O efeito de peçonhas e venenos sobre o coração também pode ser acarretado de maneira indireta, onde as toxinas podem promover um dano inicial em outros tecidos e os efeitos deste primeiro dano atuam sobre as estruturas cardíacas. Tal ação indireta pode ser observada no veneno de *Siphonops paulensis*, onde uma toxina, altamente hemolítica, lisa as hemácias que liberam  $K^+$  intracelular e aumentam sua concentração no sangue, proporcionando uma parada cardíaca (Schwartz *et al.*, 1999).

Em estudos com a peçonha da aranha caranguejeira *Lasiadora* sp., Kalapothakis e colaboradores (2003) descreveram efeito cronotrópico e inotrópico negativos em coração isolado de rato. Concentrações de 100  $\mu$ g causam bradicardia, parada cardíaca transitória e distúrbios de ritmo. Por meio do registro elétrico cardíaco foi constatado redução do ritmo do coração resultado de bradicardia sinusal, parada sinusal e bloqueio parcial ou total da condução AV.

Para checar a hipótese de que o efeito observado era mediado por acetilcolina, foi então testada ação de neostigmina (3,3  $\mu$ M), um inibidor de acetilcolinesterase, e atropina (1,4  $\mu$ M), um antagonista muscarínico, sobre a resposta da peçonha no coração.

O primeiro se mostrou um forte potencializador dos efeitos e o segundo os inibiu completamente, sugerindo que os efeitos eram mediados por Ach atuando em receptores muscarínicos (Kalapothakis *et al.*, 2003).

Foi sugerido então que os efeitos observados no coração isolado de rato eram provenientes da despolarização dos nervos parassimpáticos terminais. Para suportar essa hipótese, a peçonha foi testada na presença de vesamicol (10  $\mu$ M), um inibidor de liberação de vesículas de acetilcolina, que se mostrou capaz de inibir parcialmente o efeito da peçonha. Na presença de TTX (200 nM), o efeito da peçonha foi potencializado, revelando que a peçonha tem a capacidade de induzir a liberação de Ach em nervos parassimpáticos terminais pela ativação de canais para sódio resistentes a TTX (Kalapothakis *et al.*, 2003).

Outros estudos com a peçonha de *Lasiadora* sp. demonstraram que essa era capaz de reduzir o potencial de ativação e inibir a inativação de canais para Na<sup>+</sup> voltagem dependentes em células GH3, além de reduzir a condutância e causar um desvio positivo na dependência de voltagem de sua ativação de canais para Ca<sup>2+</sup> do tipo L (Kushmerick *et al.*, 2001).

## 2 – Justificativa

Vizzotto (2009), observou efeito cardiotoxico reversível, com ação inotrópica e cronotrópica negativas, na peçonha bruta de *Lasiadora* sp. em preparação de coração *in situ* de rã. Porém, não foi realizada a identificação do composto responsável pela ação.

Kalapothakis e colaboradores (2003) verificaram que a peçonha de *Lasiadora* sp. é capaz de induzir a liberação de Ach em nervos parassimpáticos terminais pela ativação de canais para Na<sup>+</sup> resistentes a TTX. No entanto, os mecanismos de ação envolvidos nesse efeito permanecem sem completa elucidação.

Estudos sobre as propriedades farmacológicas da peçonha de aranhas do gênero *Lasiadora* estão concentrados em ensaios com peçonha bruta (Escoubas *et al.*, 1997; Kushmerick *et al.*, 2001; Kalapothakis *et al.*, 2003), predições de toxinas obtidas a partir de bibliotecas de cDNA (Vieira *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2007) e a ação de uma toxina heteróloga expressa em bactérias (Dutra *et al.*, 2006).

Diante disso, o presente trabalho busca fornecer subsídios para a identificação e caracterização de componentes presentes na peçonha da aranha caranguejeira *Lasiadora* sp. cardioativos.

### **3 – Objetivos**

#### **3.1 – Objetivo geral**

Identificar o(s) componente(s) de baixa massa molecular, não peptídicos da peçonha de *Lasiadora* sp. responsável(is) pelo efeito no coração.

#### **3.2 – Objetivos específicos**

Caracterizar farmacológica e quimicamente, além de quantificar através de análise de espectrometria de massas o(s) componente(s) cardioativos da peçonha de *Lasiadora* sp. responsável(is) pelos efeitos inotrópico e cronotrópico negativos observados no coração de rã.

Verificar a presença da substância ativa na peçonha de outros artrópodos.



## 4 – Material e métodos

### 4.1 – Animais

Foram utilizadas aranhas caranguejeiras da espécie *Lasiadora* sp., coletadas nas proximidades do município de Jaborandi, Bahia, na fazenda Jatobá sob licença do ICMBIO SISBIO nº 23404-1, acondicionadas e mantidas em cativeiro no biotério do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB). Os espécimes foram identificados com a ajuda do professor Dr. Paulo Cesar Motta, Laboratório de Aracnologia, UnB e um exemplar testemunho foi depositado na coleção de aranídeos, ligado ao Departamento de Zoologia – IB – UnB.

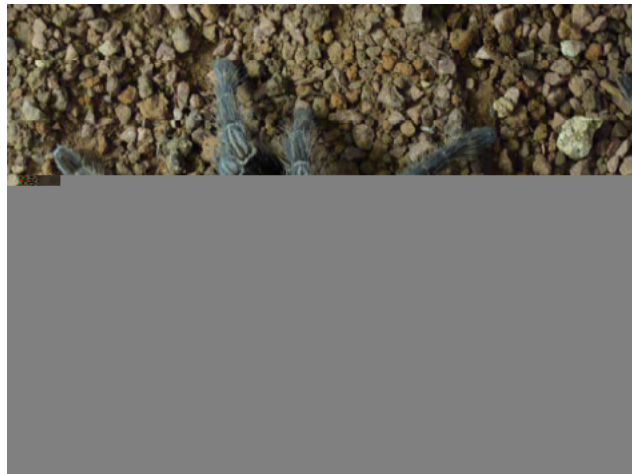


Figura 2: Espécime de *Lasiadora* sp. Foto: Osmino Jr.

### 4.2 – Obtenção das peçonhas

A peçonha de *Lasiadora* sp. foi obtida por estimulação elétrica na base das quelíceras com pulsos de aproximadamente 30-50 Volts a 200 Hz com duração de 2 ms (Estrada *et al.*, 2007) e coletadas em microtubos para centrífuga. Estas amostras foram imediatamente congeladas após a extração, concentradas a vácuo e estocadas em freezer

-20° C. O peso seco da peçonha foi mensurado utilizando-se balança de precisão modelo AUW220D (Shimadzu, Japão).

A peçonha de *Acanthoscurria paulensis*, *Acanthoscurria* sp1., *Acanthoscurria* sp2., *Avicularia* sp., *Grammostola* sp., *Guyruita cerrado*, *Hapalopus* sp., *Nhandu coloratovillosus*, *Vitalius* sp., *Actinopus* sp., *Ancylometes* sp., *Phoneutria eickstedtae*, *Phoneutria nigriventer*, *Bothriurus* sp., *Rhopalurus agamemnon*, *Rhopalurus rochai*, *Tityus fasciolatus*, *Tityus mattogrossensis*, *Scolopendra viridicornis nigra* e *Scolopendra viridicornis viridicornis* foram obtidas do banco de peçonhas Laboratório de Toxinologia, UnB.

#### **4.3 – Fracionamento por filtração em centrífuga**

Alíquotas com 2 mg de peçonha bruta de *Lasiadora* sp. foram reconstituídas em 400µL de água deionizada e fracionadas em componentes de baixo peso molecular, com menos de 3 kDa, e componentes de alto peso molecular, com mais de 3 kDa. Para o fracionamento utilizou-se filtros para centrifuga Amicon® Ultra-2 Ultracel-3 (Millipore) com membrana de exclusão de 3 kDa através de centrifugação refrigerada a 4° C e 10000 g por uma hora. A amostra filtrada foi recolhida, e o material retido no filtro ressuspendido pela adição de 400µL de água deionizada e filtrado novamente. Esse processo foi repetido duas vezes. Após a separação, o material foi concentrado a vácuo e estocado a -20° C.

#### **4.4 – Fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC)**

A peçonha bruta seca foi reconstituída em água deionizada com 0,12% de TFA, centrifugada por 5 minutos a 15.000 g e o equivalente a 1 mg de peçonha bruta foi aplicado em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC): série 20A; equipado com arranjo de diodo SPD-M20A (Shimadzu, Japão). O fracionamento foi realizado em coluna analítica de C18 Vydac 218TP54, 5 $\mu$  (4,6 x 250 mm), com gradiente binário de solução aquosa de ácido trifluoracético (TFA) 0,12% (v/v), como fase móvel A, e solução de acetonitrila e TFA 0,12% (v/v), como fase móvel B, em fluxo de 1 mL/min. O gradiente teve início com 0% de B por 5 minutos; 0 a 60% de B em 60 minutos; 60 a 100% de B em 5 minutos; 100% de B por 5 min; 100 a 0% de B em 5 minutos. Os cromatogramas foram analisados em 216 e 280 nm e os espectrogramas na faixa de 200 a 300 nm. Quando necessário as frações foram coletadas manualmente em microtubos e em seguida concentradas a vácuo.

#### **4.5 – Espectrometria de Massas**

##### **4.5.1 – Sistema MALDI-TOF/TOF**

Para a determinação das massas moleculares dos compostos presentes na peçonha bruta e frações de interesse foi utilizado espectrometria de massa em sistema MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras foram dissolvidas em matriz saturada de ácido  $\alpha$ -ciano4-hidroxi-cinâmico (HCCA) em acetonitrila/água/3% TFA (2,5/2/0,5) e ácido sinapínico em acetonitrila/água/3% TFA (2,5/2/0,5). As análises foram realizadas após calibração com ions  $[M+H]^+$  angiotensina I, angiotensina II, substância P, bombesina, cadeia B de insulina e hormônio

adrenocorticotropico. A inspeção das massas moleculares foi realizada operando-se em modo refletido positivo ou linear positivo com energia de laser variável e 150 tiros por poço. Para análise de componentes de baixa massa foi realizada a aquisição do espectro da matriz sem adição de amostra para identificação e exclusão das massas moleculares referentes a matriz.

#### **4.5.2 – Sistema LC-ESI-MS/MS**

A análise dos componentes de interesse e curvas de quantificação analítica de acetilcolina e colina foram realizadas em sistema LC Shimadzu, equipado com bomba binária (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A5), injetor automático (SIL-20AC), forno de coluna (CTO-20AC) e controladora (CBM-20A) com interface para o espectrômetro de massas triplo quadrupolo (4000QTRAP, Applied Biosystem/MDS Sciex, Foster City, EUA) com fonte TurboIonSpray e software Analyst<sup>®</sup> V 1.5.2 para realização das aquisições.

Para a cromatografia líquida de alto eficiência foi utilizada coluna C18 Vydac 218TP54, 5 $\mu$  (4,6 x 250 mm), com gradiente isocrático de fase móvel 90:10 (v/v) composta por água e acetonitrila adicionado de TFA 0,12 %, tempo de corrida de 10 min, fluxo de 1 mL/min e temperatura do forno de 40° C. Os íons de interesse foram filtrados no primeiro quadrupolo e fragmentados por CAD no terceiro quadrupolo. As curvas de quantificação analíticas foram produzidas com a aplicação de 5 concentrações diferentes em triplicata.

Também foi utilizada injeção direta através de microseringa acoplada a bomba de injeção com fluxo de 10  $\mu$ L/min para busca identificação de compostos da peçonha bruta, do filtrado e dos padrões de interesse para otimizar as condições de fragmentação

das moléculas a serem acompanhadas durante a realização da LC-ESI-MS/MS seguindo parâmetros indicados pelo fabricante e determinados pelo software de comando.

#### **4.6 – Ensaios farmacológicos**

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética de uso animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB) sob processo nº 127103/2011.

##### **4.6.1– Preparação de coração de rã *in situ***

Foi utilizado um exemplar adulto de rã touro norte americana (*Lithobates catesbeianus*) por experimento. O animal foi eutanasiado por destruição do sistema nervoso central (espinhalamento) e o nervo vago foi dissecado logo abaixo da região escapular. Em seguida, dois eletrodos de estimulação foram acoplados e o animal foi colocado em posição ventral para dissecação da região abdominal até a exposição da veia cava posterior. Ela foi canulada com tubo de como via de administração das amostras a serem testadas.

A região peitoral foi dissecada até a exposição total do coração, que foi imediata e constantemente banhado com solução Ringer (NaCl: 111 mM; KCl: 1,9 mM; CaCl<sub>2</sub>: 1,1 mM; NaHCO<sub>3</sub>: 2,4 mM). O ápice do ventrículo foi acoplado a um transdutor isométrico (F60, NARCO Bio Systems) utilizando uma pinça cardíaca e linha. O sistema foi então tracionado para manter o coração na posição vertical.

Para captação dos potenciais de ação do ventrículo foi utilizado um eletrodo de sucção, constituído por um tubo de polietileno, com um fio de prata Ag/AgCl<sub>2</sub> em seu

interior, parcialmente preenchido com solução Ringer. Para fixação do eletrodo ao coração, a extremidade do tubo contendo o fio de prata foi posicionada junto à parede ventricular e na outra extremidade foi promovida e mantida uma ligeira sucção com o auxílio de uma seringa acoplada a uma válvula de duas vias. Para obtenção do registro o fio de prata foi acoplado a um amplificador de alta impedância (High-Gain Coupler, NARCO Bio Systems), seguindo protocolo proposto por Schwartz e colaboradores (1999).

Os registros da atividade mecânica e da atividade elétrica foram obtidos utilizando dois canais de registro do Polígrafo (NARCO Bio Systems). O pulso elétrico aplicado ao nervo vago foi gerado por um estimulador S8 (Grass Instruments) de 15-20 Volts, durante 2 ms com frequência de 30 Hz. As amostras e drogas a serem testadas foram injetadas em volume final de 300 µL seguidos por 200 µl de solução Ringer. Entre a aplicação de diferentes amostras injetou-se 500 µL de solução Ringer para lavagem da cânula.

#### **4.6.2 – Preparação de fatia de ventrículo de rã**

Foram utilizados exemplares adultos de *L. catesbeianus*, um por experimento. Este foi eutanasiado por espinhalamento e a região peitoral dissecada até o coração. O coração foi removido, lavado com solução Ringer (NaCl: 111 mM; KCl: 1,9 mM; CaCl<sub>2</sub>: 1,1 mM; NaHCO<sub>3</sub>: 2,4 mM e Glicose: 10 mM) e com o auxílio de uma lâmina de navalha o átrio foi descartado e uma fatia de aproximadamente 2,5 mm da porção mediana do ventrículo foi retirada.

O anel do ventrículo foi aberto, mantido entre dois eletrodos de estimulação e conectado a um transdutor isométrico (F60, NARCO Bio systems) através de fio de aço

inoxidável rígido. A preparação foi mantida imersa dentro de uma cuba com volume final de 2 mL de solução fisiológica, sendo constantemente aerada. A preparação foi estimulada eletricamente através de estimulador S8 (Grass Instruments) com pulsos de 20-30 V, com 2 ms de duração e frequência de 0,15 Hz. O registro da força de contração foi obtido em polígrafo (NARCO Bio systems) com velocidade do papel em 0,25 mm/s e amplificação variável de acordo com a preparação.

Como controle foi utilizado cloreto de acetilcolina (Sigma) em diferentes concentrações, diluída em solução Ringer. As amostras a serem testadas também foram ressuspendidas em solução Ringer e em ambos os casos sempre foi aplicado o volume de 50 µL. Entre as aplicações das amostras testadas foram aguardados de 10 a 15 min após a preparação ser lavada com 4 a 5 volumes da cuba de solução fisiológica. Para confecção da curva dose resposta de Ach e peçonha foram aplicadas 5 diferentes concentrações em triplicata.

## **4.7 – Teste de degradação de ésteres de colina**

### **4.7.1 – Degradação química**

Peçonha bruta 500 µg, acetilcolina 1 µg e solução Ringer, todos em volume de 50 µL, foram incubados em 50 µL de hidróxido de sódio 0,2 N, durante uma hora a 60° C em bloco térmico (PTC-200, MJ Research), adaptado de Rosenghini *et al.*, 1996. Antes dos produtos de degradação serem testados em preparação de fatia de ventrículo, o hidróxido de sódio foi neutralizado com 100 µL de ácido clorídrico 0,1 N. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **4.7.2 – Degradação biológica**

Foi utilizado soro de ratos Wistar adultos, obtido a partir de uma mistura de sangue de cinco indivíduos, retirado através de punção cardíaca na ausência de anticoagulante. Após total coagulação o sangue foi centrifugado por 20 min a 1000 g. Em seguida, a peçonha bruta 50 µg e acetilcolina 10 µg foram ressuspendidas em tampão fosfato de sódio dibásico (100 mM, pH 7,5) e uma alíquota de 50 µL foi incubada com 50 µL de soro de rato por uma hora a 37° C em bloco térmico (PTC-200, MJ Research). Como controle negativo foi incubado 50 µL de tampão fosfato com soro. Os produtos da degradação foram testados em preparação de fatia de ventrículo de rã e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.8 – Ajustes e análises estatísticas**

Os ajustes das curvas dose-resposta em preparação de fatia de ventrículo foram feitos segundo equação de Hill. A curva concentração-área para quantificação analítica foi ajustada linearmente. Análises de variância (ANOVA) e teste T (Tukey) foram realizadas para todas as variáveis com distribuição normal e o resultado apresentado como média ± EPM. Para todas as análises foi adotado índice de significância <0,05. As análises e os ajustes foram realizados no programa Origin Pro 8.



## 5 – Resultados

### 5.1 – Fracionamento da peçonha bruta

A peçonha bruta de *Lasiodora* sp. foi fracionada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e a figura 3 apresenta um cromatograma típico, mostrando as 23 frações cromatográficas obtidas e que foram numeradas de acordo com a ordem de eluição.

Após processo de filtragem em membrana de exclusão de 3 kDa, o filtrado (<3 kDa) e o retido (>3 kDa) foram analisados em sistema de RP-HPLC. Vizzotto (2009) analisou a peçonha da mesma aranha e identificou por espectrometria de massas (sistema MALDI-TOF/TOF) os componentes de cada uma das frações obtidas com a mesma metodologia de RP-HPLC. Foi observado que moléculas de baixa massa molecular eluíram no cromatograma com até 25% de fase móvel B (Frações de 1 a 13), sendo a maior massa observada a de 728,3 Da. A eluição de moléculas com massa maior que 3 kDa (Frações de 14 a 23) ocorre com porcentagens superiores a 25% de fase móvel B.

O material filtrado (Figura 3B) apresentou somente moléculas com menos de 3 kDa, (F1-F13) uma vez que todas as frações observadas eluíram com menos de 25% de fase móvel B. Já o material retido (Figura 3C) apresentou todas as frações de um cromatograma de peçonha bruta, notando-se um aumento de concentração das frações peptídicas de peso molecular maior que 3 kDa (F14-F23) e uma diminuição das frações F1-F13, em relação ao cromatograma de peçonha bruta.



Figura 3: Cromatogramas em sistema RP-HPLC em coluna analítica C18 Vydac 218TP54, 5 $\mu$  (4,6 x 250 mm) com gradiente de fase móvel B otimizado, monitorado em 216 nm. Em azul gradiente de fase móvel B. (A) Peçonha bruta, frações indicadas na ordem de eluição. (B) Fração de baixo peso molecular <3 kDa, filtradas em Amicon® Ultra-2 Ultracel-3 (Millipore). (C) Fração de alto peso molecular >3 kDa, retida no filtro Amicon® Ultra-2 Ultracel-3 (Millipore).

## 5.2 – Atividade da peçonha e frações em coração *in situ*.

Em preparação de coração de rã *in situ* ao se estimular eletricamente o nervo vago, em valores de voltagem supra máximos, observa-se parada cardíaca reversível seguida de diminuição na frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo) e na força de contração (efeito inotrópico negativo), além de uma diminuição no tempo total do PA cardíaco (Figura 4A).

A dose de 500 µg da peçonha bruta de *Lasiodora* sp. injetada via da veia cava posterior provocou parada cardíaca reversível, seguido por efeito inotrópico e cronotrópico negativos. A frequência cardíaca controle, de 48 batimentos por minuto (bpm), antes da injeção da peçonha diminuiu para 18 bpm após reversibilidade da parada cardíaca. O registro elétrico do potencial de ação cardíaco mostra uma inclinação na fase 0, diminuição da fase 3 e encurtamento do PA cardíaco sugerindo uma hiperpolarização da membrana plasmática (Figura 4B). Após lavagem da preparação com solução Ringer a preparação volta aos parâmetros iniciais de força e frequência.

A fim de determinar se o efeito observado foi causado por compostos acima ou abaixo da faixa de 3 kDa, a fração de baixa massa <3 kDa (FB), filtrado, foi testada na mesma preparação de coração *in situ* de rã. Ao injetar a dose de 200 µg da FB, esta apresentou o mesmo efeito da peçonha bruta, todavia sendo mais pronunciado, com parada cardíaca de aproximadamente 20 s (Figura 4C).

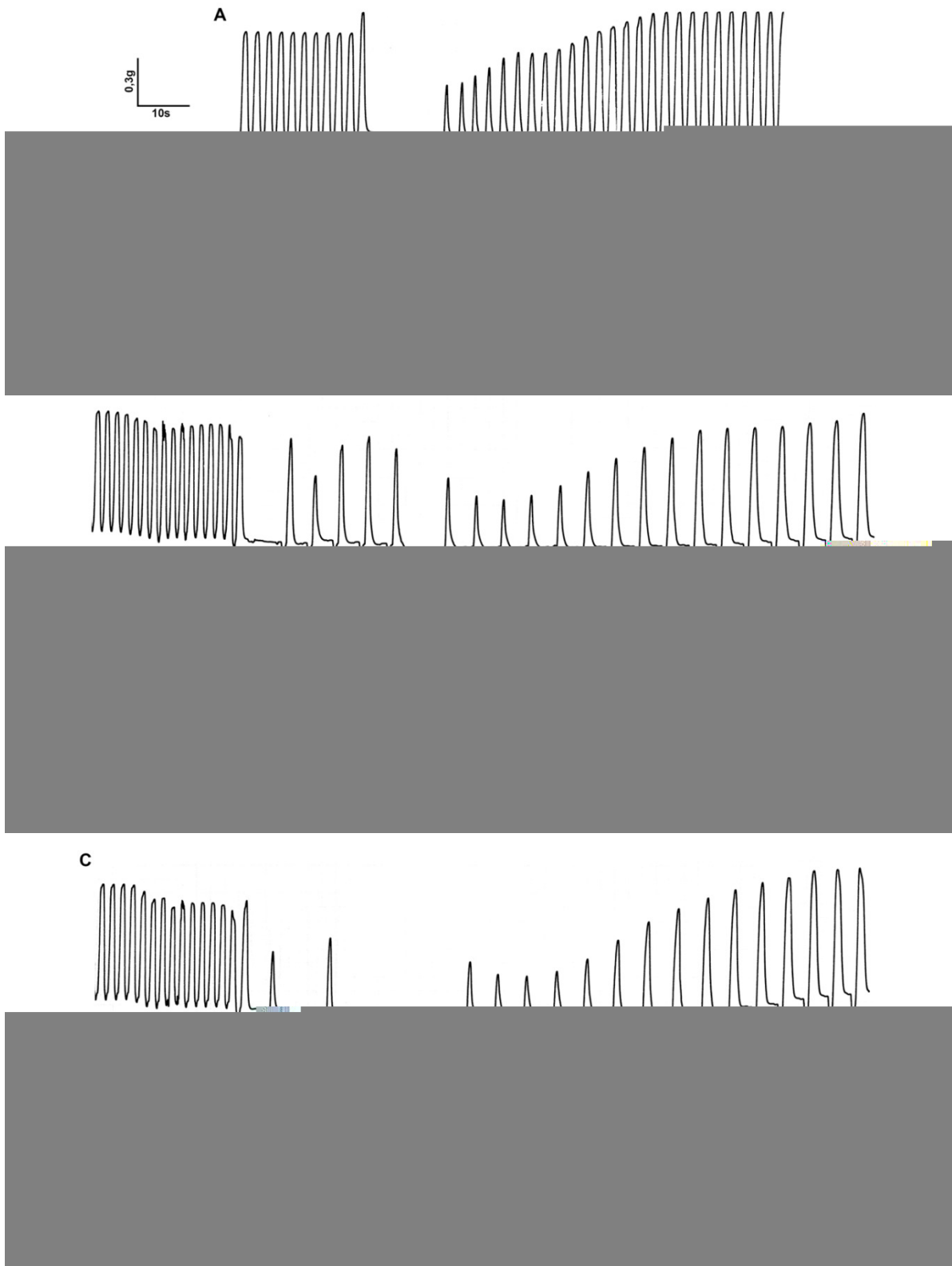


Figura 4: Miocardiograma (acima) e eletrocardiograma (abaixo) de preparação de coração de rã *in situ*. As setas indicam o início do estímulo elétrico ou injeção da substância a ser testada. (A) Estimulação elétrica do nervo vago (VG) por 10 s com frequência de 30 Hz, duração de pulso de 2 ms e 15 V. (B) Injeção de 500  $\mu$ g de peçonha bruta (PB) de *Lasiadora* sp. (C) Injeção de 200  $\mu$ g da fração de baixa massa molecular (FB)  $<3$  kDa.

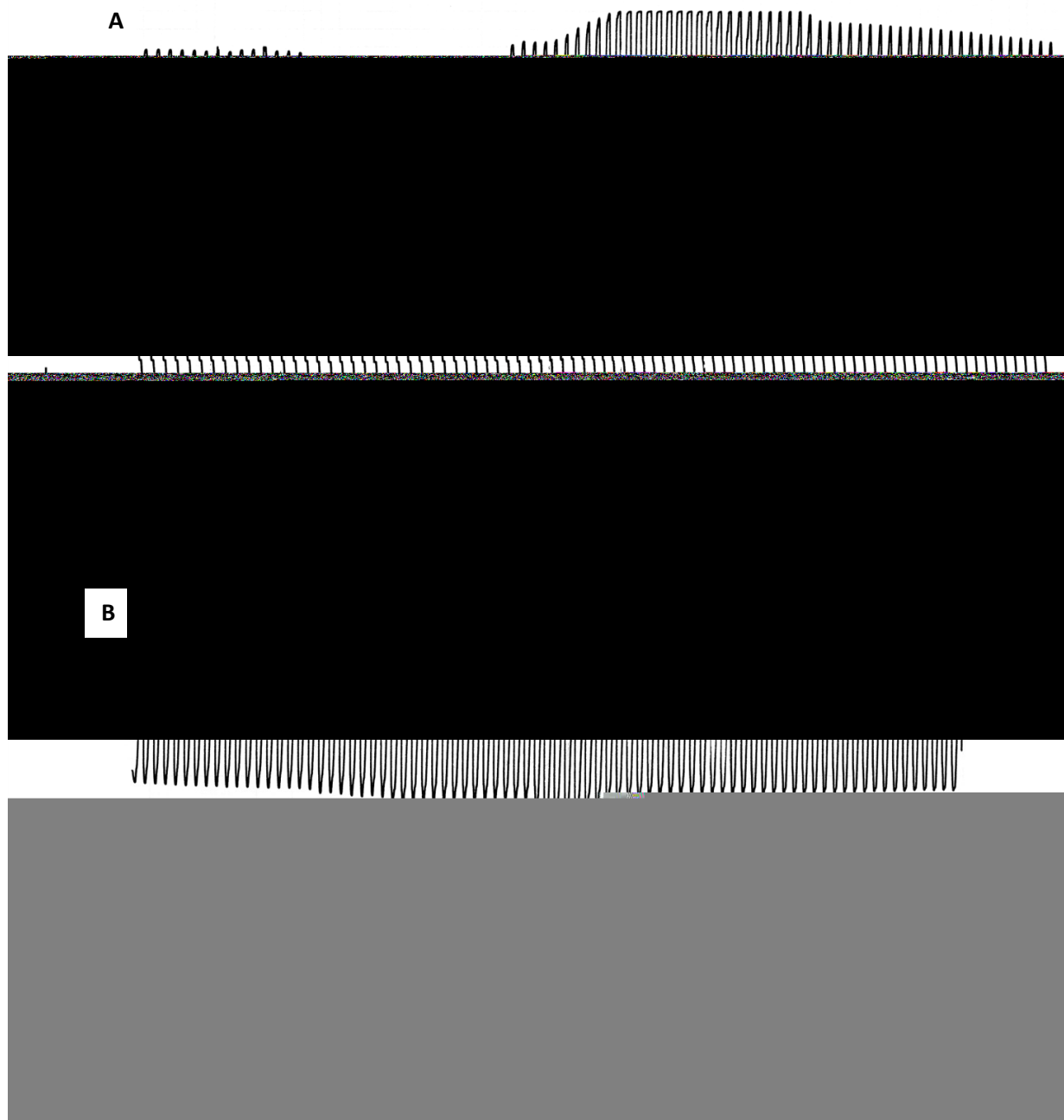


Figura 5: Miocardiograma (acima) e eletrocardiograma (abaixo) de preparação de coração de rã *in situ*. As setas indicam o início do estímulo elétrico ou injeção da substância a ser testada. (A) Injeção de 30  $\mu\text{g}$  de atropina (AT) seguido de estimulação vagal (VG). (B) Injeção de 30  $\mu\text{g}$  de atropina (AT) seguido da injeção de 200  $\mu\text{g}$  de FB. Mesma escala para todos os registros

A fração com os compostos de massa molecular maior que 3 kDa não foi testada por ainda apresentar componentes de baixo peso molecular (Figura 3C). Desta forma não seria possível identificar de qual grupo de moléculas partiria o efeito.

O efeito observado no coração com a injeção de 200 µg da FB é completamente inibido quando a preparação é previamente tratada com 30 µg de atropina, um antagonista muscarínico (Figura 5). Tal observação sugere que o efeito observado é mediado pela presença de um colinomimético com massa inferior a 3 kDa e/ou através da liberação de acetilcolina pelo sistema parassimpático, conforme sugerido por Kalapothakis e colaboradores (2003).

## 5.2 – Atividade da peçonha e frações sobre fatia de ventrículo

A peçonha bruta de *Lasiadora* sp. também foi testada em preparação de fatia de ventrículo de rã. Após vários ensaios observou-se reprodução do efeito *in situ* e optou-se por continuar os testes de cardiotoxicidade neste modelo, visto que o monitoramento é possível de ser controlado e a preparação é mais estável. A peçonha bruta em preparação de fatia de ventrículo de rã apresenta efeito dose-dependente estatisticamente significativa (ANOVA e teste-T,  $p < 0,05$ ) e pode ser ajustado pela equação de Hill com  $k = 14,7 \pm 0,4 \mu\text{g}$  e  $n = 0,47 \pm 0,005$  (Figura 6).

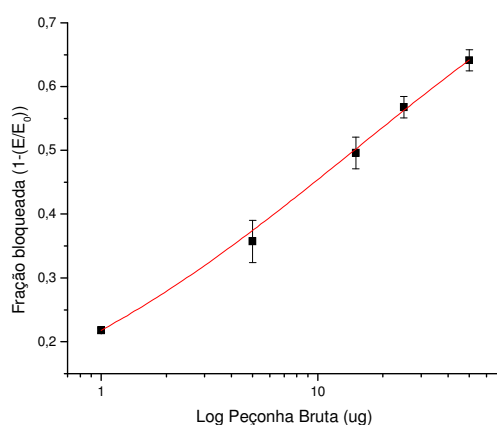


Figura 6: Curva dose resposta de peçonha bruta em preparação de fatia de ventrículo de rã (n=3). Ajuste feito pela equação de Hill ( $y = V_{\max} * x^n / [K^n + x^n]$ ) com  $V_{\max} = 1$ ,  $K = 14,72 \pm 0,4$  e  $n = 0,47 \pm 0,005$ .  $R^2 = 0,999$ .

O efeito da aplicação de 855 nM de acetilcolina (Figura 7A) na preparação de fatia de ventrículo resulta em efeito similar ao da aplicação de 50 µg de peçonha bruta na preparação, onde observa-se um efeito inotrópico negativo com redução da força de contração, dado pela equação  $(1-(E/E_0))*100$ , de aproximadamente 42% (Figura 7B).

Com a aplicação de 20 µg da FB observa-se diminuição na força de contração de cerca de 40% (Figura 7C), efeito próximo ao da aplicação de 50 µg da peçonha bruta. Ao fazer um tratamento prévio da preparação com aplicação de 17 µM de atropina foi verificado inibição da resposta de 855 nM de acetilcolina (Figura 7D) e de 20 µg de FB (Figura 7E).

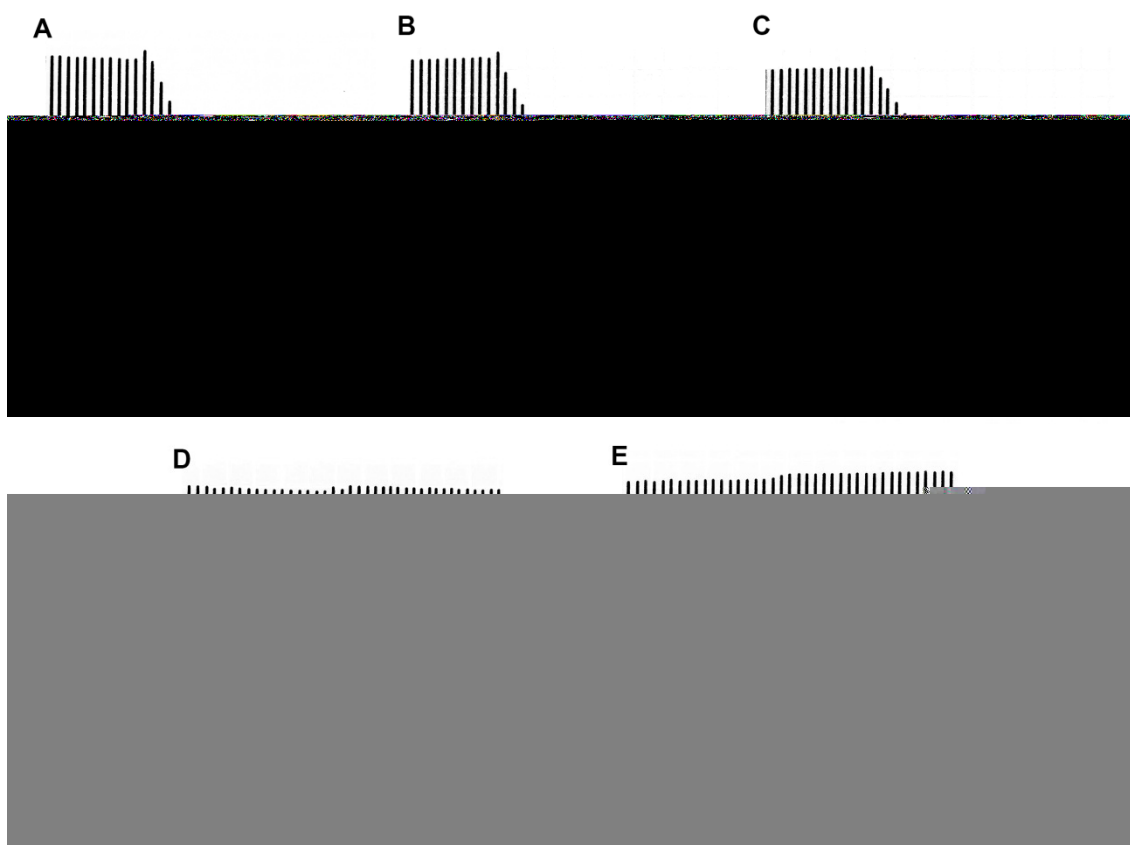


Figura 7: Miocardiograma de fatia de ventrículo sob estimulação elétrica com frequência 0,15 Hz, tempo de duração de 2 ms e intensidade de 20 V, em banho de 2 mL. n = 3. (A) Aplicação de 855 nM de acetilcolina (ACh). (B) Aplicação de 50 µg de pesonha bruta de *Lasiadora* sp (PB). (C) Aplicação de 20 µg da fração de baixa massa molecular (FB) <3 kDa. (D) Aplicação de 17 µM de atropina (AT) seguido da aplicação de 855 nM de acetilcolina (ACh). (E) Aplicação de 17 µM de atropina (AT) seguido da aplicação de 20 µg de FB. Mesma escala para todos os registros.

Para testar a hipótese de que compostos peptídicos/protéicos também apresentam atividade sobre a preparação de fatia de ventrículo de rã, as frações cromatográficas peptídicas F14 a F21 (Figura 3A) foram aplicadas em concentração de 10  $\mu$ M do composto mais abundante observado por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF/TOF.

Nenhuma das frações cromatográficas peptídicas/protéicas testadas apresentou efeito significativo sobre a preparação (Tabela 1). As frações mais abundantes F14, F15, F16, F17 F18, F19 e F21 também não foram capazes de potencializar o efeito causado pela aplicação concomitante de 62,5  $\mu$ g da FB.

As frações cromatográficas F1 a F13 (Figura 3A) foram testadas na preparação de fatia de ventrículo de rã. Por não serem peptídicas e por conseqüente não haver um método de quantificação padronizado, para cada fração 2 corridas cromatográficas foram reunidas, secas e ressuspendidas em 50  $\mu$ L de Ringer no momento do ensaio e aplicados 30  $\mu$ L.

Observa-se um intenso efeito inotrópico, com mais de 50% de bloqueio, nas 3 primeiras frações F1, F2 e F3 e uma diminuição do efeito ao longo da eluição das demais frações (Tabela 1). Com os resultados obtidos sugere-se que o composto ativo possivelmente elui ao longo da cromatografia, não sendo detectável nos comprimentos de onda monitorados durante a separação cromatográfica da peçonha bruta por RP-HPLC.

Para estabelecer qual o comportamento da substância ativa em cromatografia de fase reversa foi realizada uma corrida aplicando-se 2 mg de peçonha bruta, e suas frações cromatográficas foram coletadas minuto a minuto ao longo dos 26 minutos de tempo de corrida. As 25 frações coletadas temporalmente foram então testadas em



preparação de fatia de ventrículo. A figura 8 mostra ação farmacológica (Linha preta) das frações recolhidas minuto a minuto (Linha azul), revelando que o composto elui ao longo da cromatografia e não é detectado nos comprimentos de onda analisados.

Tabela 1: Relação das frações obtidas por RP-HPLC, sua faixa de peso molecular, concentração e atividade em ensaio de fatia de ventrículo.

Fração	Faixa de peso	Concentração	% de bloqueio (1-(E/E <sub>0</sub> ))*100
F1	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈60
F2	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈90
F3	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈60
F4	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈30
F5	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈30
F6	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈30
F7	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈20
F8	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈20
F9	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈20
F10	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈10
F11	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈10
F12	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈5
F13	<3 kDa	2 corridas de RP-HPLC	≈5
F14	>3 kDa	10 μM	0
F15	>3 kDa	10 μM	0
F16	>3 kDa	10 μM	0
F17	>3 kDa	10 μM	0
F18	>3 kDa	10 μM	0
F19	>3 kDa	10 μM	0
F20	>3 kDa	10 μM	0
F21	>3 kDa	10 μM	0
F22	>3 kDa	10 μM	0
F23	>3 kDa	10 μM	0

Neste experimento foi detectado que o composto ativo que provoca efeito inotrópico negativo elui ao logo dos 25 minutos de cromatografia. Somente após o 23º minuto de cromatografia ocorre uma diminuição abaixo de 5% da ação. Observando a figura 8 sugere-se a possível existência de dois compostos com atividade inotrópica negativa, um com eluição cromatográfica em torno de 7 min e outro em aproximadamente 14 min.

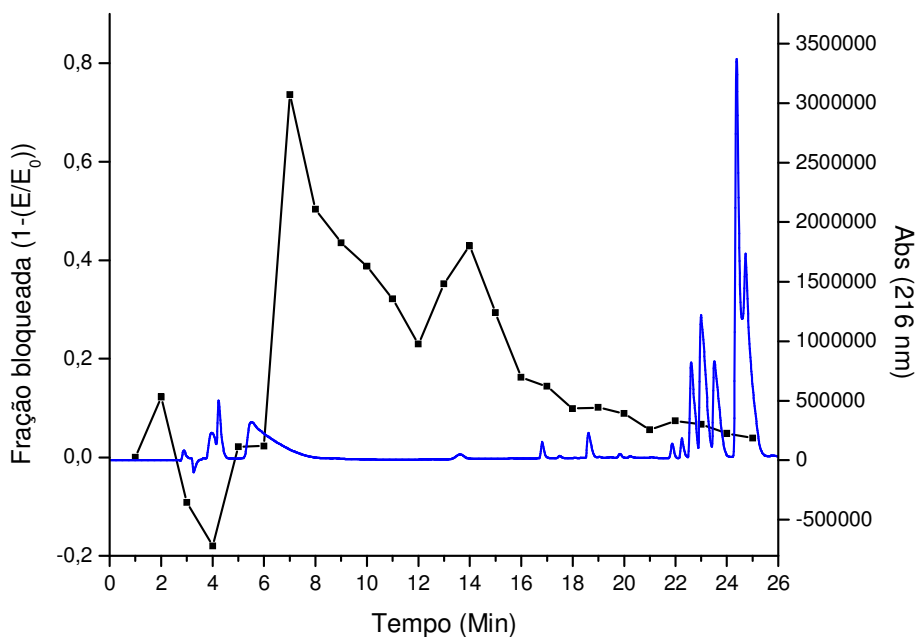


Figura 8: Cromatograma de 1 mg de peçonha bruta de *Lasiadora* sp. em sistema RP-HPLC em coluna analítica C18 Vydac 218TP54, 5 $\mu$  (4,6 x 250 mm) em 216 nm (Linha azul), sobreposto com atividade das frações coletadas temporalmente (Minuto a minuto) em preparação de fatia de ventrículo de rã, expresso em fração bloqueada (1-(E/E<sub>0</sub>)) (Linha preta, ■).

Também foi detectado que as frações que eluíram entre 2 e 5 minutos apresentaram um efeito inotrópico positivo, que aumenta a força de contração em até 20%. Este efeito inotrópico positivo é mais forte que o efeito inotrópico negativo que tem início já no primeiro minuto da cromatografia e volta a ser detectado após o sexto minuto.

### 5.3 – Identificação e quantificação do composto ativo

Em uma análise preliminar de espectrometria de massa por sistema MALDI-TOF/TOF, analisando a faixa de massa molecular de 50 a 800 Da das frações cromatográficas F1 a F13 (Figura 3A), observa-se a presença repetida do íon 146,2

(dado não mostrado), sugerindo a presença de acetilcolina que apresenta massa molecular de 146,20 Da.

Para confirmação da presença desse composto na peçonha, Ach padrão (SIGMA) e peçonha bruta de *Lasiodora* sp. foram encaminhadas para análise em espectrometria de massa em sistema ESI-MS/MS, na faixa de 50-200 m/z, e os íons 146 foram submetidos a fragmentação em método CAD (Figura 9A-B).

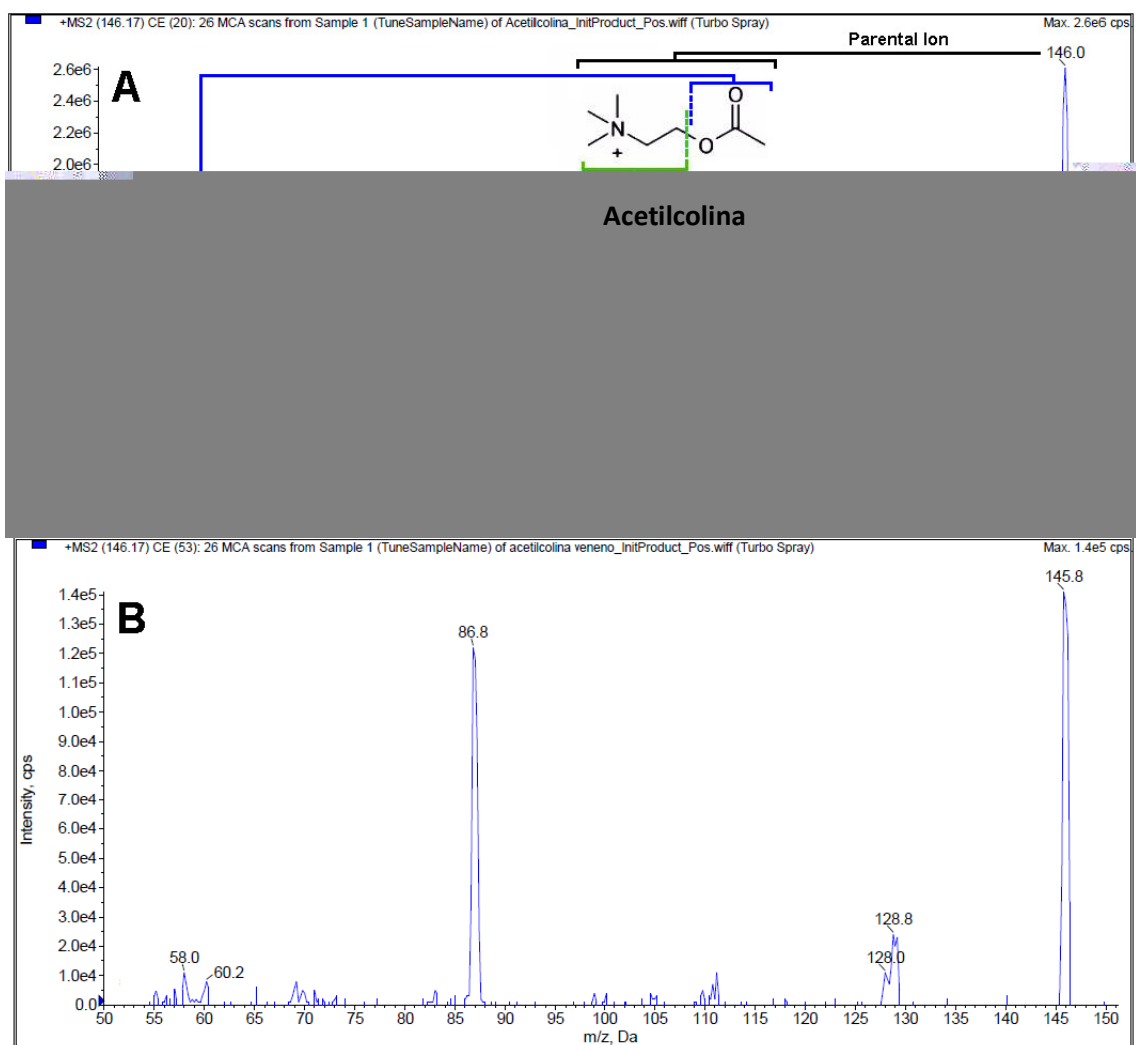


Figura 9: Espectrograma de massa em sistema ESI-MS/MS, na faixa 50-200m/z. (A). Padrão de fragmentação de Acetilcolina Padrão (SIGMA), por método CAD. (B) Padrão de fragmentação do íon 146,0 m/z da peçonha de *Lasiodora* sp. Esquema padrão de fragmentação da acetilcolina retirado de Utel *et al.*, 2005

A presença na peçonha bruta do íon 145,8 m/z, bem como o padrão de fragmentação com a presença do íon 86,8 m/z, são similares ao íon parental e fragmentos de Ach padrão (Sigma), confirmando a presença de Ach na peçonha de *Lasiadora* sp.

Após a confirmação da ocorrência de acetilcolina, foi realizada uma corrida cromatográfica aplicando 0,5 mg de acetilcolina padrão nas mesmas condições da figura 7, onde as frações também foram recolhidas temporalmente, minuto a minuto por 26 minutos. Cada fração temporal foi testada em preparação de fatia de ventrículo. O cromatograma em sistema de RP-HPLC é representado pela linha azul e a ação farmacológica de cada fração cromatográfica recolhida temporalmente é representada pela linha preta. Observa-se que a acetilcolina elui ao longo do cromatograma, apresentando dois momentos de eluição cromatográficos, no segundo minuto de corrida e outro com 14 minutos (Figura 10A).

Ao comparar as ações farmacológicas das frações cromatográficas coletadas temporalmente da peçonha bruta com acetilcolina padrão, observa-se a equivalência temporal da segunda maior atividade próximo ao minuto 14 (Figura 10B).

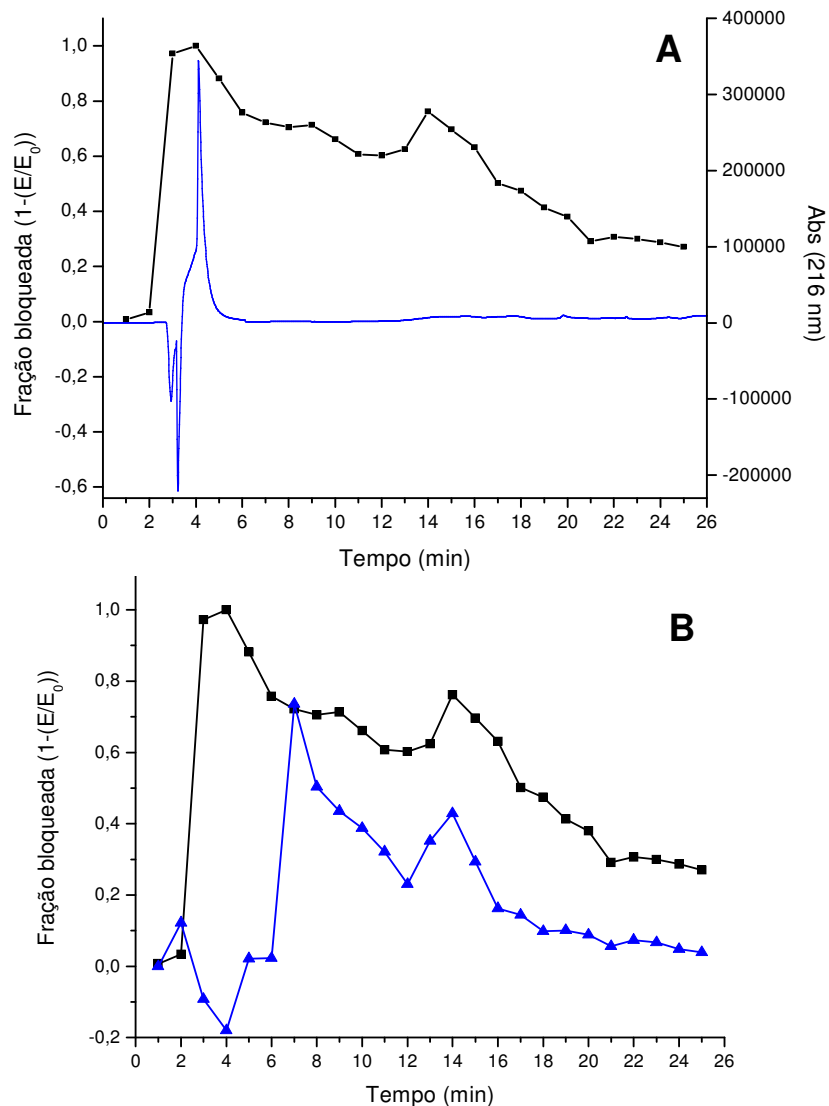


Figura 10: (A) Cromatograma de 500 µg de acetilcolina em sistema RP-HPLC em coluna analítica C18 Vaydac 218TP54, 5µ (4,6 x 250 mm) em 216 nm (Linha azul, ▲), sobreposto com atividade das frações coletadas por tempo em preparação de fatia de ventrículo de rã, expresso em fração bloqueada ( $1-(E/E_0)$ ) (Linha preta, ■) (B) Sobreposição das atividades das frações coletadas por tempo dos cromatogramas de 0,5 mg de acetilcolina (Linha preta, ■) e 1 mg de peçonha bruta (Linha azul) em preparação de fatia de ventrículo de rã, expresso em fração bloqueada ( $1-(E/E_0)$ ).

Para quantificação da concentração de Ach na peçonha foram utilizadas duas diferentes abordagens. A primeira abordagem empregada, foi construída uma curva dose-resposta de Ach com preparação com fatia de ventrículo de rã (ANOVA e teste-T,  $p < 0,05$ ). Nesta modelo de quantificação, 25 µg de peçonha bruta apresentaram uma resposta equivalente a  $222,89 \pm 9,9$  ng de Ach padrão (Figura 11), estimando-se que

cada miligrama de peçonha bruta contém  $8,88 \pm 0,43 \mu\text{g}$  de Ach, o que representa entre 0,88 e 0,93% do seu peso seco.

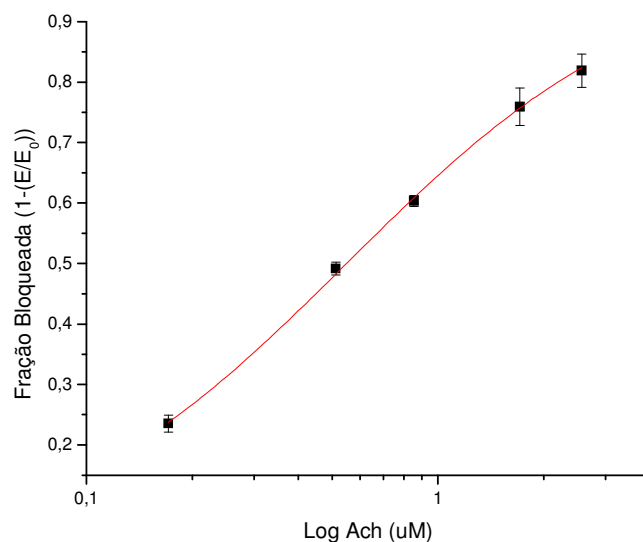


Figura 11: Curva dose resposta de Ach em preparação de fatia de ventrículo de rã (n=3). Ajuste feito pela equação de Hill ( $y=V_{\max} * x^n / [K^n + x^n]$ ) com  $V_{\max}= 1$ ,  $K= 0,55 \pm 0,007$  e  $n= 1$ .  $R^2 = 0,998$ .

Em relação à quantificação analítica foi realizada uma análise por sistema LC-ESI-MS/MS (Figura 12), que revelou a presença de  $8,75 \pm 0,45 \mu\text{g}$  de Ach por miligrama de peçonha (Tabela 2), o que corresponde a 0,87 e 0,92% do peso seco da peçonha bruta. Através dessa quantificação também foi possível estimar a concentração molar em que a Ach está presente na peçonha  $12,86 \pm 5,01 \text{ mM}$ . Ao comparar os dois tipos de quantificação verifica-se que são estatisticamente semelhantes (ANOVA e teste-T,  $p > 0,05$ ).

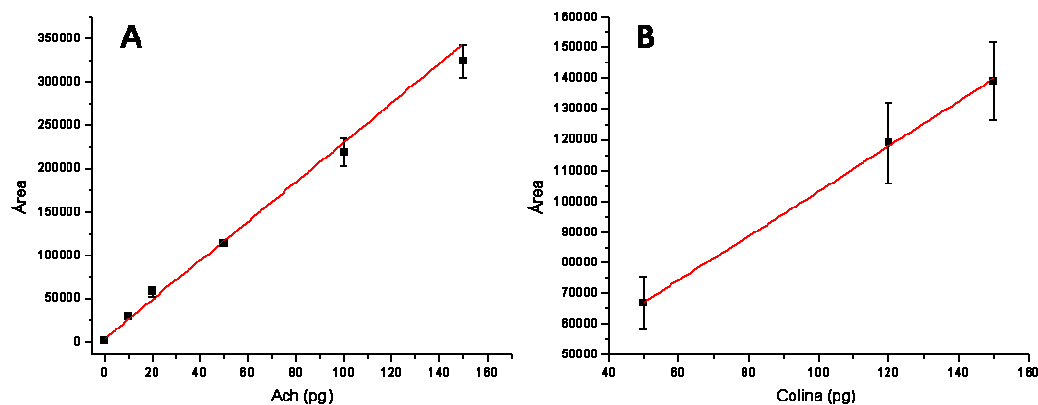


Figura 12: Curva de quantificação por LC-ESI-MS/MS de (A) Ach  $a= 2879,24 \pm 759,19$  e  $b= 2270,86 \pm 56,56$ ,  $R^2 = 0,991$  e (B) Ch  $a= 30444,79 \pm 14,251$  e  $b= 728,64 \pm 142,37$ ,  $R^2= 0,999$  ( $n=3$ ). Ajuste linear ( $y=a+bx$ ).

Tabela 2: Concentração de acetilcolina presente na peçonha de *Lasiodora* sp.

<i>Lasiodora</i> sp.	Volume de peçonha (µL)	Peso seco (mg)	Total de Ach (µg)	µg Ach/ mg PB	% do peso seco	Concentração (mM)
Indivíduo 1	10	1,63	13,43	8,24	0,82	9,18
Indivíduo 2	10	1,77	15,83	8,95	0,89	10,83
Indivíduo 3	10	2,99	27,15	9,08	0,90	18,57
			Média	8,757	0,87	12,86
			Desvio	$\pm 0,45$	$\pm 0,04$	$\pm 5,01$

#### 5.4 – Teste de degradação de acetilcolina

Foi realizada uma degradação biológica da Ach presente na peçonha através de ação enzimática de acetilcolinesterase presente no soro de rato e uma degradação química para ésteres de colina por meio de hidrólise alcalina.

Antes de serem testados, os produtos de degradação química foram neutralizados com HCl 0,1 N e os testes mostraram não haver ação inotrópica nos produtos de degradação de 1,0 µg de Ach e do controle. Já no produto de degradação de 50 µg de peçonha apresentou uma pequena ação inotrópica positiva com o aumento da força de contração da fatia de ventrículo de aproximadamente 10% (Figura 13).



Figura 13: Miocardiograma de fatia de ventrículo sob estimulação elétrica com frequência 0,15 Hz, tempo de duração de 2 ms e intensidade de 20 V, em banho de 2 mL das amostras tratadas com hidróxido de sódio 0,2 N. n= 3. (A) Aplicação de solução Ringer (B) incubado NaOH. (B) Aplicação de 1 µg de acetilcolina (Ach) incubado com NaOH. (C) Aplicação de 50 µg pesonha bruta de *Lasiadora* sp. (PB) incubada com NaOH.

Nos testes em preparação de fatia de ventrículo com os produtos de degradação biológica de 50 µg de peçonha, de 1,0 µg de Ach e do controle não foi observado nenhum efeito inotrópico (Figura 14).

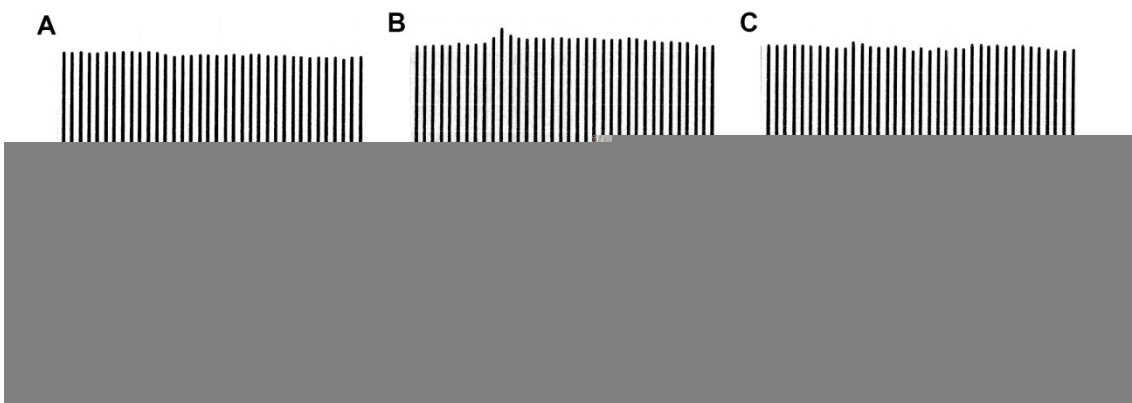


Figura 14: Miocardiograma de fatia de ventrículo sob estimulação elétrica com frequência 0,15 Hz, tempo de duração de 2 ms e intensidade de 20 V, em banho de 2 mL das amostras tratadas com soro de rato. n= 3. (A) Aplicação de PBS (B) incubado com soro. (B) Aplicação de 1 µg de acetilcolina (Ach) incubado com soro. (C) Aplicação de 50 µg peçonha bruta de *Lasiadora* sp. (PB) incubada com soro.

## 5.5 – Presença de acetilcolina e colina em outras peçonhas

A quantificação analítica por LC-ESI-MS/MS foi empregada de para detectação e quantificação de Ach e colina (Figura 11) na peçonha de diversas espécies de aranha,



escorpiões e quilópodos (Tabela 3). A Ach foi encontrada na maioria das espécies em concentrações de nanogramas por miligrama de peçonha, destacamos que as maiores concentrações foram encontradas em espécies de aranhas caranguejeiras. A presença de colina é dada em maiores concentrações na ordem de micrograma por miligrama em quase todas as espécies.

Tabela 3: Famílias e espécies de animais peçonhentos que apresentam na peçonha acetilcolina (Ach) e colina (Ch).

Família	Espécie	Nº Indivíduos	Presença de Ach	µg Ach/ mg PB	Presença de Ch	µg Ch/ mg PB
Theraphosidae <sup>1</sup>	<i>Acanthoscurria paulensis</i> ♂	1	Sim	NQ	Sim	2,59
	<i>Acanthoscurria</i> sp1.	1	Sim	24,23	Sim	2,03
	<i>Acanthoscurria</i> sp2.	1	Sim	10,75	Sim	1,70
	<i>Avicularia</i> sp.	1	Sim	NQ	Sim	3,55
	<i>Grammostola</i> sp.	1	Sim	0,39	Sim	9,05
	<i>Guyruita cerrado</i>	1	Sim	NQ	Sim	1,17
	<i>Hapalopus</i> sp. ♂	1	Sim	1,34	Sim	0,72
	<i>Lasiodora</i> sp.	3	Sim	8,757 ± 0,45	Sim	3,95
	<i>Nhandu coloratovillosus</i>	1	Sim	NQ	Sim	1,22
	<i>Vitalius</i> sp.	1	Sim	NQ	Sim	2,97
Actinopodidae <sup>1</sup>	<i>Actinopus</i> sp.	1	Sim	0,20	Sim	3,12
Ctenidade <sup>1</sup>	<i>Ancylometes</i> sp.	1	Não	-	Sim	NQ
	<i>Phoneutria eickstedtae</i>	1	Sim	0,40	Sim	13,80
	<i>Phoneutria nigriventer</i>	1	Sim	0,15	Sim	0,54
Bothriuridae <sup>2</sup>	<i>Bothriurus</i> sp.	5	Sim	0,12	Sim	4,15
Buthidae <sup>2</sup>	<i>Rhopalurus agamemnon</i>	1	Sim	0,10	Sim	2,41
	<i>Rhopalurus rochai</i>	1	Sim	0,13	Sim	6,16
	<i>Tityus fasciolatus</i>	3	Sim	0,10	Sim	2,75
	<i>Tityus mattogrossensis</i>	15	Sim	0,16	Sim	4,99
Scolopendridae <sup>3</sup>	<i>Scolopendra viridicornis nigra</i>	1	Sim	0,14	Sim	5,92
	<i>Scolopendra viridicornis viridicornis</i>	1	Sim	0,13	Sim	9,55

<sup>1</sup> Ordem Araneae (Aranhas)

<sup>2</sup> Ordem Escorpiones (Escorpiões)

<sup>3</sup> Ordem Scolopendromorphae (Lacraias)

NQ: não foi possível quantificação

## 6 – Discussão

O fracionamento em filtros com membrana de exclusão apresentou uma separação eficiente para os compostos que possuem peso molecular abaixo do tamanho de exclusão da membrana. Já o material que fica retido não apresenta uma separação satisfatória, pois moléculas de baixo peso molecular continuam presentes na fração, mesmo após várias lavagens. Possivelmente a interação eletrostática que ocorre entre proteínas/peptídeos com pequenas moléculas e íons dificultam sua passagem (Scatchard, 1949).

Esta metodologia de fracionamento por filtração é rápida, fácil, permite a utilização de grandes quantidades de material bruto e pode nortear a busca de compostos ativos em misturas complexas, como peçonhas. Somente com um passo de filtração, em filtros de membrana de 3 kDa, foi possível separar a peçonha bruta em classes de moléculas diferentes, fração protéica da peçonha e outras moléculas.

Utilizando somente a fração filtrada foi possível identificar que os efeitos sobre o coração observados inicialmente na peçonha bruta estavam presente nesta fração. Nenhuma das frações peptídicas testadas apresentou atividade inotrópica em preparação de fatia de ventrículo de rã.

A preparação fisiológica de coração *in situ* de rã mostrou-se adequada para avaliação do efeito de substâncias e misturas sobre o coração em condições mais próximas às condições fisiológicas naturais, além de fornecer a observação de efeitos cronotrópicos e inotrópicos, bem como o registro da atividade elétrica do coração. Porém, um limitante desse ensaio é a dificuldade em lavar completamente a preparação.

Em contrapartida a preparação de fatia de ventrículo de rã pode ser “lavada, todavia observa-se somente o efeito inotrópico.

Como todo o coração é innervado com vias parassimpáticas e em todas as regiões encontramos receptores muscarínicos para Ach (Dhein *et al.*, 2001) a preparação de fatia de ventrículo de rã apresenta uma ótima resposta para compostos que atuam sobre estes receptores, sendo indicada para estudos de agonistas e antagonistas muscarínicos.

Durante o processo de fracionamento da peçonha bruta por RP-HPLC nos deparamos com dois problemas, primeiro, a absorvidade molar da Ach é baixa, o que dificulta a sua visualização mesmo em comprimentos de onda na faixa de 200 a 250 nm. Absorvidade molar, também conhecida como coeficiente de extinção molar, é a capacidade que um mol de substância em absorver luz a um dado comprimento de onda em um determinado solvente seguindo as propriedades da Lei de Lambert-Beer (Rocha & Teixeira, 2004).

Segundo, a Ach não interagiu de maneira convencional com colunas cromatográficas de fase reversa octadecilsilano, pois apresenta uma longa cauda que se arrasta ao longo do início da cromatografia e dois momentos de eluição cromatográficos distintos. É sabido que compostos de amônio quaternário apresentam distorções na forma dos picos e tempo de eluição quando separados em colunas de sílica gel por haver interações de troca iônica entre os analitos e grupos silano reduzidos pela fase móvel (Wahlund & Sokolowski, 1978). Em colunas de octadecilsilano as distorções também são reportadas para substâncias carregadas e estas estão relacionadas à ocorrência de interações iônicas entre os analitos e resíduos de grupamentos silano não ligados a cadeia carbônica. (Van der Houwen *et al.*, 1981; Reynolds *et al.*, 1983). Sugere-se que

esteja ocorrendo este tipo de interação entre a Ach e a fase estacionária, o que explicaria o comportamento cromatográfico observado.

Sendo assim, recomenda-se um maior cuidado nos estudos de bioprospecção alvo-guiada com fracionamento, como acima descrito, utilizando-se preparações sensíveis a acetilcolina, para se evitar falsos positivos. Pires Jr (comunicação pessoal) atribui um efeito inotrópico negativo a uma molécula isolada da peçonha de *Acanthoscurria* sp. em RP-HPLC, com tempo de eluição de 15 minutos em sistema de RP-HPLC. Hoje sugere-se que exista uma contaminação dessa fração com acetilcolina.

A Ach apresenta-se como uma molécula naturalmente protonada por se tratar de um amônio quaternário. Desta forma, seu peso molecular (Da) calculado e sua relação massa carga (m/z) são as mesmas 146,16. Os dados de espectrometria de massa indicam a presença deste íon na peçonha e seu padrão de fragmentação é idêntico ao encontrado para a fragmentação de Ach padrão, nos dois sistemas de espectrometria utilizados. Além da equivalência com a forma de fragmentação do padrão de Ach os resultados obtidos conferem com os dados encontrados na literatura para a fragmentação de Ach (Uutela *et al.*, 2005).

A metodologia de quantificação fisiológica de Ach mostrou acurácia na detecção de Ach presente na peçonha. Além disso, os métodos de quantificação adotados foram estatisticamente semelhantes entre si. Sugere-se o uso desse método fisiológico de quantificação para averiguação da concentração de Ach e colinomiméticos com ação em receptores muscarínicos para Ach. Este se apresenta como uma maneira mais rápida, de baixo custo e acessível de quantificação de Ach comparado aos métodos analíticos por LC-MS/MS.

Nos testes de degradação química e biológica não foi observado efeito inotrópico negativo causado pela aplicação de peçonha bruta em preparação de fatia de ventrículo de rã. Notou-se que no processo de degradação alcalina da peçonha bruta de *Lasiadora* sp. a Ach, que é sensível ao aumento de pH sofreu degradação, uma vez que não observa-se efeito inotrópico negativo e nota-se um efeito inotrópico positivo quando essas amostras foram testadas em preparação de fatia de ventrículo de rã. Na degradação com soro de rato, o desaparecimento do efeito possivelmente deve-se ao processo de degradação enzimática promovida pela presença de acetilcolinesterases (Stedman *et al.*, 1932), e não uma degradação química, uma vez que o pH foi mantido em 7,5.

Os ensaios em fatia de ventrículo de rã realizados com a peçonha bruta degradada quimicamente e com frações cromatográficas de RP-HPLC coletadas temporalmente apresentaram mais um efeito da peçonha sobre o coração, ação inotrópica positiva. Esse efeito é sobreposto pelo efeito inotrópico negativo da Ach, que quando não está presente ou está concentrado se revela. O efeito não é notado na peçonha bruta incubada com soro de rato, sugerindo que a molécula causadora do efeito esta sendo degradada, consumida ou interage com os componentes do soro. Este fato nos mostra como as peçonhas de aranhas são ricas em moléculas farmacologicamente ativas.

Em seu trabalho Kalapothakis e colaboradores (2003) atribuem a ação cardiotóxica da peçonha a peptídeos com ação em canais para Na<sup>+</sup> voltagem dependentes que estariam atuando sobre a inervação parassimpática, sendo capazes de diminuir a voltagem de ativação dos canais e levando a liberação de vesículas de Ach na porção terminal dos nervos. Diferentemente dos resultados observados por Kalapothakis e colaboradores (2003), em estudo da ação da peçonha de *Lasiadora* sp. utilizando

preparação de coração isolado de rato, nossos resultados não corroboram a hipótese apresentada e atribuímos o efeito inotrópico observado à simples presença de Ach na peçonha do animal.

Kalapothakis e colaboradores (2003), provam a existência de liberação de Ach, mas não conseguem abolir completamente o efeito inotrópico negativo utilizando vesamicol, um inibidor de transporte de vesículas de Ach. Acreditamos que os efeitos cardiotóxicos observados por Kalapothakis e colaboradores (2003) são o somatório do efeito da Ach presente na peçonha mais o efeito causado pela liberação de vesículas de Ach. Sua liberação ocorre por meio da estimulação da inervação parassimpática em sua porção ganglionar através da Ach presente na peçonha, explicando a sutil redução dos efeitos com a utilização do inibidor de transporte vesicular de Ach.

Em insetos a concentração de Ach em extratos cefálicos de algumas espécies de moscas, besouros e baratas varia de 0,009 a 0,032  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (Lewis & Smallman, 1956). Em tecidos não nervosos de lepidópteros a concentração de Ach varia de acordo com o tecido e estágio de vida. Em larvas da mariposa *Artica caja* foi encontrada Ach em concentração de 0,025  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso seco nos extratos de hemolinfa, intestino e parede corporal e o acúmulo de Ach de 3-4,5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso seco em extratos da glândula de seda. Em imagos da mesma espécie foram detectados concentrações de Ach menores que 0,005  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso seco em extratos da corda nervosa dorsal e acúmulo de Ach em concentrações de 60  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso seco em extratos de tecidos de glândulas sexuais acessórias e ducto ejaculatório (Morley & Schachter, 1963). A glândula cervical de defesa da mariposa *Arctia caja* também acumula na concentração de 3-6  $\mu\text{g}/\text{mg}$  um éster de colina identificado como acrililcolina com efeito agonista de Ach (Bisset *et al.*, 1960).

Os valores de concentração de Ach encontrados em tecidos de insetos que não acumulam Ach são próximos aos encontrados na peçonha da maioria dos animais testados, na casa das decimicrogramas por mg, (ver Tabela 3), sugerindo que sejam concentrações basais do tecido.

Schroeder e colaboradores (2008) reportam a presença de Ach e Ch na peçonha de 10 aranhas utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa para identificação de compostos não peptídicos presente na peçonha bruta de 77 espécies de aranhas de 28 famílias (Tabela 5). Entretanto, os autores não quantificaram as concentrações presentes.

Tabela 5: Famílias e espécies onde foram encontradas acetilcolina (Ach) e colina (Ch) por Schroeder *et al.*, 2008. O X indica a presença do composto.

Família	Espécie	Ach	Ch
Araneidae	<i>Araneus diadematus</i>		X
Segestriidae	<i>Ariadna sp.</i>		X
Sparassidae	<i>Eusparassus oculatus</i>	X	
	<i>Micrommata virescens virvirescens</i>	X	
Theraphosidae	<i>Aphonopelma seemani</i>	X	
	<i>Chilobrachys sp.</i>	X	
	<i>Haplopelma albostriatum</i>	X	
	<i>Haplopelma lividum</i>	X	
	<i>Ornithoctonus huwena</i>	X	
	<i>Selenocosmia hainana</i>	X	

Os resultados aqui apresentados mostram que as maiores concentrações de Ach foram encontradas em aranhas caranguejeiras, dos gêneros *Acanthoscurria*, *Lasiadora* e *Hapalopus* em concentrações de 10 a 200 vezes maiores do que a média das espécies analisadas. Sugere-se que a presença de acetilcolina nas concentrações encontradas evidencia acumulação, e que a mesma é utilizada como uma toxina integrante da peçonha.

Além da presença na peçonha de aranhas já foi reportada a presença de Ach como constituinte da peçonha da vespa européia *Vespa crabro* na concentração de 18-50 µg/mg de glândula de peçonha seca (Bhoola *et al.*, 1961), na peçonha vespa solitária *Philanthus triangulum* em concentrações de 0,4 µg por glândula (Piek *et al.*, 1983a), na peçonha da abelha *Bombus terrestris* na concentração de 30 µg por glândula (Piek *et al.*, 1983b) e da abelha *B. morrisoni* (Hussein *et al.*, 1999).

A Ach apresenta inúmeras ações biológicas, sendo assim, sua inoculação pode acarretar sérios problemas a presa ou predador. Em vertebrados a Ach atua como neurotransmissor em motoneurônios, neurônios pré-ganglionares do sistema autonômico, em neurônios pós-ganglionares do sistema parassimpático e em várias sinapses do sistema nervo central (Cingolani *et al.*, 2004).

Como neurotransmissor do sistema parassimpático, sua liberação na parte terminal dos neurônios pós-ganglionares provoca efeitos inotrópicos e cronotrópicos sobre o coração, contração da pupila, do músculo ciliar, das glândulas lacrimais, da musculatura lisa bronquial, da vesícula e ductos biliares, vasodilatação da musculatura lisa vascular da pele, das mucosas, da musculatura esquelética e das glândulas salivares, vasoconstricção das coronárias, liberação de óxido nítrico no endotélio vascular, aumento da motilidade e tônus dos intestinos e estômago, entre outras atividades. Ela também é o neurotransmissor liberado pela porção terminal de motoneurônios na placa motora promovendo a contração da musculatura esquelética (Cingolani *et al.*, 2004). Em invertebrados é um dos principais neurotransmissores do sistema nervo central de insetos e age sobre a musculatura visceral, em ambos os casos interagindo com receptores muscarínicos, nicotínicos e/ou mistos (Osborne, 1996).



Do ponto de vista energético, a Ach apresenta-se como uma molécula de baixo custo, em comparação com peptídeos complexos. A Ach como toxina teria uma ação local e rápida, pois em pouco tempo ela é degradada pela ação de acetilcolinesterases do tecido ou fluidos corporais onde foi inoculada, não conseguindo ser disseminada em via sistêmica, a menos que esteja em altíssimas concentrações o que impede a hidrólise pelas colinesterases através de inibição por substrato (Piek *et al.*, 1983b).

A Ach possui um caráter hidrofílico e apresenta fácil dispersão no organismo do alvo após ser inoculada, além disso, apresenta ação vasodilatadora que auxilia na dispersão de outras toxinas presentes na peçonha. O aumento de concentração de Ach na placa motora da musculatura esquelética pode provocar uma contração tetânica com possível paralisia momentânea e dor intensa. Também pode agir como uma toxina ou substância facilitadora da ação e dispersão de outras moléculas que apresentam efeitos mais duradouros sobre a presa.

Aranhas caranguejeiras se alimentam de diversos invertebrados até pequenos vertebrados (Foelix, 2011). A Ach, como toxina, é efetiva tanto para vertebrados e invertebrados, garantindo a eficiência da peçonha sobre diferentes presas e permitindo os hábitos alimentares generalistas dessas aranhas.

## 7 – Conclusões

- O composto cardioativo que apresenta efeito inotrópico negativo reversível, encontra-se na fração de baixo peso molecular, <3 kDa da peçonha de *Lasiadora* sp.
- O composto cardioativo observado em preparação de fatia de ventrículo de rã foi identificado, por meio de espectrometria de massas e corroborado com ensaios de degradação química e biológica, como sendo acetilcolina, presente na concentração de  $8,75 \pm 0,45$  µg/mg de peçonha bruta de *Lasiadora* sp.
- Pela primeira vez foi reportado o acúmulo de acetilcolina na peçonha de aranhas caranguejeiras do gênero *Lasiadora*, *Acanthoscurria* e *Hapalopus* e seu uso como toxina.
- Nenhuma das frações peptídicas da peçonha de *Lasiadora* sp. obtidas por RP-HPLC testadas, em preparação de fatia de ventrículo, mostrou-se cardioativa.
- Foi observada presença de acetilcolina e colina em diversas peçonhas de outros artrópodes, sugerindo que seja mais comum do que se imagina a presença dessas substâncias em peçonhas.

## 8 – Referências Bibliográficas

- Almeida, A.P., Couto, A.S., Moraes-Santos, T., Azevedo, A.D., Freire-Maia, L. (1992). Effects of toxin Ts- $\gamma$ , purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom, on the isolated rat atria. **Toxicon**, v. 30, p. 339-343.
- Bhoola, K.D., Calle, J.D., Schachter, M. (1961). Identification of acetylcholine, 5-hydroxytryptamine, histamine, and a new kinin in hornet venom (*V. crabro*). **J. Physiol.**, v. 159, p. 167-182.
- Bisset, G.W., Frazer, J.F.D., Rothschild, M., Schachter, M. (1960). A pharmacologically active choline ester and other substances in the garden tiger moth, *Arctia caja* (L). **Proc. Roy. Soc. B.**, v. 152, p. 255-262.
- Blusztajn, J.K. (1998). Choline, a vital amine. **Science**, v. 281, p. 794–795.
- Castro I.M., Vieira A.L.G., Kalapothakis, E. (2007). Screening of a *Lasiadora* sp. expression library and molecular cloning of *Lasiadora* sp. toxins in expression vectors. Submitted (JAN-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Cho, H.S., Takano, M., Noma, A. (2003). The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. **J. Physiol.**, v. 550, p. 169–180.
- Cingolani, H.E., Houssay, A.B. e cols. 2004. **Fisiologia humana de Houssay**. 7<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre, Brasil. Artmed, p. 1124.
- Dhein, S., van Koppen, C.J., Brodde, O.E (2001). Muscarinic receptors in the mammalian heart. **Pharmacol Res.**, v. 44, p. 161–182
- DiFrancesco, D. (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 55, p. 455–472.
- Dudel, J., Peper, K., Rüdell, R., Trautwein, W. (1967). The effect of tetrodotoxin on the membrane current in cardiac muscle (Purkinje fibers). **Pflugers Arch.**, v. 295, p. 213-226.

- Dutra, A.A.A., Sousa, L.O., Resende, R.R., Brandão, R.L., Kalapothakis, E., Castro, I.M. (2008). Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiodora* sp. effecting on calcium channels. **Peptides**, v. 29, p. 1505 – 1513.
- Escoubas, P., Célérier, M.L., Nakajima, T. (1997). High-performance liquid chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide fingerprinting of tarantula venoms in the genus *Brachypelma*: chemotaxonomic and biochemical applications. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 11, p. 1891–1899.
- Estrada, G., Villegas, E., Corzo, G. (2007). Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Natural Products Reports**, v. 24, p. 145-161.
- Fletcher, J.E., Jiang, M.S. (1993). Possible mechanisms of action of cobra snake venom cardiotoxins and bee venom melittin. **Toxicon**,v.31, p. 669–695.
- Foelix, R.F. (2011). **Biology of spiders**. 3<sup>a</sup> ed. Oxford: Oxford University Press. p. 419.
- Franke, W.W., Borrmann, C.M., Grund, C., Pieperhoff, S. (2006). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. **Eur J Cell Biol.**, v. 85, p. 69-82.
- Gurrola, G.B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A., Olivotto, M., Possani, L.D., Wanke, E. (1999). A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K<sup>+</sup> channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom.**FASEB J.**, v. 13, p. 953–962.
- Harvey, A.L., Marshall, R.J., Karlsson, E.(1982) Effects of purified cardiotoxins from the Thailand cobra (*Naja naja siamensis*) on isolated skeletal and cardiac muscle preparations.**Toxicon**,v. 20, p. 379-396.
- Hussein, A., Nabil, Z., Zalat, S., Rakha, M. (1999). Effect of the *Bombus morrisoni* venom on cardiac, skeletal and smooth-muscle activity. **Egyp. Brit. Biologi. Scoc.**, v. 1, p. 45-56.

- Jalife, J., Slenker, V.A.J., Salata, J.J., Michaels, D.C. (1983). Dynamic vagal control of pacemaker activity in the mammalian sinoatrial node. **Circ. Res.**, v. 52, p. 642-656.
- Kalapothakis, E., Kushmerick, C., Gusmão, D.R., Favaron, G.O.C., Ferreira, A.J., Gomez, M.V., Almeida, A.P. (2003). Effects of the venom of a Mygalomorph spider (*Lasiadora* sp.) on the isolated rat heart. **Toxicon**, v. 41, p. 23-28.
- Katz, A.M. (2011). **Physiology of the Heart**. 5<sup>a</sup> ed. Baltimore, EUA. Lippincott Williams & Wilkins, p. 556.
- Klabunde, R.E. (2011). **Cardiovascular Physiology Concepts**. 2<sup>a</sup> ed. Baltimore, EUA. Lippincott Williams & Wilkins p 256.
- Koizumi, K., Terui, N., Kollai, M. (1983). Neural control of the heart: significance of double innervation re-examined. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 7, p. 279–97.
- Kushmerick, C., Mesquita de Carvalho, F., Maria, M., Massensini, A.R., Romanosilva, M.A., Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Prado, M.A.M. (2001). Effects of a *Lasiadora* spider venom on Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> channels. **Toxicon**, v. 39, p. 991-1002.
- Lewis, S.E. & Smallman, B.N. (1956). The estimation of acetylcholine in insects. **J. Physiol.**, v. 134, p. 241-256.
- Lima, M.E., Pimenta, A.M.C., Zingali, R.B., Eauclaire, M.F.M., Rochat, H. (Org.). **Animal venoms: state of art- Perspectives in Health and Biotechnology**. Belo Horizonte, Editora UFMG, 2009. p. 800.
- Mintz, I.M., V.J. Venema, M.E. Adams, B.P. Bean. (1991). Inhibition of N- and L-type Ca<sup>2+</sup> channels by the spider venom toxin  $\omega$ -Aga-IIIa. **Proc. Natl. Acad. Sci.** p. 88, p. 6628–6631.
- Morley, J. & Schachter, M. (1963). Acetylcholine in non-nervous tissues of some lepidoptera. **J. Physiol.**, v. 168, p. 706-715.
- Osborne, R.H., (1996). Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. **Pharmacol. Ther.**, v. 69, p. 117–142.

- Pappano, A.J. O sistema cardiovascular. In: Koeppen, B.M. & Stanton, B.A. (Ed.) **Berne & Levy - Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 289-393.
- Piek, T., Buitenhuis, A., Veldsema-Currie, R.D., Mantel, P. (1983a). Smooth muscle contracting compounds in venoms of sphenoid wasps (Hym: Sphecidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 75C, p. 153-159.
- Piek, T., Veldsema-Currie, R.D., Spanjer, W., Mantel, P. (1983b). Acetylcholine and an unidentified muscle-contracting factor in the venom of bumblebee, *Bombus terrestris* L. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 75C, p. 351-356.
- Reynolds, D.L., Repta, A.J., Sternson, L.A. (1983). Cation exchange contribution to the retention of specific quaternary ammonium compounds in reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 1, p. 339-346.
- Rocha, F.R.P., Teixeira, L.S.G. (2004). Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quím. Nov.**, v.27, n.5, p. 807-812.
- Rohr, S. (2004). Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. **Cardiovasc. Res.**, v. 62, p. 309–322.
- Roseghini, M., Severini, C., Erspamer, G.F., Erspamer, V. (1996). Choline esters and biogenic amines in the hypobranchial gland of 55 molluscan species of the neogastropod muricoidea superfamily. **Toxicon**, v. 34, p. 33-55.
- Scatchard, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 51, p. 660-672.
- Schroeder, F.C., Taggi, A.E., Gronquist, M., Malik, R.U., Grant, J.B., Eisner, T., Meinwald, J. (2008). NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 14283-14287.
- Schwartz, E.N., Schwartz, C.A., Sebben, A., Largura, S.W., Mendes, E.G. (1999). Indirect cardiotoxic activity of the caecilian *Siphonops paulensis* (Gymnophiona, Amphibia) skin secretion **Toxicon**, v. 37, p. 47–54.

- Stedman, E., Stedman, E., Easson, L. H. (1932). Choline-esterase. An enzyme present in the blood-serum of the horse. *Biochem. J.*, v. 26, p. 2056-2066.
- Talman, W.T., Kelkar, P. (1993). Neural control of the heart: central and peripheral. *Neurol. Clin.*, v. 11, p. 239–256.
- Uutel, P., Reinilä, R., Piepponen, P., Ketola, R.A., Kostianen, R. (2005). Analysis of acetylcholine and choline in microdialysis samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 19, p. 2950-2956.
- Van Der Houwen, O.A.G.J., Sorel, R.H.A., Hulshoff, A., Teeuwssen, J., Indemans, A.W.M. (1981). Ion-exchange phenomena and concomitant pH shifts on the equilibration of reversed-phase packings with ion-pairing reagents. *J. Chromat. A*, v. 209, p. 393-404.
- Vieira, A.L.G., Moura, M.B., Babá, E.H., Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., Castro, I.M. (2004). Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiadora* sp. *Toxicon*, v. 44, p. 949-952.
- Vizzotto, C.S. (2009). Isolamento e caracterização de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira *Lasiadora* sp. **Dissertação de mestrado** – Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília.
- Wahlund, K.G., Sokolowski, A. (1978). Reversed-phase ion-pair chromatography of antidepressive and neuroleptic amines and related quaternary ammonium compounds. *J. Chromat. A*, v. 151, p. 299-310.
- Xiao, Y., Tang, J., Hu, W., Xie, J., Maertens, C., Tytgat, J., Liang, S. (2005). Jingzhaotoxin-I, a novel spider neurotoxin preferentially inhibiting cardiac sodium channel inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 12069–12076.

**Capítulo 2: Efeito da peçonha de *Lasiadora* sp. sobre receptores de acetilcolina do tipo nicotínicos.**



## **1 – Introdução**

### **1.1 – Junção neuromuscular**

No sistema nervoso se distinguem dois tipos diferentes de sinapses: elétricas e químicas. Na sinapse elétrica, duas células excitáveis se comunicam através da passagem de corrente elétrica entre elas. Na sinapse química, um potencial de ação na célula pré-sináptica causa a liberação de neurotransmissores que se difundem pela fenda sináptica, se ligam a receptores no neurônio pós-sináptico e alteram as propriedades elétricas da membrana pós-sináptica. A junção neuromuscular (JNM) é uma sinapse química especializada entre um axônio de um neurônio motor e uma fibra muscular, com uma estrutura e organização única que permite a transformação de um impulso elétrico nervoso em contração da musculatura esquelética (Cingolani *et al.*, 2004).

A JNM pode ser dividida anatomicamente em três os componentes básicos: (1) o elemento pré-sináptico, constituído por um ramo terminal de um axônio motor no qual o neurotransmissor é sintetizado, estocado e liberado; (2) a fenda sináptica, revestida por uma membrana basal; e (3) o elemento pós-sináptico, fibra muscular que contém os receptores para o neurotransmissor e canais iônicos que promovem o acoplamento excitação-contração. Em vertebrados, o neurotransmissor liberado na JNM é a acetilcolina (ACh) e o receptor de ACh envolvido no processo é o receptor nicotínico. Na grande maioria das JNM, cada fibra muscular é inervada por somente um neurônio motor, porém, um único neurônio motor pode inervar múltiplas fibras musculares (Engel, 1994).

Os terminais nervosos são regiões altamente especializadas do neurônio motor. Próximo a fibra muscular, o nervo motor perde a bainha de mielina e se divide em braços terminais finos, que se expandem em botões terminais pré-sinápticos e se

encaixam em depressões na membrana celular muscular. Sobre os botões nervosos é encontrada uma bainha de células epiteliais que acaba abruptamente a curta distância da JNM (Saito & Zacks, 1969).

O nervo terminal contém um grande número de componentes subcelulares relacionados às funções da fibra nervosa. Entre eles, os componentes mais importantes são as vesículas sinápticas, estruturas esféricas cercadas por membrana e repletas de moléculas de Ach, e os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes dos tipos P e Q localizados nas zonas ativas (Pumplin *et al.*, 1981; Smith & Augustine, 1988; Engel, 1991), que são relacionados com a fusão das vesículas de Ach à membrana dos botões sinápticos (Protti *et al.*, 1993).

A fenda sináptica está localizada entre a membrana do nervo terminal pré-sináptico e a membrana muscular pós-sináptica. A membrana muscular apresenta várias pregas e o espaço entre o topo dessas pregas e a membrana do neurônio é de aproximadamente 50 nm (Hall & Sanes, 1993; Engel, 1994). A lateral das pregas é recoberta por membrana basal que contém grande quantidade de acetilcolinesterase (AChE), que promove a degradação da Ach (McMahan *et al.*, 1978).

A região pós-sináptica é uma área especializada da membrana da fibra muscular, chamada de placa motora. No topo das pregas da placa motora está localizado o maior número de receptores nicotínicos, e é nessa mesma porção da membrana celular neuronal que são lançadas as vesículas com Ach, formando as zonas ativas. No fundo das pregas é encontrada uma alta concentração de canais para  $\text{Na}^+$  voltagem dependentes (Flucher & Daniels, 1989; Ruff & Whittlesey, 1992), que varia de acordo com o tipo de fibra muscular (Ruff & Whittlesey, 1993). A configuração anatômica da JNM favorece os receptores nicotínicos que são posicionados mais próximos das zonas

de liberação de Ach para uma rápida difusão e posterior metabolismo do neurotransmissor depois de sua interação com o receptor (Koeppen & Stanton, 2009).

São necessários apenas alguns milissegundos para a chegada do potencial de ação na porção terminal do nervo pré-sináptico e a subsequente despolarização da membrana da fibra muscular pós-sináptica. Entretanto, um grande número de diferentes e complexos processos ocorre durante esse período de tempo (Koeppen & Stanton, 2009).

O evento inicial na transmissão neuromuscular é a propagação de um potencial de ação do nervo através do axônio do motor, resultando em despolarização do terminal nervoso pré-sináptico. Como resultado da despolarização, canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes são abertos e o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular entra no botão sináptico. É este influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  que media a liberação do neurotransmissor, promovendo a exocitose das vesículas sinápticas. A quantidade de vesículas liberadas vai depender da quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  que entrou no botão sináptico em resposta ao potencial de ação inicial (Hubbard *et al.*, 1968; Barrett & Magleby, 1976; Salpeter, 1987; Engel, 1994).

Entretanto, não só potenciais de ação nervosos promovem a liberação das vesículas com Ach. Constantemente são liberadas vesículas de Ach de maneira espontânea que conseguem promover despolarizações da placa motora de baixa amplitude. Essas despolarizações são conhecidas como potenciais em miniatura da placa motora (MEPPs) e a frequência com que ocorrem é variável, mas as amplitudes geradas são constantes e variam pouco (Fatt & Katz, 1952). Dessa maneira, um MEPP representa a despolarização da placa motora induzida pela liberação espontânea de um “*quanta*” (quantidade de moléculas de Ach contidas em uma vesícula) e o potencial da placa motora produzido após liberação das vesículas por estímulo nervoso representa a

soma de todos MEPPs de “*quantas*” liberados no processo. Intrigantemente, a função dos MEPPs ainda não foi completamente esclarecida (del Castillo & Katz, 1956).

Na porção terminal dos nervos motores são mantidas concentrações constantes de Ach em condições fisiológicas de estímulo (Ali & Savarese, 1976). A Ach é sintetizada nesta mesma região por meio de colino-acetiltransferases que esterificam colina e acetil coenzima A (acetil-CoA). A acetil-CoA é proveniente das várias mitocôndrias presentes no local e transportada do interior das mitocôndrias para o citoplasma neuronal de maneira  $Ca^{2+}$  dependente (Engel, 1994). Após a hidrólise por AChEs da Ach liberada na fenda sináptica em colina e acetato, a colina é recapturada para dentro dos botões sinápticos através de uma via de alta afinidade que envolve um sistema dependente de  $Na^+$  (Beach *et al.*, 1980).

No processo de liberação de Ach, as vesículas sinápticas são transportadas até próximo à membrana neuronal e a membrana vesicular se une à membrana celular do botão sináptico. Se não houvesse um processo compensatório para essa união, a membrana neural iria aumentar de tamanho a cada transmissão neuromuscular. Tal fato não acontece por ocorrer um rápido processo de reciclagem da membrana vesicular que se integra, porém, ele ainda não está completamente desvendado (Koeppen & Stanton, 2009).

A cada fusão de membrana vesicular sináptica à membrana pré-sináptica são lançadas aproximadamente 10.000 moléculas de Ach na fenda sináptica, que se difundem através dela a uma velocidade rápida pela curta distância entre a zona de liberação de Ach e os receptores e pela alta constante de difusão da Ach (Magleby, 1994). A maior concentração de receptores nicotínicos nas zonas ativas faz com que os mesmos sejam saturados mais facilmente, aumentando a eficiência de ligação entre o

neurotransmissor e o receptor na proporção de 2:1. Esse modelo de saturação é conhecido como modelo de saturação de disco da interação de receptores de Ach (Salpeter, 1987).

A maioria das moléculas de Ach não são inicialmente hidrolisadas pelas AChEs devido à saturação das mesmas pela alta concentração de Ach (Salpeter, 1987). Dessa forma, elas chegam à membrana muscular, onde podem interagir se ligando a receptores nicotínicos. Para que haja a mudança conformacional necessária para a abertura do canal iônico acoplado ao receptor, é obrigatória a ligação de duas moléculas de Ach ao receptor nicotínico. Depois de um curto período de tempo, as moléculas de Ach se dissociam dos receptores nicotínicos, promovendo o fechamento do canal iônico. Após terem se dissociado, elas são rapidamente hidrolisadas pelas AChEs, para que não se liguem novamente ao receptor iniciando uma nova contração (Salpeter, 1987).

O grande número de receptores de Ach na membrana muscular a tornam muito sensível à liberação de Ach do nervo pré-sináptico. Os receptores nicotínicos formam canais cátion seletivos que são relativamente não seletivos a cátions específicos, permitindo a passagem de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (Dwyer *et al.*, 1980). A não seletividade ocorre graças ao tamanho do poro do canal, que é significativamente maior que o poro de canais voltagem dependentes que são altamente seletivos a um determinado íon (Ruff, 1986). Sendo assim, a contribuição relativa de cada diferente cátion para a corrente através do poro depende primariamente de suas concentrações e seus potenciais eletroquímicos através da membrana. A abertura do canal iônico do receptor nicotínico gera um influxo de  $\text{Na}^+$  e de  $\text{Ca}^{2+}$  e um efluxo de  $\text{K}^+$ , produzindo um potencial despolarizador conhecido como potencial da placa final (PPF). O canal abre-se por aproximadamente 1 ms e a abertura após as ligações das duas moléculas de Ach são

intermitentes, gerando rápidas aberturas e fechamentos chamados de “*bursts*”, que em condições normais ocorrem em uma frequência aleatória (Lindstrom, 1994).

Junto com os receptores nicotínicos de Ach, a membrana muscular também apresenta uma grande densidade de canais para Na<sup>+</sup> voltagem dependentes, localizados na base das pregas da membrana muscular (Engel *et al.*, 1977; Haimovich *et al.*, 1987; Ruff, 1992). Sua densidade é de aproximadamente 3 a 7 vezes maior na JNM que na membrana muscular extrajuncional, e as fibras rápidas apresentam uma maior densidade que as fibras lentas. A alteração do potencial de membrana causado pela abertura dos canais iônicos dos receptores nicotínicos causa a abertura dos canais para Na<sup>+</sup> voltagem dependentes, que promovem a despolarização da membrana muscular. A amplitude da corrente de Na<sup>+</sup> na membrana muscular vai depender da densidade dos canais, das condutâncias e da fração de canais que abrem em resposta a despolarização. Após ter ocorrido o potencial de ação muscular, a maioria dos receptores de Ach estão fechados e somente poucos ainda apresentam correntes remanescentes de canais que não se fecharam, sendo insuficientes para gerar um segundo potencial de ação muscular (Koeppen & Stanton, 2009).

O potencial de ação muscular se propaga em ambas as direções da fibra muscular, partindo da região da placa motora, chegando a regiões mais interiores e despolarizando o sistema de túbulos T musculares que promovem a liberação de Ca<sup>2+</sup> do estoque do retículo sarcoplasmático. O Ca<sup>2+</sup> lançado no meio intracelular se conecta às proteínas de inibição da contração muscular, que mudam sua conformação e deixam de inibir o sistema de contração, promovendo a contração e o acoplamento excitação-contração (Cingolani *et al.*, 2004).

Para que a contração muscular ocorra e de maneira bem sucedida desde a transmissão do impulso pré-sináptico até a contração muscular, o potencial da placa motora necessita exceder o limiar para deflagrar o potencial de ação da fibra muscular. O potencial de ação muscular é do tipo tudo ou nada, dessa forma, o potencial da placa motora necessita gerar uma despolarização suficiente para deflagrar o potencial de ação muscular ou ele não ocorrerá. A razão entre a amplitude do potencial da placa motora alcançado com a abertura dos canais dos receptores de Ach e o limiar de despolarização requerido para ter início o potencial de ação muscular é determinado de fator de segurança da JNM (Magleby, 1994).

O fator de segurança da transmissão da JNM é relativamente grande, o que previne falhas na transmissão neuromuscular durante contrações voluntárias máximas e sustentadas, uma vez que a quantidade de Ach liberada na JNM decresce depois de cada pulso nervoso, nessas condições. A larga margem de erro é dada pelo fato de serem lançadas mais moléculas de Ach do que o necessário e por existirem mais receptores de Ach na placa motora que a quantidade necessária para deflagrar o limiar de despolarização das fibras musculares (Koeppen & Stanton, 2009).

## **1.2 – Neurotoxinas que atuam na JNM**

Desde os primeiros trabalhos realizados com a peçonha de aranhas caranguejeiras (grupo Mygalomorphae) da América do Sul por Houssay & Negrete (1919) é relatada a capacidade da peçonha de bloquear a JNM. Apesar dos estudos iniciais com a peçonha de Theraphosidae datarem o início do século XX e mostrarem o bloqueio da JNM, somente na última década do mesmo século é que a primeira toxina de Theraphosidae que atua sobre a JNM foi descrita por Lampe e colaboradores (1993).

Trata-se da  $\omega$ -Grammotoxina SAI, isolada da peçonha de *Grammostola spatulata*, um peptídeo com 4109,7 Da, 36 resíduos de aminoácidos, três pontes dissulfeto e N-terminal amidado que atua diretamente sobre canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependente dos tipos N e P bloqueando suas correntes, em neurônios pré-sinápticos de vertebrados.

No mesmo ano foi isolada e caracterizada a huwentoxina-I da peçonha da aranha caranguejeira chinesa *Selencosmia huwena*, que atua inibindo canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo N pré-sinápticos, capaz de bloquear a JNM (Liang *et al.*, 1993b; Zhou *et al.*, 1997). Depois dessa descoberta mais três huwentoxinas II, VII e X foram descobertas e mostraram-se capaz de bloquear a JNM (Liang, 2004).

Em estudos do início do século XXI com a peçonha de *Theraphosa blondii*, Fontana e colaboradores (2002) demonstraram que ao aplicar a peçonha em camundongos,  $\text{LD}_{50}$  de 1.6-2.1 mg/kg, ocorre paralisia flácida seguida por morte através de parada respiratória. Aprofundando os estudos, em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, 7,5  $\mu\text{g}$  de peçonha por mL de solução de banho promovem o bloqueio da JNM em  $30 \pm 2.5$  min. Tal bloqueio é fracamente antagonizado por neostigmina (9 mM), quase totalmente reversível após lavagem e não altera a força de contração quando aplicado após curarização da preparação com d-tubocurarina. A peçonha não altera o potencial de membrana do músculo, mas reduz e abole os MEPPs após  $30 \pm 5$  min. em concentrações de 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O efeito é parcialmente revertido por neostigmina (9 mM) e não é antagonizado por 4-aminopiridina. Dessa maneira, os autores sugerem a presença de toxinas com efeito similar ao curare, que atuam sobre os receptores nicotínicos de Ach, e toxinas que atuam em canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes similares a  $\omega$ -Grammotoxina SAI.



A peçonha da aranha caranguejeira *Vitalius dubius* também apresenta ação bloqueadora da JNM em preparação de nervo frênico-diafragma de camundongo na concentração de 80 µg/mL de banho e na preparação de músculo *biventer-cervicis* de pintainho na concentração de 25 µg/mL de banho (Rocha e Silva, 2008).

As toxinas que atuam na JNM podem ser divididas em três grupos de acordo com a nomenclatura proposta para toxinas peptídicas de *Conus* por Gray & Oliveira (1988):

(1) µ-toxinas, que atuam nos canais para Na<sup>+</sup> voltagem dependentes do elemento pré-sináptico ou pós-sináptico impedindo a chegada do impulso nervoso aos botões sinápticos ou impedindo a deflagração do potencial de ação muscular;

(2) ω-toxinas, que atuam nos canais para Ca<sup>2+</sup> voltagem dependentes do elemento pré-sináptico impedindo a liberação das vesículas de Ach na fenda sináptica;

(3) α-toxinas, que atuam no receptor nicotínico de Ach se ligando aos receptores promovendo sua ativação ou inibindo-os;

Outro grupo de toxinas que podem atuar sobre a JNM são as toxinas que inibem a atividade da AChE, aumentando a meia vida de Ach, que passa a se acumular na fenda sináptica, provocando fasciculações e contrações prolongadas da musculatura esquelética. Essas toxinas são encontradas na peçonha de serpentes da família Elapidae, como a fasciculina com 61 resíduos de aminoácidos isolada da peçonha da mamba verde *Dendroaspis angusticeps* (Karlsson *et al.*, 1984; Cervefiansky *et al.*, 1991; Cervehansky *et al.*, 1994). Toxinas não peptídicas como a anatoxina-a(S), provinda de cianobactérias, pertencentes ao grupo dos organofosforados também inibem fortemente a atividade da AChE (Mahmood & Carmichael, 1987).

Existem outras substâncias não peptídicas capazes de atuar na JNM e bloqueá-la. A primeira toxina identificada capaz de bloquear a JNM foi o alcalóide d-tubocurarina isolado da trepadeira *Chondrodendron tomentosum*, que era amplamente usada por índios da América do Sul para envenenar pontas de flecha para caça e guerra. Essa substância ficou conhecida como curare e tem ação sobre os receptores nicotínicos de Ach da JNM, atuando como antagonista da Ach. A d-tubocurarina foi e ainda é amplamente utilizada como fármaco para promover o relaxamento muscular (Bisset, 1992).

Existem outros grupos de substâncias capazes de bloquear a JNM. Dentre esses grupos encontramos os ésteres de colina, que apresentam algumas substâncias que promovem o bloqueio despolarizante da JNM. Essas substâncias foram inicialmente caracterizadas farmacologicamente pela identificação da murexina, substância presente na parte medial da glândula hipobranquial de moluscos da superfamília Muricoidea (Erspamer, 1948), e posteriormente caracterizada quimicamente por Erspamer & Benatti (1953) como sendo urocanilcolina ou  $\beta$ [imidazolil-4(5)acrilcolina]. A descoberta da murexina foi seguida da identificação de mais quatro outros potentes ésteres de colina, senecioilcolina (Whittaker, 1957), acrilcolina (Whittaker, 1958), dihidromurexina (Roseghini, 1971) e tigloilcolina (Shiomi *et al.*, 1998), com a mesma ação farmacológica.

## 2 – Justificativa

Os componentes bioativos de uma peçonha podem interagir em diversos alvos farmacológicos, e assume-se que, de maneira sinérgica, todos os seus componentes têm um papel importante no processo de captura da presa ou possível predador. Todavia, a busca constante de novos compostos ativos para indústria farmacêutica de patentes ofusca a outra face, não menos importante, desses constituintes, o seu caráter ecológico, uma co-evolução/seleção de milhões de anos entre predador-presa.

Desde o início do século XX a peçonha de diversos aracnídeos tem sido extensamente estudadas, para um melhor esclarecimento do quadro clínico de envenenamento com humanos (Houssay & Negrete, 1919; Brasil & Vellard, 1926).

A pesquisa de neurotoxinas em aranhas tem se estendido para o grupo Labdognatha, por conta de sua conhecida ação inseticida ou interesse médico. (Rash & Hodson, 2002; Vassilevski *et al.*, 2009). Mesmo sabendo que a peçonha de aranhas é reconhecida como uma fonte rica de novos compostos bioativos, o conhecimento da peçonha de Theraphasidae ainda é pobre, principalmente das espécies brasileiras.

Na literatura Toxinológica, tipicamente, as moléculas de alta massa molecular como os peptídeos são o ponto focal para muitos dos estudos de caracterização química e farmacológica. No entanto, a presença de compostos de baixo peso molecular, como alcalóides, amins biogênicas, nucleotídeos, ésteres, pois contribuem significativamente para a toxicidade total da peçonha.

### **3 – Objetivos**

#### **3.1 – Objetivos Gerais**

Caracterizar o efeito da peçonha bruta de *Lasiadora* sp. sobre preparação de músculo reto abdominal de rã.

#### **3.2 – Objetivos Específicos**

Caracterizar farmacologicamente a peçonha e o(s) composto(s) ativo(s) não peptídicos presentes na peçonha com atividade em receptores nicotínicos.

Caracterizar quimicamente o(s) composto(s) ativo(s) não peptídicos presentes na peçonha com atividade em receptores nicotínicos por espectrometria de massa e baseado na reação de coloração após fracionamento por cromatografia em camada delgada.

## 4 – Material e métodos

### 4.1 – Animais

Foram utilizadas aranhas caranguejeiras da espécie *Lasiadora* sp., coletadas nas proximidades do município de Jaborandi, Bahia, na fazenda Jatobá sob licença do ICMBIO SISBIO nº 23404-1, acondicionadas e mantidas em cativeiro no biotério do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB). Os espécimes foram identificados com a ajuda do professor Dr. Paulo Cesar Motta, Laboratório de Aracnologia, UnB e um exemplar testemunho foi depositado na coleção de aranídeos, ligado ao Departamento de Zoologia – IB – UnB.

### 4.2 – Obtenção da peçonha

A peçonha de *Lasiadora* sp. foi obtida através de estimulação elétrica com pulsos de aproximadamente 30-50 Volts a 200 Hz com duração de 2 ms na base das quelíceras (Estrada *et al.*, 2007) e coletadas em microtubos para centrífuga. Essas amostras foram imediatamente congeladas após a extração, concentradas a vácuo e estocadas em freezer -20° C. Após concentração, o peso seco da peçonha foi mensurado utilizando-se balança de precisão modelo AUW220D (Shimadzu, Japão).

As peçonhas de *Acanthoscurria paulensis*, *Acanthoscurria* sp1., *Acanthoscurria* sp2., *Avicularia* sp., *Grammostola* sp., *Guyruita cerrado*, *Hapalopus* sp., *Nhandu coloratovillosus*, *Vitalius* sp., *Actinopus* sp., *Ancylometes* sp., *Phoneutria eickstedtae* e *Phoneutria nigriventer* foram obtidas do banco de peçonhas do Laboratório de Toxinologia, UnB.

### **4.3 – Fracionamento por filtração em centrífuga**

Alíquotas com 2 mg de peçonha bruta de *Lasiadora* sp. foram reconstituídas em 400µL de água deionizada e fracionas em componentes de baixo peso molecular, com menos de 3 kDa, e componentes de alto peso molecular, com mais de 3 kDa. O fracionamento se deu com a utilização de filtros para centrifuga Amicon® Ultra-2 Ultracel-3 (Millipore) com membrana de exclusão de 3 kDa através de centrifugação refrigerada a 4° C e 10000 g por uma hora. O filtrado foi recolhido e o retido ressuspenso em mais 400µL de água deionizada e filtrado novamente. Esse processo foi repetido mais duas vezes. Após a separação, o material foi concentrado a vácuo e estocado a -20° C.

### **4.4 – Fracionamento por cromatografia de camada delgada (*Thin Layer Chromatography* – TLC)**

As amostras foram reconstituídas em água com 50% de acetona (v/v) e aplicadas em diferentes concentrações com volume final de 1 µL em placas de cromatografia de camada delgada de celulose em suporte de alumínio com 100 µm de espessura (Fluka) 95413-25EA ou de sílica em suporte de poliéster com partícula de 5-25 µm, 250 µm de espessura com indicador de fluorescência 254 nm (Sigma).

As corridas cromatográficas foram desenvolvidas em cuba de vidro, cujas laterais foram forradas com papel filtro previamente embebido pela fase móvel pelo tempo necessário para que a frente de solvente atingisse 15 cm de altura ( $R_s$ ). Como fase móvel foi utilizado a mistura: butanol-ác. acético-água (5:1:2).

Os reagentes utilizados para revelar as placas de TLC foram: (1) solução aquosa de ácido sulfanílico diazotado neutralizado com solução aquosa de 10% de carbonato de sódio (v/p) (Reagente de Pauly), para compostos imidazólicos (Smith, 1960); (2) solução aquosa de 50% de acetona com 0,2% de dipicrilamina (v/v/p), para ésteres de colina (Malioth & Stein, 1951). Os resultados das manchas foram avaliados pelo  $R_f$ , que é a divisão entre a migração da substância e a frente de solvente.

#### **4.5 – Fracionamento por cromatografia líquida em coluna aberta de baixa pressão**

A peçonha bruta foi submetida a processo de purificação em coluna aberta de baixa pressão de 150 mm x 50 mm, acoplada a bomba peristáltica, com fase estacionária de troca catiônica fraca Amberlite CG50 (Sigma) previamente lavada com 50 mL de água, condicionada com 30 mL de tampão fosfato de sódio monobásico 100 mM pH 4,5. A cromatografia de 10 mg de filtrado de peçonha bruta (<3 kDa) foi realizada com fluxo de 22 mL/hora e as frações foram eluídas com 25 mL de fase móvel de tampão fosfato, seguido por 15 mL de solução de HCl 0,1 N, seguindo protocolo proposto por Keyl e colaboradores (1957). As frações foram coletadas automaticamente em tubos com volume final de 5 mL e testadas em preparação de músculo reto abdominal de rã.

#### **4.6 – Preparação de músculo reto abdominal de rã**

O músculo reto abdominal de rã (*L. catesbeianus*) foi isolado, após eutanásia por espinhalamento do animal, e tensionado com 10 g de força por 30 minutos em câmara de banho de 5 mL de contendo solução de Ringer (NaCl: 111 mM; KCl: 1,9 mM; CaCl<sub>2</sub>: 1,1 mM; NaHCO<sub>3</sub>: 2,4 mM e Glicose: 10 mM), constantemente aerada. Após

esse período de estabilização, a tensão foi reduzida para 2 g de força para serem testadas a peçonha e frações de interesse, sempre em volume final de 50 µL. O registro das contrações foi obtido através de transdutor isométrico (F60) acoplado a sistema de registro polígrafo (NARCO Bio Systems).

O protocolo utilizado para o teste das amostras tem início com a aplicação de 10µg de Ach seguido por lavagem com 4 a 5 vezes o volume do banho. Espera-se 10 min para relaxamento da preparação e aplica-se a amostra a ser testada. Após registro, lava-se novamente a preparação, aguarda-se 10 min e aplica-se novamente 10 µg de Ach. Quando necessário, foi utilizado o antagonista nicotínico brometo de rocurônio. Para construção da curva dose-resposta para Ach foram utilizadas cinco concentrações distintas aplicadas em triplicata.

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética de uso animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB) sob processo nº 127103/2011.

#### **4.7 – Teste de degradação de ésteres de colina**

##### **4.7.1 – Degradação química**

Peçonha bruta 500 µg, acetilcolina 10 µg e solução Ringer, todos em volume de 50 µL, foram incubados com mais 100 µL de hidróxido de sódio 0,2 N, durante duas horas a 60° C em bloco térmico (PTC-200, MJ Research), adaptado de Roseghini e colaboradores (1996). Antes dos produtos de degradação serem testados em preparação de músculo reto abdominal, o hidróxido de sódio foi neutralizado, pH 7, com 200 µL de ácido clorídrico 0,1 N. As degradações foram realizadas em triplicata.



#### **4.7.2 – Degradação biológica**

Peçonha bruta 500 µg e acetilcolina 10 µg foram ressuspensos em 50 µL de tampão fosfato de sódio dibásico (100 mM, pH 7,5) e foram incubados com 100 µL de soro humano por duas horas a 37° C em bloco térmico (PTC-200, MJ Research). Como controle negativo foi incubado 50 µL de tampão fosfato com soro. Os produtos da degradação, realizadas em triplicata, foram testados em preparação de músculo reto abdominal de rã.

#### **4.8 – Ajustes e análises estatísticas**

O ajuste das curvas dose-resposta em preparação de músculo reto abdominal de rã foi feito segundo equação de Hill. As análises de variância (ANOVA) e teste T (Tukey) foram realizadas para todas as variáveis com distribuição normal e o resultado apresentado como média ± EMP. Para todas as análises foi adotado índice de significância  $p < 0,05$ . As análises e os ajustes foram realizados no programa Origin Pro 8.

#### **4.9 – Espectrometria de Massa**

##### **4.9.1 – Sistema MALDI-TOF/TOF**

Para a determinação das massas moleculares dos compostos presentes na peçonha bruta e frações de interesse foi utilizado espectrometria de massa em sistema MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha). Para as análises das amostras foram utilizadas como matriz uma solução saturada de ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi-cinâmico (HCCA) dissolvido em acetonitrila/água/3% ácido trifluoroacético

(2,5/2/0,5) e ácido sinapínico dissolvido em acetonitrila/água/3% ácido trifluoroacético (2,5/2/0,5). As análises foram realizadas após calibração com ions  $[M+H]^+$  angioensina I, angiotensina II, substância P, bombesina, cadeia B insulina e hormônio adrenocorticotropico. As análises foram realizadas operando-se em modo refletido positivo ou linear positivo com energia de laser variável e 150 tiros por poço. Para análise de componentes de baixa massa era adquirido o espectro da matriz a ser utilizada sem nenhuma amostra e depois comparados aos espectros para identificação das massas de interesse que não coincidiam com massas de matriz.

#### **4.9.2 – Sistema ESI-MS/MS**

A análise dos componentes de interesse da peçonha foi realizada por injeção direta através de microseringa acoplada a bomba de injeção com fluxo de 10  $\mu$ L por min ligada a espectrômetro de massas triplo quadrupolo (4000QTRAP, Applied Biosystem/MDS Sciex, Foster City, EUA) com fonte TurboIonSpray (DDP do cone: 80 V; Temperatura do cone: 750 °C; Voltagem do spray: 3500 V), onde as moléculas de interesse eram filtradas no primeiro quadrupolo e fragmentadas por CAD no terceiro quadrupolo. As análises foram adquiridas no software Analyst<sup>®</sup> V 1.5.2.

## 5 – Resultados

### 5.1 – Efeito da peçonha e frações no músculo reto-abdominal

A dose de 500  $\mu\text{g}$  de peçonha bruta de *Lasiadora* sp. induziu contração muscular em preparação de músculo reto abdominal de rã. Com a aplicação subsequente de 14 mM de Ach, observa-se uma diminuição da resposta em relação ao controle causada pela aplicação da mesma concentração de Ach (Figura 1A), sugerindo um possível bloqueio do sítio de ligação da Ach no receptor nicotínico. Efeito similar é observado ao aplicar uma dose de 200  $\mu\text{g}$  de material filtrado com massa  $<3$  kDa (Figura 1B), indicando uma possível potencialização do efeito.

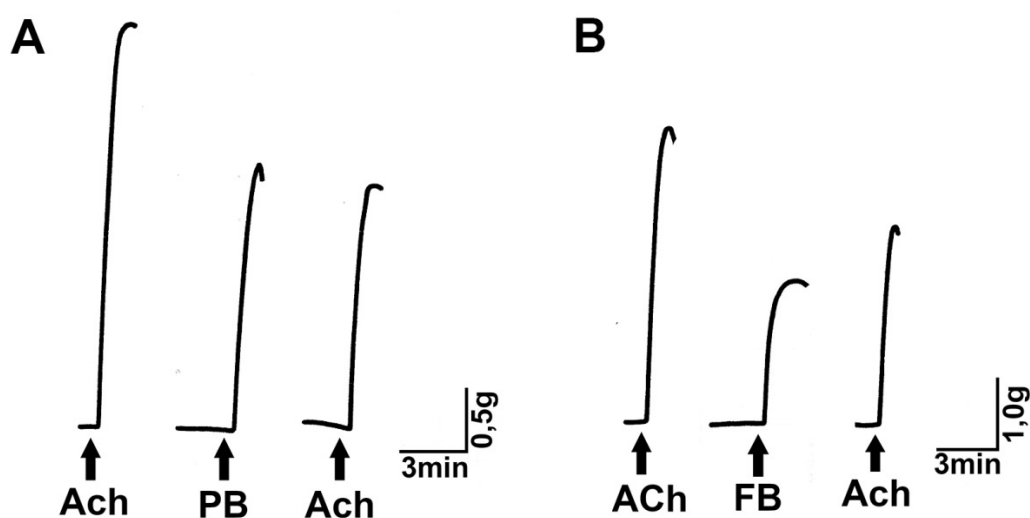


Figura 1: Contrações de músculo reto abdominal de rã. (A) 500  $\mu\text{g}$  de peçonha bruta (PB) de *Lasiadora* sp. (B) 200  $\mu\text{g}$  da fração de baixo peso molecular (FB)  $<3$  kDa. Controle com 14  $\mu\text{M}$  de acetilcolina (ACh).

O efeito de contração muscular em preparação de músculo reto abdominal de rã causado pela aplicação de 500  $\mu\text{g}$  de peçonha bruta e pela aplicação de 200  $\mu\text{g}$  da fração filtrada,  $<3$  kDa, da peçonha são completamente inibidos pela prévia aplicação da

concentração final de 13 mM de brometo de rocurônio, um antagonista nicotínico. Com o desaparecimento do efeito contrátil através de tratamento prévio com um antagonista de receptores nicotínicos, sugere-se a ação de moléculas presentes na peçonha sobre os receptores nicotínicos (Figura 2).

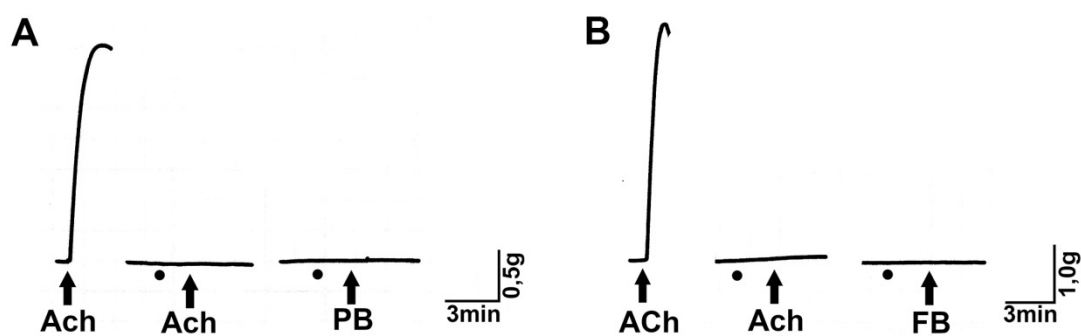


Figura 2: Contrações de preparação de músculo reto abdominal de rã. (A) Aplicação de 500 μg de peçonha bruta de *Lasiadora* sp. após a aplicação de 13 mM de brometo de rocurônio (●). (B) Aplicação de 200 μg fração de baixo peso molecular (FB) <3 kDa após a aplicação de 13 mM de brometo de rocurônio (●). Controle com 14 μM de acetilcolina (ACh).

Somente a presença de acetilcolina na peçonha explica o efeito contrátil, todavia não explica a diminuição desse efeito na aplicação subsequente de Acetilcolina padrão (Vide figura 1). Para verificação da presença de outro composto responsável pelo efeito de contração foi construído uma curva de dose-resposta com acetilcolina padrão na preparação de músculo reto abdominal de rã, e consequente quantificação da peçonha. (Figura 3). 500 μg de peçonha bruta apresentou resposta equivalente a 5,51 μg de ACh, o que corresponderia à presença de  $11,02 \pm 1,04$  μg de ACh por miligrama de peçonha bruta.

A quantificação total de moléculas com ação em receptores nicotínicos é estatisticamente diferente da encontrada através de quantificação analítica por LC-MS/MS para ACh (vide capítulo 1, seção resultados item 5.3) de  $8,75 \pm 0,45$  μg/mg

(ANOVA e teste-t,  $p > 0,05$ ), O resultado encontrado pela quantificação fisiológica em musculatura esquelética é aproximadamente 26% maior que a concentração de Ach na peçonha, indicando a existência de outro composto com atividade sobre os receptores nicotínicos.

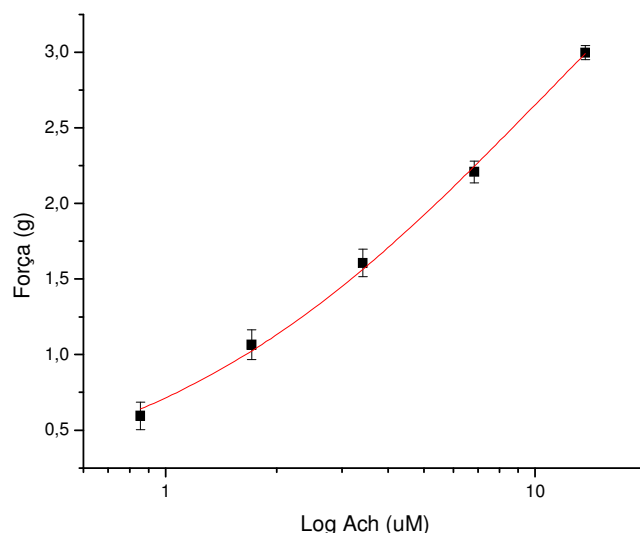


Figura 3: Curva dose resposta de Ach em preparação de músculo reto abdominal de rã (n=3). Ajuste feito pela equação de Hill ( $y = V_{max} * x^n / [K^n + x^n]$ ) com  $V_{max} = 5,43 \pm 0,21$ ,  $K = 10,60 \pm 1,04$  e  $n = 0,8$ .  $R^2 = 0,998$ .

## 5.2 – Cromatografia de camada delgada (TLC)

A possível presença de ésteres de colina na peçonha bruta, além da presença de Ach, foi avaliada em um cromatograma em placa de celulose revelado com dipicrilamina. Nele foram aplicadas 100 µg de peçonha juntamente com padrões de Ach 20, 10 e 5 µg e colina (Ch) 20 µg (Figura 4). Na peçonha bruta de *Lasiodora* sp. foram detectadas a presença de duas substâncias bem distintas: a primeira com aparência de duas manchas e uma sombra com  $R_f$  de 0-0,33 e a segunda com  $R_f$  de 0,62-0,65, ambas de cor rosa.



Figura 4: Cromatogramas de camada delgada em placa de celulose. Ach: acetilcolina; PB: 100  $\mu$ g de peçonha bruta de *Lasiodora* sp.; Ch: colina, FB: 70  $\mu$ g da fração de baixo peso molecular <3 kDa. (A) Placa revelada com dipicrilamina. (B) Placa revelada com dipicrilamina em preto e branco. CD1  $R_f$  de 0,33; CD2  $R_f$  de 0,62-0,65.

A Ach padrão apresentou  $R_f$  de 0,47-0,52 e a Ch  $R_f$  de 0,38-0,44, ambas de cor rosa. Apesar da presença confirmada de Ach e Ch na peçonha de *Lasiodora* sp., não foi possível sua detecção nesta técnica, pois não foi possível detectar concentrações menores que 1  $\mu$ g das duas substâncias.

Considerando que a concentração encontrada de Ach e Ch em 100  $\mu$ g de peçonha é aproximadamente de 0,87  $\mu$ g e 0,39  $\mu$ g respectivamente (vide capítulo 1, seção resultados item 5.5), a coloração de revelação não é sensível para essas concentrações. Como evidenciado na figura 4, 5  $\mu$ g de Ach e 20  $\mu$ g de Ch se apresentam como manchas, com baixa resolução.

Foi analisada também a presença de substâncias contendo núcleos imidazólicos através de revelação com reagente de Pauly. Em placa de celulose 100 µg da peçonha bruta apresentaram quatro diferentes substâncias como possuindo núcleos imidazólicos de acordo com os  $R_f$  e coloração:  $R_f$  de 0-0,32 aparentando duas manchas ligadas de cor laranja clara,  $R_f$  0,34-0,44 de cor laranja escuro,  $R_f$  0,60-0,62 de cor laranja e  $R_f$  0,63-0,66 de cor amarela.

As mesmas substâncias são encontradas em 70 µg de material filtrado da peçonha, <3 kDa (Figura 5), indicando que as substâncias encontradas tratam-se de moléculas de baixo peso molecular. Comparando os resultados de coloração específica para ésteres de colina e de núcleos imidazólicos, detecta-se a presença ésteres de colina com grupos imidazólicos na peçonha no  $R_f$  0-0,32 e no  $R_f$  0,62-0,65 (Tabela 1).

Tanto a peçonha bruta (100 µg) como o filtrado (70 µg) foram aplicados em placa de sílica para verificar a sua separação neste adsorvente e para comparação com dados da literatura. Neste tipo de adsorvente foram identificadas três manchas em revelação com reagente de Pauly tanto na peçonha bruta como no fração filtrada, <3 kDa, com diferentes cores e deslocamentos:  $R_f$  0-0,06 amarelo,  $R_f$  0,15-0,24 laranja claro e  $R_f$  0,50-0,52 uma mistura de duas cores amarelo e laranja evidenciando a junção de duas substâncias (Figura 6).

Tabela 1:  $R_f$  e coloração das manchas encontradas nos cromatogramas em celulose revelados com dipicrilamina e reagente de Pauly, fase móvel butanol-ác acético-água, 5:1:2.

Composto	Dipicrilamina		Pauly	
	RF	cor	Rf	cor
CD1/CP1	0-0,33	Rosa	0-0,32	Laranja claro
CP2	-	-	0,34-0,44	Laranja escuro
CP3	-	-	0,60-0,62	Laranja
CP4/CD2	0,62-0,65	Rosa	0,63-0,65	Amarelo
Ach	0,47-0,52	Rosa	-	-
Ch	0,38-0,44	Rosa	-	-

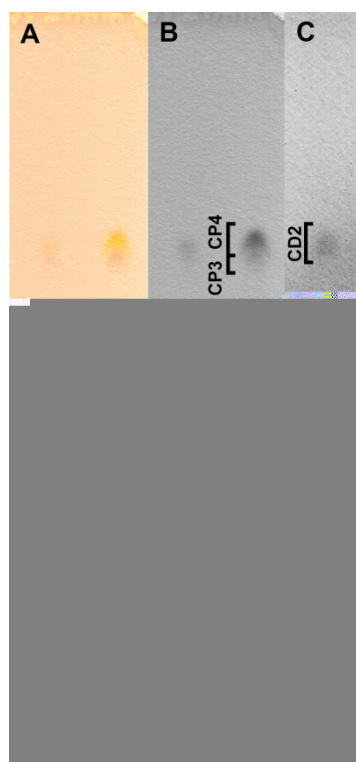


Figura 5: Cromatogramas de camada delgada em placa de celulose. PB: 100  $\mu$ g de peçonha bruta de *Lasiadora* sp.; FB: 70  $\mu$ g da fração de baixo peso molecular <3 kDa. (A) Placa revelada com reagente de Pauly. (B) Placa revelada com reagente de Pauly em preto e branco. CP1  $R_f$  de 0-0,32; CP2  $R_f$  de 0,34-0,44; CP3  $R_f$  de 0,60-0,62; CP4  $R_f$  de 0,63-0,65. (C) Placa revelada com dipicrilamina em preto e branco. CD1  $R_f$  de 0-0,33; CD2  $R_f$  de 0,62-0,65.

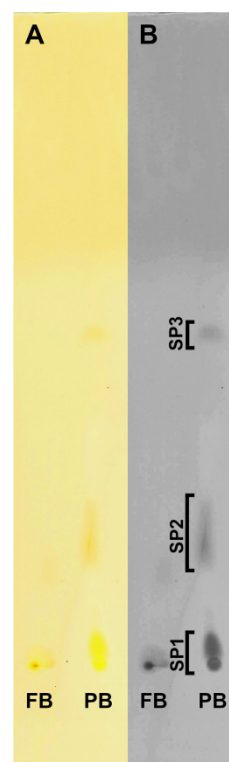


Figura 6: Cromatogramas de camada delgada em placa de sílica. PB: 100  $\mu$ g de peçonha bruta de *Lasiadora* sp.; FB: 70  $\mu$ g da fração de baixo peso molecular <3 kDa. (A) Placa revelada com reagente de Pauly. (B) Placa revelada com reagente de Pauly em preto e branco. SP1  $R_f$  de 0-0,06; SP2  $R_f$  de 0,15-0,24; SP3  $R_f$  de 0,50-0,52.



### 5.3 – Cromatografia líquida em coluna aberta de baixa pressão

Para purificação de ésteres de colina com núcleo imidazólico foi empregada técnica de cromatografia líquida em coluna aberta de baixa pressão confeccionada com fase estacionária catiônica fraca, segundo protocolo proposto por Keyl e colaboradores (1957). Nas frações eluídas com tampão fosfato, quando testadas em preparação de músculo reto abdominal de rã, houve eluição de uma substância capaz de promover contração do músculo sem alterar a resposta da preparação para Ach nas frações coletadas entre 5-10 e 10-15 mL de fase móvel (F1 e F2). Nas outras frações eluídas não foi detectado nenhum efeito sobre a preparação (Figura 7A).

Já as frações eluídas com ácido clorídrico 0,1 N (neutralizadas com NaOH, pH 7,0) foram aplicadas na preparação de músculo reto abdominal de rã. Das duas frações coletadas, a fração eluída de 0 a 10 mL de fase móvel (H1) reduziu a resposta da preparação a aplicação de Ach (Figura 7B), todavia sem apresentar efeito contrátil. Aumentando a concentração da aplicação da fração H1 de 200 µL para 1 mL no banho da preparação, observa-se um efeito contrátil seguido por diminuição da ação da Ach (Figura 7C).

A fração H1, após ser liofilizada e pesada, também foi testada em diferentes concentrações em preparação de músculo reto abdominal. Ela apresentou efeito de redução da ação da Ach de maneira dose-dependente e foi observado que em nenhuma das concentrações aplicadas houve efeito contrátil (Figura 8).

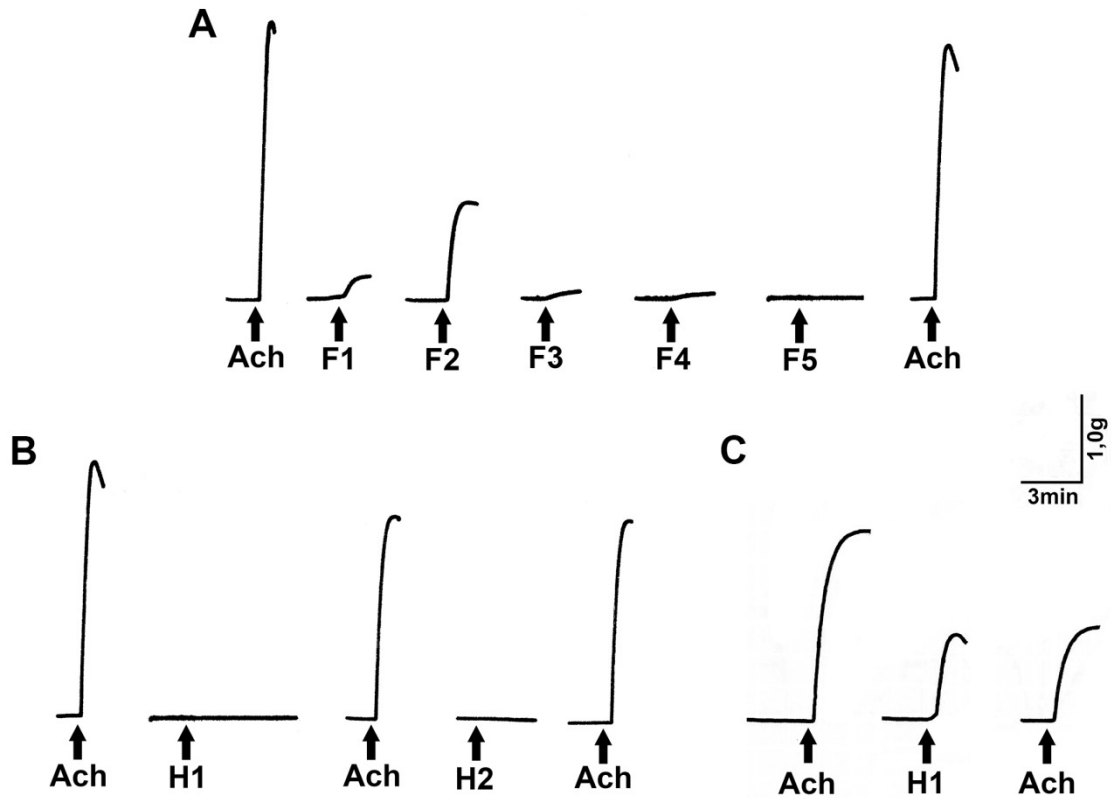


Figura 7: Contrações de músculo reto abdominal de rã. (A) Aplicação de 200 uL das frações eluídas com tampão fosfato de sódio F1:0-5 mL, F2: 5-10 mL, F3:10-15 mL, F4: 15-20 mL e F5: 20-25 mL. (B) Aplicação de 200 uL das frações eluídas com 0,1 N de HCl H1: 0-10 mL e H2: 10-15 mL. (C) Aplicação de 1 mL de fração eluída com 0,1 N HCl (FHCl). Controle com 14  $\mu$ M de acetilcolina (ACh).



Figura 8: Contrações de preparação de músculo reto abdominal de rã. (A) Aplicação de diferentes concentrações (mg) de material eluído com 0,1 N HCl seguido pela aplicação de 14  $\mu$ M de acetilcolina (\*) sem lavagem.

A fração H1 da cromatografia líquida que apresentou atividade de diminuição da ação da Ach em preparação de músculo reto abdominal de rã, que foi eluída entre 0-10 mL de HCl, foi seca e 50 e 100 µg deste material diluídos em 1 e 2 µL foram submetido a TLC revelado com reagente de Pauly. No cromatograma obtido, ao comparar a peçonha bruta com a fração H1 nota-se o desaparecimento das frações com  $R_f$  maior que 0,5 e a presença das substâncias com  $R_f$  de 0-0,32 que aparentam duas manchas ligadas de cor laranja clara e  $R_f$  0,34-0,44 de cor laranja escuro (Figura 9).

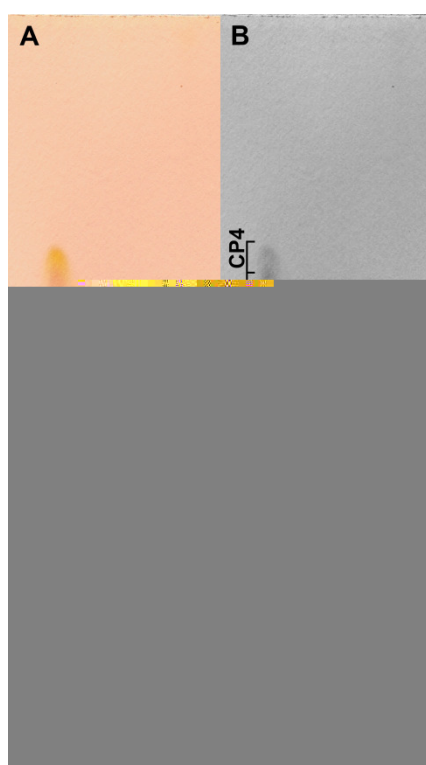


Figura 9: Cromatograma de camada delgada em placa de celulose revelada com reagente de Pauly. PB: 100 µg de peçonha bruta de *Lasiadora* sp. (A) Diferentes concentrações da fração eluída com 0,1 N de HCl. (B) Diferentes concentrações da fração eluída com 0,1 N de HCl em preto e branco. CP1  $R_f$  de 0-0,32; CP2  $R_f$  de 0,34-0,44; CP3  $R_f$  de 0,60-0,62; CP4  $R_f$  de 0,63-0,65; HCl1  $R_f$  de 0-0,33; HCl2  $R_f$  de 0,35-0,46.

## 5.4 – Testes de degradação

Para determinar se o efeito de contração seguido por diminuição da ação da Ach encontrado na peçonha bruta é produzido por um éster de colina, foram realizados testes de degradação química de ésteres de colina e de degradação biológica com soro humano. Ésteres de colina são rapidamente degradados em condições alcalinas, dessa forma, 500 µg de peçonha bruta e de 10,0 µg de Ach foram incubados com NaOH. Antes de serem testados, os produtos de degradação química foram neutralizados com HCl, pH 7,0. Os ensaios farmacológicos em preparação de músculo reto abdominal de rã dessas amostras mostraram não haver ação de contração ou de diminuição da ação da Ach, indicando degradação dos compostos (Figura 10A).

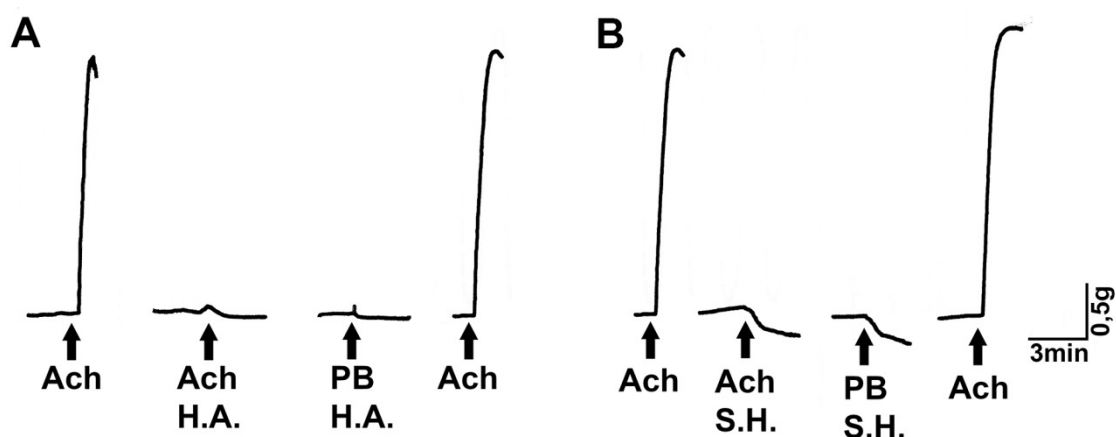


Figura 10: Contrações de preparação de músculo reto abdominal de rã. Ach: 14 µM de acetilcolina. (A) Aplicação de 10 µg de Ach tratada com 0,2 N de NaOH (Ach H.A.) e de 500 µg de peçonha bruta de *Lasiadora* sp. (PB H.A.) tratada da mesma forma. (B) Aplicação de 10 µg de Ach tratada com 100 µL de soro humano (Ach S.H.) e de 500 µg de peçonha bruta de *Lasiadora* sp. (PB S.H.) tratada da mesma forma.

O segundo teste de degradação realizado foi o de degradação biológica para ésteres de colina, através de ação enzimática de acetilcolinesterases inespecíficas presentes no soro humano, que se mostram capazes de degradar ambas as moléculas

(Grelis & Tabachnick, 1957). Nos ensaios de preparação de músculo reto abdominal os produtos de degradação biológica de 500 µg de peçonha bruta e de 10,0 µg de Ach não apresentaram efeito despolarizante ou de diminuição da ação da Ach (Figura 10B). Concluimos que composto responsável por estas ações foi degradado.

### 5.5 – Presença de compostos similares em outras peçonhas

A figura 11 mostra o perfil cromatográfico em TLC, em placa de celulose, fase movel de butanol-ácido acético-água (5:1:2) e reveladas com reagente de Pauly, das peçonhas das aranhas: *Acanthoscurria paulensis*, *Acanthoscurria* sp1., *Acanthoscurria* sp2., *Avicularia* sp., *Grammostola* sp., *Guyruita cerrado*, *Hapalopus* sp., *Nhandu coloratovillosus*, *Vitalius* sp., *Actinopus* sp., *Ancylometes* sp., *Phoneutria eickstedtae* e *Phoneutria nigriventer*.

Foram identificados perfis cromatográficos semelhantes ao de *Lasiadora* sp. com intensidade de mancha similares dos compostos com R<sub>f</sub> menor que 0,5 na peçonha das aranhas Theraphosidae *Vitalius* sp., *Nhandu coloratuvillosus*, *Acanthoscurria paulensis* (♂), *Acanthoscurria* sp1, *Acanthoscurria* sp2 e *Hapalopus* sp. (♂). Todavia, a peçonha de *Grammostola* sp., *Avicularia* sp., *Guyruita cerrado* e *Actinpus* sp. apresentam perfil cromatográfico similar, porém, uma intensidade de mancha menor.

As aranhas *Ancylometes* sp., *Phoneutria nigriventer* e *Phoneutria eickstedtae*, pertencentes a família Ctenidae, apresentam perfil cromatográficos diferentes da *Lasiadora* sp. mas similares entre si, com aparentemente baixa intensidade de mancha com R<sub>f</sub> 0-0,1.



Figura 11: Cromatograma de camada delgada em placa de celulose revelada com reagente de Pauly de 100 µg de diferentes peçonhas de aranhas e 50 µg de fração de cromatografia líquida eluída com HCl. La: *Lasiadora* sp.; Gc: *Guyruita cerrado*; Gr: *Grammostola* sp.; Ac: *Actinopus* sp.; Ac: *Ancylometes* sp.; Vi: *Vitalius* sp.; Nc: *Nhandu coloratovillosus*; Ap: *Acanthoscurria paulensis* ♂; A1: *Acanthoscurria* sp1.; A2: *Acanthoscurria* sp2.; Av: *Avicularia* sp.; Ha: *Hapalopus* sp. ♂; Pn: *Phoneutria nigriventer*; Pe: *Phoneutria eickstedtae*.

Apesar de não conclusivo, este ensaio sugere a presença dos mesmos compostos de baixa massa molecular, formado por ésteres de colina com núcleo imidazólico, em outras espécies de aranhas. Como a concentração de peçonha aplicada foi de 100µg para todas as espécies, sugerimos também que a intensidade e tamanho da mancha estão diretamente relacionados com a concentração desses compostos.

## 5.6 – Análises por espectrometria de massa

A sugestão da presença de ésteres de colina com núcleos imidazólicos com ação bloqueadora de receptores nicotínicos norteou as análises de espectrometria de massa da peçonha bruta.

Em análises de peçonha bruta em sistema ESI-MS/MS foram detectados os componentes de relação massa/carga 224,2, e 139,1, sugerindo a presença de murexina (urocanilcolina), e ácido urocânico, massa calculada respectivamente (Figura 12).

Dos fragmentos observados no espectro de fragmentação dos componentes 224,2 e 139,1 m/z, o fragmento de relação massa/carga 69,0 surge como parte da fragmentação do núcleo imidazólico presente nessas moléculas (Figura 12A e B).

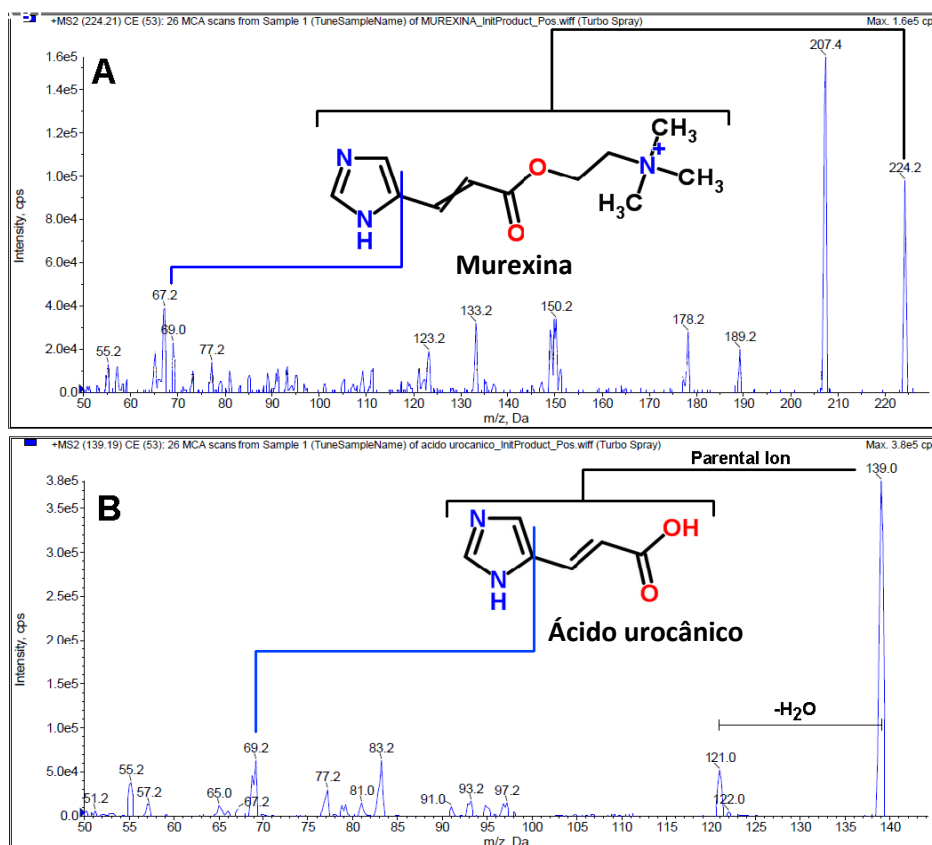


Figura 12: Espectrogramas de massa em sistema ESI-MS/MS de fragmentação em método CAD. Fragmentação do íon: (A) 224,2 m/z similar a murexina; (B) 139,0 m/z similar ao ácido urocânico. Estruturas moleculares retiradas de [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)

## 6 – Discussão

A peçonha de *Lasiadora* sp. causa contração muscular e diminuição da resposta da preparação a Ach em comparação com o controle, em preparação de músculo reto abdominal de rã, sugerindo um possível bloqueio de receptores nicotínicos. Efeitos similares são encontrados na peçonha da aranha caranguejeira *Vitalius dubius* quando aplicada em preparação de JNM com *biventer-cervicis* de pintainho (Rocha e Silva, 2008).

A peçonha bruta das aranhas *Ornithoctonus huwena* e *Theraphosa blondii* promovem bloqueio da JNM em preparação de nervo frênico-diafragma de camundongos (Liang *et al.*, 1993a; Fontana *et al.*, 2002). Para *Theraphosa blondii* foi observado que o efeito está relacionado aos receptores nicotínicos para Ach (Fontana *et al.*, 2002). Todas essas aranhas são representantes da família Theraphosidae.

Os estudos com a peçonha de aranhas caranguejeiras (Theraphosidae) não são recentes e datam do início do século XX, sempre relatando efeitos bloqueadores da JNM (Houssay & Negrete, 1919). No entanto, somente no início da década de 90 foram isolados e caracterizados peptídeos que apresentam atividade de bloqueio da JNM, a partir da peçonha de *Ornithoctonus huwena* e *Grammostola spatulata*. Esses peptídeos apresentam afinidade para alguns tipos de canais para  $Ca^{2+}$ , sendo capazes de modular suas correntes, e não foram encontrados em muitas espécies da família Theraphosidae (Lampe *et al.*, 1993a; Liang *et al.*, 1993b; Zhou *et al.*, 1997).

Os trabalhos que relatam o efeito de bloqueio da JNM são realizados somente com peçonha bruta (Houssay & Negrete, 1919, Fontana *et al.*, 2002, Rocha e Silva, 2008) ou com peptídeos isolados (Lampe *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1993; Zhou *et al.*,



1997). Vizzotto (2009) conclui que as frações correspondentes a F14, F15 e F20 (Figura 3, vide capítulo 1, seção 5.1) nas concentrações de 1 uM não tem atividade sobre os receptores nicotínicos de rabdossarcoma em sistema de Patch Clamp. Vizzotto (2009) também evidenciou também a não ocorrência de peptídeos na faixa de baixo peso molecular (<3KDa) da peçonha de *Lasiadora* sp. Neste trabalho, demonstramos que um composto não peptídico presente na fração de baixa massa molécula (<3KDa) da peçonha de *Lasiadora* sp. é capaz de promover efeito contrátil e diminuir a resposta de Ach em relação ao controle, em preparação de músculo reto abdominal de rã.

O tratamento prévio da preparação de músculo reto abdominal de rã com um antagonista nicotínico inibiu, por completo, o efeito contrátil. Esse resultado sugere que os componentes da peçonha causadores do efeito estavam interagindo com os receptores nicotínicos para Ach.

Segundo Roseghini e colaboradores (1996) a preparação de músculo reto abdominal de rã é excelente para a determinação de compostos que atuam sobre receptores nicotínicos para Ach, principalmente ésteres de colina. Ao comparar a quantificação por método fisiológico em preparação de músculo reto abdominal com a quantificação analítica de Ach na peçonha, observa-se que a ação da peçonha na preparação é 26% maior.

Os dados obtidos a partir das análises de TLC sugerem a presença de toxinas de baixo peso molecular pertencentes à classe dos ésteres de colina imidazólicos. Ao comparar os dados obtidos (Tabela 1) com os presentes na literatura sobre o comportamento cromatográfico em TLC, em diferentes condições, de ésteres de colina imidazólicos ou não descritos na glândula hipobrânquial de moluscos da superfamília Muricoidea, observa-se uma grande similaridade (Tabela 2).

Tabela 2:  $R_f$  e coloração de diversos compostos encontrados na glândula hipobranquial de moluscos. Cromatogramas em placas de celulose e sílica com suporte em alumínio e coradas com reagente de Pauly e reagent de Dragendorff. Retirado de Roseghini e colaboradores (1996).

Composto	Celulose		Sílica		Coloração	
	Fase móvel A	Fase móvel B	Pauly	Dragendorff		
Murexina	0,29	0,11	Amarelo/laranja	Rosa		
Dihidromurexina	0,28	0,03	Roxo avermelhado	Rosa		
Senecioilcolina	0,76	0,29	-	Amarelo		
Acetilcolina	0,54	0,14	-	Amarelo		
Colina	0,49	0,15	-	Violeta		
Ácido urocânico	0,62	0,71	Avermelhado	-		
Ácido imidazolpropionico	0,6	0,4	Roxo avermelhado	-		

Fase móvel A: Butanol-Etanol-Ác. acético-Água (8:2:1:3)

Fase móvel B: Propanol-Ác. Acético (3:1)

As colorações obtidas com o borrifamento de diferentes soluções, empregadas para revelar as placas de TLC, mostram a presença de vários compostos e possibilitaram uma caracterização química parcial de alguns componentes da peçonha. Os dados obtidos quando comparados com os dados presentes na literatura, sobre a coloração de ésteres de colina e seus derivados, também são semelhantes (Roseghini *et al.*, 1970; Blankenship *et al.*, 1975).

Para a substância CD1/CP1, em relação ao seu  $R_f$  e coloração com reagente de Pauly, ambos são similares à murexina (Roseghini *et al.*, 1970; Blankenship *et al.*, 1975; Roseghini *et al.*, 1996). Observa-se o peculiar comportamento cromatográfico do composto CD1/CP1, aparecendo como duas manchas com sombra, sendo também similar em cromatogramas em TLC de murexina, onde cada mancha é creditada às múltiplas cargas que esta molécula pode conter (Roseghini *et al.*, 1970).

Sugerimos que o composto CP3 pelas características químicas apresentadas (possuir núcleo imidazólico e não ser um éster de colina), pela coloração apresentada

com reagente de Pauly (Laranja) e comportamento de migração ( $R_f$ ), seja o ácido urocânico (Roseghini *et al.*, 1970; Blankenship *et al.*, 1975; Roseghini *et al.*, 1996).

Tomando como base o comportamento cromatográfico ( $R_f$ ), bem como a coloração apresentada após revelação com reagente de Pauly e dipicrilamida, não foi encontrada nenhuma identidade das manchas CD2/CP4 e CP2 com os compostos sugeridos na literatura consultada.

O comportamento cromatográfico em cromatografia líquida de troca iônica fraca do filtrado de peçonha bruta se revelou idêntico ao da Ach e murexina descrito por Keyl e colaboradores (1957) em sistema semelhante. Este tipo de cromatografia tem se demonstrado um método eficaz de separar ésteres de colina e outras bases orgânicas, particularmente quando as moléculas a serem separadas diferem no número de cargas positivas. Dessa forma, os cátions bivalentes tais como murexina mostram uma afinidade elevada pela fase estacionária e só podem ser eluídos em pH baixo (0,1 N de HCl), enquanto cátions univalente como a acetilcolina mostram uma afinidade intermédia pela fase estacionária e podem ser eluídos sob condições menos ácidas (100mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 4,5) (Keyl *et al.*, 1957).

A fração eluída com tampão fosfato apresentou um composto capaz de promover contração do músculo reto abdominal de rã sem alterar a resposta da ação da Ach. A resposta farmacológica e os dados da literatura para o tipo de separação realizado em coluna de troca iônica sugerem a separação da Ach presente na peçonha de outros componentes (Keyl *et al.*, 1957).

A fração eluída em HCl 0,1 N (H1) tem características farmacológicas similares às da murexina, despolarizando e bloqueando a ação da Ach em preparação de músculo reto abdominal de rã. Dessa forma, na peçonha bruta o efeito desta fração soma-se ao

efeito da Ach, o que resulta em um efeito contrátil maior que o esperado pela concentração de Ach quantificada de maneira analítica. A cromatografia em TLC da fração H1, revelada com reagente de Pauly, mostra a presença de duas manchas HCl1 ( $R_f$  0-0,33) e HCl2 ( $R_f$  0,35-0,46), que são equivalentes a CD1/CP1 ( $R_f$  0-0,32) e CP2 ( $R_f$  0,34-0,44) da peçonha bruta.

Em baixas concentrações, a fração eluída com HCl 0,1 (H1) não causa despolarização, mas já apresenta efeito de diminuição da resposta da Ach, e somente em concentrações mais elevadas a fração causou contração do músculo. Essa informação não é apresentada em nenhum trabalho com murexina ou outros ésteres de colina correlatos encontrados na literatura. Sempre coloca-se a concentração necessária para causar o efeito contrátil e somente depois comenta-se sobre uma ação bloqueadora. Porém, diversos registros de preparações de JNM não apresentam o componente contrátil que a substância estaria provocando. Eles somente mostram o efeito de bloqueio da JNM, indicando possivelmente que seriam necessárias concentrações maiores para realizar contrações detectáveis (Erspamer & Glässer, 1957; Keyl & Whittaker, 1958) como observado nas figuras 7 e 8.

A murexina e outros ésteres de colina atuam farmacologicamente da mesma maneira, somente variando sua intensidade. Eles agem bloqueando de forma intensa a junção neuromuscular de maneira despolarizante, tanto de vertebrados como de invertebrados (Erspamer & Glässer, 1957; Keyl & Whittaker, 1958), e causam estimulação igual ou superior a Ach em gânglios neurais (Kewitz, 1955), ambas as ações por interagir com receptores nicotínicos para Ach. Não são relatados efeitos sobre receptores muscarínicos para Ach (Roseghini *et al.*, 1996).

Os ensaios de degradação da substância ativa da peçonha em preparação de músculo reto abdominal de rã mostraram que ela perde o efeito de contração e de diminuição da ação da Ach quando incubada com hidróxido de sódio e com soro humano. A murexina, dihidromurexina e seneciocolina são extremamente estáveis em pHs ácidos e podem ser estocados em solução aquosa por meses sem degradação (Whittaker, 1963), porém, são facilmente hidrolisados em pHs alcalinos (Roseghini *et al.*, 1996).

A murexina, dihidromurexina e seneciocolina não são hidrolisadas por colinesterases de eritrócitos humanos e bovinos, de cérebro de coelho, de plasma de rato e cachorro (Erspamer & Dordoni, 1947; Grelis & Tabachnick, 1957; Foldes *et al.*, 1957; Keyl & Whittaker, 1958). Em contraste, as colinesterases presentes no plasma humano são capazes de degradar essas substâncias (Foldes *et al.*, 1957; Holmstedt & Whittaker, 1958). Os dados mostram que o composto ativo é degradado nas mesmas condições de degradação da murexina e substâncias correlatas.

A comparação feita entre as peçonhas de diferentes espécies de aranhas nos revela que a presença de compostos imidazólicos é bastante comum. As aranhas da família Theraphosidae, com exceção da *G. cerrado*, apresentaram o mesmo perfil cromatográfico com as substâncias CD1/CP1, CP2, CP3 e CP4/CD2, variando somente as concentrações. Em todas as espécies foi encontrado o composto CD1/CP1 relacionado à murexina, mesmo em pequenas quantidades, como pode ser observado nos pontos de aplicação.

Na peçonha das espécies da família Ctenidae o perfil cromatográfico apresenta substâncias com cores e  $R_f$ s diferentes das outras aranhas. Tal fato pode ser decorrente da presença histamina e serotonina, que é relatada na peçonha de *Phoneutria nigriventer*

e essas substâncias são coradas com o reagente de Pauly (Schenberg & Pereira-Lima, 1971).

Por espectrometria de massa foi possível visualizar a presença na peçonha bruta de moléculas com massa similar a murexina, senecioilcolina, ácido urocânico e etilurocanato. Estas foram fragmentadas e os espectros interpretados na tentativa de uma reconstrução das substâncias originais. Para os íons similares à murexina 224,2 m/z, ao ácido urocânico 139,1 m/z e ao etilurocanato 166,1 m/z foi identificado um mesmo fragmento presente nos espectros de fragmentação de relação massa/carga 69,0 que surge como parte da fragmentação do núcleo imidazólico comum a essas moléculas.

Dessa forma, o composto causador do efeito farmacológico seria similar à murexina ou a própria murexina, que não pode ser caracterizada com maior grau de confiabilidade em todas as etapas do trabalho pela falta de padrão comercial e disponibilidade de fontes biológicas que contenham o composto. O mesmo problema de identificação ocorre com o ácido urocânico.

A síntese de ésteres de colina com ácidos imidazólicos mostra-se de baixo custo energético e viável, uma vez que colina é uma substância disponível no meio intra e extracelular de diversos tecidos e é a base para a produção de diversas moléculas essenciais (Blusztajn, 1998). Roseghini e colaboradores (1970) propuseram que a murexina é produzida por uma via onde ocorre uma reação de esterificação entre colina livre e ácido urocânico. O último também pode ser transformado em etilurocanato a partir da sua esterificação com etanol e seria proveniente da degradação ou transformação do aminoácido histidina. Já a senecioilcolina seria produzida originalmente através do processo de esterificação do ácido seneciólico e colina livre.

Todas essas substâncias são encontradas na maioria das glândulas hipobranquiais de vários moluscos da super família Muricoidea.

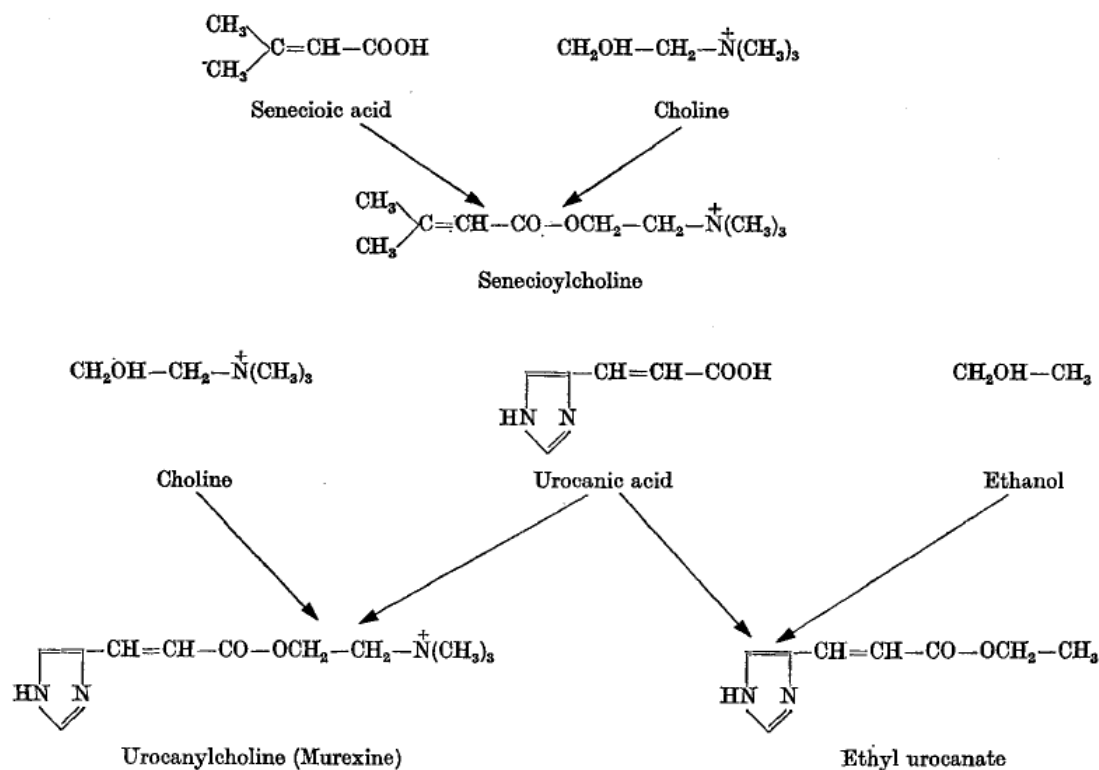


Figura 12: Esquema da via de síntese derivados de colina e outros produtos do ácido urocânico em moluscos. Retirado de Roseghini e colaboradores, 1970.

Esses ésteres são moléculas hidrofílicas que tem uma rápida dispersão quando injetados como peçonha e a uma ação farmacológica extremamente importante de paralisia esquelética seguida por morte por anóxia secundária, provocada por parada respiratória nos quadros de envenenamento das presas. Eles também se apresentam como moléculas extremamente versáteis por atuarem paralisando tanto vertebrados como invertebrados como descrito por Erspamer & Glässer (1957), possibilitando a diversidade de hábitos alimentares.

A peçonha da maioria das aranhas caranguejeiras não é letal para o homem e não apresenta casos graves de envenenamento. Já para cachorros e outros animais

domésticos, elas apresentam casos graves e letais em curto período de tempo 0,5 – 2 horas (Ibister *et al.*, 2003). A murexina apresenta diferentes índices de toxicidade dependendo da espécie em que é testada. As aves são os animais mais sensíveis, com doses letais de apenas 300 µg/kg, para pombos, seguidos de gatos e cachorros (Erspamer & Glässer, 1957).

Sendo assim, a diferença de gravidade de quadro de envenenamento e de letalidade observada nos casos com animais domésticos e humanos pode ser perfeitamente explicada pela presença de toxinas similares a murexina como constituinte da peçonha. Em humanos os casos não são graves, pois a acetilcolinesterase plasmática consegue degradar ésteres de colina similares a murexina, enquanto que em outros animais, como os cachorros, isso não ocorre (Foldes *et al.*, 1957; Keyl & Whittaker, 1958).

A diferença de toxicidade também pode explicar os hábitos alimentares de algumas espécies de aranhas da família Theraphosidae que se alimentam de aves, como descrito por diversos pesquisadores (Foelix, 2011; Sick, 1997). Para predar aves, que são animais rápidos e fortes, são necessárias toxinas extremamente potentes e rápidas para paralisar e matar a presa antes que essa possa fugir, e este papel pode ser assumido por moléculas com ação similar a murexina.

Na literatura encontram-se trabalhos que descrevem a ação de diferentes peçonhas de Mygalomorphas, e a partir dessas descrições pode-se sugerir a presença de toxinas similares a murexina, indicando uma possível ampla distribuição dessa toxina em aranhas.

Em estudos com a peçonha da aranha caranguejeira da família Dipluridae *Trecona venosa* Brasil & Vellard (1926), notaram a extrema sensibilidade de pombos ao



extrato da glândula de peçonha, onde uma única glândula é capaz de matar 200 animais. É relatada uma morte rápida com quadro inicial de contrações tetânicas e tremores pelo corpo seguidos por paralisia tetânica total, convulsões e morte por parada respiratória. O efeito da peçonha é atenuado e abolido através da incubação com hidróxido de sódio e se mantém estável com tratamento com ácido clorídrico. Essa descrição é idêntica a apresentada por Erspamer e Glässer (1957) para injeção de doses letais de murexina em pombos. Além da descrição da ação da peçonha em pombos, a descrição da ação em camundongos também é similar à descrita para a murexina.

A peçonha bruta da aranha *Theraphosa blondii* apresenta forte bloqueio da junção neuromuscular e quadro de envenenamento em doses letais farmacologicamente similares aos descritos para murexina (Fontana *et al.*, 2002). A peçonha da aranha *Ornithoctonus huwena* foi bastante estudada e apresenta uma gama de toxinas peptídicas que são capazes de promover o bloqueio da JNM em diferentes sítios, porém, a ação da peçonha bruta em camundongos além da paralisia induz fortes convulsões, e pardais são extremamente sensíveis a peçonha, podendo indicar a presença de ésteres de colina (Liang, 2004).

A peçonha da aranha caranguejeira *Vitalius dubius* induz bloqueio da JNM de camundongo e de pintainho, com maior sensibilidade para o segundo. Na preparação de JNM de ave foi constatado que a ação da peçonha é sobre receptores nicotínicos, indicando que o bloqueio pode ser causado por substâncias similares a murexina (Rocha e Silva, 2008).

Em aranhas da ordem Araneidae foi reportado que a peçonha de *Argiope lobata* tem a capacidade de bloquear a JNM de rã de maneira reversível atuando em receptores pós sinápticos (Usmanov *et al.*, 1983). A peçonha de outras sete espécies de aranhas

*Agalenatea redii*, *Mangora acalypha*, *Neoscona adianta*, *Neoscona cruciferoides*, *Nuctenea folium*, *Zygiella caspica* e *Araneus diadematus* tem a capacidade de inibir os potenciais em miniatura espontâneos e potenciais elétricos da placa motora em preparação músculo-nervo de rã de maneira reversível atuando sobre os receptores nicotínicos para Ach (Usmanov *et al.*, 1985). Em nenhum dos trabalhos foi reportado o isolamento ou caracterização da fração que provoca os efeitos farmacológicos, porém, o modo de ação é característico de ésteres de colina.

Murexina, senecioilcolina e substâncias similares são toxinas encontradas exclusivamente em moluscos aquáticos, não sendo reportada sua presença em outros filos marinhos nem em animais terrestres (Rosenghini *et al.*, 1996).

Assim, registramos pela primeira vez a presença dessa classe de moléculas no filo Arthropoda e em animais terrestres, sendo utilizada como peçonha. Esta descoberta abre novos campos para estudos toxinológicos principalmente com moléculas não peptídicas e de evolução de compostos utilizados como toxina.

## 7 – Conclusão

- A peçonha bruta de *Lasiadora* sp. tem efeito contrátil e de inibição da resposta de Ach, em relação ao controle, em preparação de músculo reto abdominal de rã.
- Foi identificada a presença de ésteres de colina com núcleos imidazólicos na peçonha bruta através de TLC.
- Foi possível uma pré-purificação do composto ativo que causa diminuição da resposta de Ach em preparação de músculo reto abdominal de rã.
- O composto ativo em preparação de músculo reto abdominal é degradado quimicamente por hidróxido de sódio e biologicamente por soro humano.
- Na peçonha bruta foram encontradas massas moleculares similares a murexina, senecioilcolina, etilurocanato e ácido urocânico através de espectrometria de massa.
- Sugere-se a presença de uma substância similar à murexina na peçonha de *Lasiadora* sp.
- Várias espécies de aranha apresentam substâncias com comportamento cromatográfico em TLC e de coloração com reagente de Pauly similares a murexina.
- Esta é a primeira descrição de compostos similares a murexina como constituintes da peçonha de artrópodes terrestres, uma vez que, essas substâncias são toxinas exclusivamente marinhas.
- Esta descoberta é importante para um melhor entendimento de quadros de envenenamento de animais domésticos por aranhas caranguejeiras e o desenvolvimento de novos tratamentos veterinários.

## 8 – Referências Bibliográficas

- Ali, H.H. & Savarese, J.J. (1976). Monitoring of neuromuscular function. **Anesthesiology**, v. 45, p. 216–249.
- Barrett, E.F. & Magleby, K.L. (1976). Physiology of cholinergic transmission. In: Goldberg, A.M., Hanin, I, (Eds). **Biology of Cholinergic Function**. New York: Raven Press. p. 29–100.
- Beach, R.L., Vaca, K., Pilar, G. (1980). Ionic and metabolic requirements for high-affinity choline uptake and acetylcholine synthesis in nerve terminals at a neuromuscular junction. **J. Neurochem.**, v. 34, p. 1387–1398.
- Bisset, N.G. (1992). War and hunting poisons of the New World. Part I. Notes on the early history of curare. **J. Ethnoph.**, v. 36, p. 1-26.
- Blankenship, J.E., Langlais, J.P., Kittredge, J.S. (1975). Identification of a cholinomimetic component in the digestive gland of *Aplysia californica*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 51C, p. 129-137.
- Brasil, V. & Vellard, J. (1926). Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. **Mem. Inst. Butantan.**, v. 2, p. 243-99.
- Cervefiansky, C., Dajas, F., Harvey, A.L., Karlsson, E. (1991). Fasciculins, anticholinesterase toxins from mamba venoms: biochemistry and pharmacology. In: Harvey, A.L., (Ed). **Snake Toxins**. New York: Pergamon, p. 131-164.
- Cervehansky, C., Engstrom, A., Karlsson, E. (1994). Study of structure-activity relationship of fasciculin by acetylation of amino groups. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1199, p. 1-5.
- Cingolani, H.E., Houssay, A.B. e cols. 2004. **Fisiologia humana de Houssay**. 7ª. ed. Porto Alegre, Brasil. Artmed, p. 1124.
- del Castillo, J. & Katz, B. (1956). Quantal components of the endplate potential. **J. Physiol. (Lond)**, v. 124, p. 560–573.

- Dwyer, T.M., Adams, D.J., Hille, B. (1980). The permeability of the end plate channel to organic cations in frog muscle. **J. Gen. Physiol.**, v. 75, p. 469–492.
- Engel, A.G. (1991). Review of evidence for loss of motor nerve terminal calcium channels in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 635, p. 246–258.
- Engel, A.G. (1994). The neuromuscular junction. In: Engel, A.G., Franzini-Armstrong, C. (Ed.). **Myology**. 2d ed. New York: McGraw-Hill, p. 261–302.
- Engel, A.G., Lambert, E.H., Howard, F.M. (1977). Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis. Ultrastructure and light microscopic localization and electrophysiological correlations. **Clin. Proc.**, v. 52, p. 267–280.
- Erspamer, V. & Benati, O. (1953). Identification of murexine as  $\beta$ -[imidazolyl-(4)] acryl-choline. **Science**, v. 117, p. 161-162.
- Erspamer, V. & Dordoni, F. (1947). Ricerche chimiche e farmacologiche sugli estratti di ghiandola ipobranchiale di *Murex trunculus*, *Murex brandaris* e *Tritonalia erinacea*. III. Presenza negli estratti di un nuovo derivato della colina o di una colina omologa: la murexina. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 74, p. 263-285.
- Erspamer, V. & Glässer, A. (1957). The pharmacological actions of murexine (urocanylcholine). **Br. J. Pharmac.**, v. 12, p. 176-184.
- Erspamer, V. (1948). Osservazioni preliminari, chimiche e farmacologiche, sulla murexina. **Experientia**, v. 4, p. 226-227.
- Estrada, G., Villegas, E., Corzo, G. (2007). Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Natural Products Reports**, v. 24, p. 145-161.
- Fatt, P. & Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. **J. Physiol. (Lond)**, v. 117, p. 109–128.
- Flucher, B.E., & Daniels, M.P. (1989). Distribution of Na<sup>+</sup> channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kD protein. **Neuron**, v. 3, p. 163–175.

- Foelix, R.F. (2011). **Biology of spiders**. 3<sup>a</sup> ed. Oxford: Oxford University Press. p. 419.
- Foldes, F.F., Erdös, E.G., Baart, N., Shanor, S.P. (1957). Interrelationship of murexine, dihydromurexine and human cholinesterases. **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, v. 94, p. 500-503.
- Fontana, M.D., Lucas, H.S.M., Vital Brazil, O. (2002). Neuromuscular blocking action of the *Theraphosa blondii* spider venom. **J. Venom. Anim. Toxins.**, v. 8, p. 316-323.
- Gerschman de Pikelin, B.S. & Schiapelli, R.D. (1973). La subfamilia "Ischnocolinae" (Araneae: Theraphosidae). **Rev. Mus. Cienc. Nat. Buenos Aires**, v. 4, p. 43-77.
- Gray, W.R. & Oliveira, B. (1988). Peptide toxins from venomous *Conus* snails. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 665-700.
- Grelis, M.E. & Tabachnick, I.I.A. (1957). The enzymatic hydrolysis of imidazoleacryloylcholine (murexine) and imidazolepropionylcholine (dihydromurexine) by various cholinesterases. **Br. J. Pharmac.**, v. 12, p. 320-322.
- Haimovich, B., Schotland, D.L., Fieles, W.E., Barchi, R.L. (1987). Localization of sodium channel subtypes in rat skeletal muscle using channel-specific monoclonal antibodies. **J. Neurosci.**, v. 7, p. 2957-2966.
- Hall, Z.W. & Sanes, J.R. (1993). Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. **Cell**, v. 72, p. 99-121.
- Heuser, J.E. & Reese, T.S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. **J. Cell Biol.**, v. 57, p. 315-344.
- Holmstedt, B. & Whittaker, V.P. (1958). Pharmacological properties of  $\beta,\beta$ -dimethylacryloylcholine and some other  $\beta$ -substituted acryloylcholines. **Br. J. Pharmac.**, v. 13, p. 308-314.

- Houssay, B.A. & Negrete, J. (1919). Nuevos estudios experimentales sobre la acción fisiológica de las ponzoñas de las arañas. **Rev. Inst. Bact. Depart. Nac. Hig.**, v. 2, p. 189.
- Hubbard, J.I., Jones, S.F., Landau, E.M. (1968). On the mechanism by which calcium and magnesium affect the release of transmitter by nerve impulses. **J. Physiol. (Lond)**, v. 196, p. 75–87.
- Isbister, G.K., Seymour, J.E., Gray, M.R., Raven, R.J. (2003). Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. **Toxicon**, v. 41, p. 519–524
- Karlsson, E., Mbugua, P.M., Rodriguez-Iltthurralde, D. (1984). Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. **J. Physiol.**, v. 79, p. 232-240.
- Kewitz, H. (1955) Über die Aktionssubstanz in sympathischen Ganglien. **Arch. exp. Phath. Pharmac.**, v. 225, p. 111-114.
- Keyl, M.J. & Whittaker, V.P. (1958). Some pharmacological properties of murexine (urocanylcholine). **Br.J. Pharmac.**, v. 13, p. 103-106.
- Keyl, M.J., Michaelson, I.A., Whittaker, V.P. (1957). Physiologically active choline esters in certain marine gastropods and other invertebrates. **J. Physiol.**, v. 139, p. 434-454.
- Koeppen, B.M. & Stanton, B.A. (Ed.) (2009). **Berne & Levy - Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 864.
- Lampe, R.A., Defeo, P.A., Davison, M.D., Young, J., Herman, J.L., Spreen, R.C., Horn, M.B., Mangono, T.J., Keit, R.A. (1993). Isolation and pharmacological characterization of  $\omega$ -grammotxin SIA, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium channel responses. **Mol. Pharmacol.**, v. 44, p. 451–460.
- Liang, S.P. (2004). Na overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)]. **Toxicon**, v. 43, p. 575-585.

- Liang, S.P., Qing, Y.B., Zhang, D.Y., Pan, X., Chen, X.D., Xie, J.Y. (1993a) Biological characterization of the crude venom from the spider *Selenocosmia huwena*. **Zoo. Res.**, v. 14, p. 65-70.
- Liang, S.P., Zhang, D.Y., Pan, X., Chen, Q., Zhou, P.A., (1993b). Properties and amino acid sequence of huwentoxin-I, a neurotoxin purified from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. **Toxicon**, v. 31, p. 969–978.
- Lindstrom, J. (1994). Acetylcholine receptors: Structure, function, synthesis destruction and antigenicity. In: Engel, A.G. & Franzini-Armstrong, C., (Eds). **Myology**, 2<sup>a</sup> ed. New York: McGraw-Hill, p. 586–606.
- Magleby, K.L. (1994). Neuromuscular transmission. In: Engel, A.G. & Franzini-Armstrong, C. (Eds). **Myology**, 2<sup>a</sup> ed. New York: McGraw-Hill, p. 442–463.
- Mahmood, A. & Carmichael, W.W. (1987). Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. **Toxicon**, v. 25, p. 1221-1227.
- Maliotz, G. & Stein, H. W., 1951. Beitrag zur papier chromatographie der cholinesterase und der zucker. **Biochem. J.**, v. 322, p. 165-167.
- McMahan, U.J., Sanes, J.R., Marshall, L.M. (1978). Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction. **Nature**, v. 271, p. 172–174.
- Protti, D.A., Sanchez, V.A., Cherksey, B.D., Sugimori, M., Llinas, R.R., Uchitel, O.D. (1993). Mammalian neuromuscular transmission blocked by funnel web toxin. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 681, p. 405–407.
- Pumplin, D.W., Reese, T.S., Llinas, R. (1981). Are the presynaptic membrane particles calcium channels? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 7210–7213.
- Rash, L.D. & Hodgson, W.C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, v. 40, p. 225-254.
- Rocha e Silva, T.A.A. (2008). Análise histológica do aparato venenífero e caracterização fármaco-bioquímica da peçonha de *Vitalius dubius* (Araneae,



Theraphosidae). **Tese de doutorado** – Programa de pós graduação em biologia celular e estrutural, Universidade Estadual de Campinas.

Roseghini, M. (1971). Occurrence of dihydromurexine (imidazolepropionylcholine) in the hypobranchial gland of *Thais* (*Purpura*) *haemastoma*. **Experientia**, v. 27, p. 1008-1009.

Roseghini, M., Erspamer, V., Ramorino, L., Gutiérrez, J.E. (1970). Choline esters their precursors and metabolites in the hypobranchial gland of prosobranchiate molluscs, *Concholepas concholepas* and *Thais chocolata*. **Eur. J. Biochem.** 12, 468-473.

Roseghini, M., Severini, C., Erspamer, G.F., Erspamer, V. (1996). Choline esters and biogenic amines in the hypobranchial gland of 55 molluscan species of the neogastropod muricoidea superfamily. **Toxicon**, v. 34, p. 33-55.

Ruff, R.L. & Whittlesey, D. (1992). Na<sup>+</sup> current densities and voltage dependence in human intercostals muscle fibres. **J. Physiol. (Lond)**, v. 458, p. 85-97.

Ruff, R.L. & Whittlesey, D. (1993). Na<sup>+</sup> currents near and away from endplates on human fast and slow twitch muscle fibers. **Muscle Nerve**, v. 16, p. 922-929.

Ruff, R.L. (1986). Ionic channels: I. The biophysical basis for ion passage and channel gating. **Muscle Nerve**, v. 9, p. 675-699.

Ruff, R.L. (1992). Sodium channel current density at and away from end plates on rat fast and slow-twitch skeletal muscle fibers. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. C229-C234.

Saito, A. & Zacks, S.I. (1969). Ultrastructure of Schwann and perineural sheaths at the mouse neuromuscular junction. **Anat. Rec.**, v. 164, p. 379-398.

Salpeter MM. (1987). Vertebrate neuromuscular junctions: general morphology, molecular organization, and functional consequences. In: Salpeter, M.M., (Ed). **The Vertebrate Neuromuscular Junction**. New York: Alan Liss, p. 1-54.

Schenberg, S. & Pereira-Lima, F.A. (1971). *Phoneutria nigriventer* venom. Pharmacology and biochemistry of its components. In: **Venomous animals and**

**their venoms.** Bucherl, W. & Buckley, E.E., (Eds). New York: Academic Press, v. 3, p. 279-297.

Shiomi, K., Ishii, M., Shimakura, K., Nagashima, Y., Chino, M. (1998). Tigloylcholine: a new choline ester toxin from the hypobranchial gland of two species of muricid gastropods (*Thais clavigera* and *Thais bronni*). **Toxicon**, v. 36, p. 795-798.

Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, p. 912.

Smith, I. (1960). **Chromatographic and electrophoretic techniques**. London, William Heinemann Medical Books Publication, v 1.

Smith, S.J. & Augustine, G.J. (1988). Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. **Trends Neurosci.**, v. 10, p. 458–464.

Usmanov, P.B., Kalikulov, D., Shadyeva, N.G., Neilin, A.B., Tashmukhamedov, B.A. (1985). Postsynaptic blocking of glutamatergic and cholinergic synapses as a common property of Araneidae spider venoms. **Toxicon**, v. 23, p. 528-531.

Usmanov, PB, Kalikulov, D., Shadyeva, N., Tashmukhamedov, B. A., (1983). Effects of spider (*Argiope lobata*) venom on glutamatergic and cholinergic synapses. **Doklady Akad. Nauk SSSR Moscow.**, v. 273, p. 1017-1018.

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

Whittaker, V. P. (1958). Acrylylcholine: a new naturally occurring pharmacologically active choline ester from *Buccinum undatum*. **Biochem. Pharmac.**, v. 1, p. 342-346.

Whittaker, V.P. (1957).  $\beta_1, \beta_2$ -Dimethylacrylylcholine, a new naturally occurring pharmacologically active ester of choline. **Biochem. J.**, v. 66, p. 35P.

Whittaker, V.P. (1963). Identification of acetylcholine and related esters of biological origin. In: **Choline Esters and Anticholinesterase Drugs Handbuch exper. Pharmakol.** Erg. W. Bd. XV, Koelle, G. (Ed). Berlin: Springer, p. 2-39.

Zhou, P.A., Xie, X.-J., Li, M., Yang, D.M., Xie, Z.P., Zong, X., Liang, S.P. (1997).  
Blockade of neuromuscular transmission by huwentoxin-I, purified from the  
venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. **Toxicon**, v. 35, p. 39–  
45.