



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



**Caracterização química e biológica de compostos
bioativos da peçonha da aranha caranguejeira *Nhandu
coloratovillosus* (Schmidt, 1998)**

Solange Cristina Rego Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Schwartz

Co-orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Brasília, 2010



Dissertação de Mestrado

Solange Cristina Rego Fernandes

Título:

“Caracterização química e biológica de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira *Nhandu coloratovillosus* (Schmidt, 1998)”.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Schwartz
Presidente / Orientador
UnB

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Membro Titular Interno não vinculado ao Programa
UnB – IB-CEL

Profa. Dra. Márcia Renata Mortari
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
UnB-IB-CFS

Profa. Dra. Mariana de Souza Castro
Membro Suplente
Interno Vinculado ao Programa
UnB-IB-CFS

Brasília, 24 de junho de 2010.

À minha mãe, exemplo de força e superação.

À minha família, início de tudo.

Ao meu querido Hugo, por todo o apoio e suporte, sem você eu não teria conseguido.

Agradecimentos

Primeiramente à minha mãe, pelo amor, suporte, incentivo e por sempre acreditar em minhas escolhas;

Aos meus familiares, avós, tios, primos, irmãos, sobrinha e todos que estiveram sempre presentes em minha vida me apoiando, mesmo estando longe;

Ao Hugo, meu companheiro incondicional, pelo seu amor e motivação. Não existem palavras que expressem a gratidão que sinto por você! À sua família (minha também), tão querida, especialmente aos meus sogros Helcia e Tininho, pelo suporte e carinho durante todos esses anos;

Ao Dr. Carlos Alberto Schwartz pela confiança em mim depositada ao aceitar o papel de orientador desse trabalho;

Ao Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior, pela co-orientação, paciência, conversas e valiosas contribuições;

À Dra. Mariana de Souza Castro pelo incentivo, inúmeras ajudas, sugestões e conselhos sempre tão pertinentes;

À Dra. Isabel de Fátima Correia Batista e Rafael Marques Porto do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pela agilidade e presteza na realização do sequenciamento N-terminal;

Ao Dr. Jaime Santana por abrir as portas do Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro – UnB e ao Hugo de Almeida Silva (mais uma vez!) pela ajuda nos ensaios de zimografia;

Ao Dr. Paulo César Motta e Anderson, pela manutenção das aranhas no Laboratório de Aracnologia – UnB;

Ao Dr. Marcelo Valle responsável pelo Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas – UnB, onde pude realizar grande parte desse trabalho;

Ao Dr. Antonio Sebben e colegas do Laboratório de Anatomia – UnB, pelo empréstimo de materiais e convivência harmoniosa;

Aos queridos amigos do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas. Ao Nuno pelo apoio técnico e paciência. Ao querido Rayner pela grande ajuda em diversos momentos, principalmente para realização do PMF;

Ao amigo Fábio Caixeta, pela disposição e boa vontade em nos transmitir seus conhecimentos “Sucrose Gaptíferos”;

Aos queridos amigos do Laboratório de Toxinologia: Thalita, Janaína, Carol e Natiela, pelo apoio constante, conversas e momentos de descontração. À Luísa, Marianne, Melani e Fernanda, pelas boas risadas. Ao querido Jimmy, presente em todos os momentos de dificuldades e alegrias, muito obrigada por tudo! À Jéssica, pela preocupação, apoio e por sempre pensar positivo. Aos nordestinos porretas Fagner e Andréa, pelo carinho, desabafos e, longas conversas em momentos de desespero. À Pollyanna, minha irmã de mestrado, sempre disposta a me ajudar, mesmo que de madrugada ou aos finais de semana (sou muito grata à você);

Ao Washington e Cezinha pelo apoio técnico;

À turma da graduação, amigos inesquecíveis, por estarem presentes ainda que distantes. À minha querida Aline, presente nos momentos de comemoração e de desabafos, sempre tão doce e amável;

Aos chefes do meu segundo trabalho, por me ajudarem a continuar estudando, mesmo não entendendo como uma bancária pode gostar tanto de aranhas e sapos;

Aos amigos da vida que levo sempre no peito. À minha amiga e futura mamãe Fernanda, por tanta paciência em escutar cada progresso e vibrar junto comigo. Aos futuros papais Luiz e Evelyne, por cada encontro, passeio e conversa. À Debus, pelo carinho e amizade capazes de atravessar o Oceano Atlântico. À Alice, minha amiga de sempre, por tornar a vida mais gostosa com sua alegria contagiante e por me dar de presente a afilhada mais amada do mundo!

A todos que de uma forma ou de outra, contribuíram de maneira positiva para a concretização desse trabalho.

Índice Geral

1. Introdução	1
1.1. Aranhas	2
1.2. Composição da peçonha de aranhas	3
1.3. Componentes de baixa massa molecular (< 1 kDa)	4
1.3.1. Acilpoliaminas	5
1.4. Peptídeos de aranhas (1-10 kDa)	6
1.4.1. Peptídeos antimicrobianos	8
1.4.2. Peptídeos neurotóxicos	16
1.4.2.1. Ação em canais para K^+	16
1.4.2.2. Ação em canais para Na^+	18
1.4.2.3. Ação em canais para Ca^{++}	19
1.5. Componentes proteicos	23
1.6. Potencial biotecnológico	25
1.7. <i>Nhandu coloratovillosus</i> (Schmidt, 1998)	28
2. Justificativa	29
3. Objetivos	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. Material e Métodos	31
4.1. Reagentes químicos	31
4.2. Animais e coleta	31
4.3. Extração e quantificação da peçonha	31
4.4. Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida 12% (SDS-PAGE)	31
4.4.1. Coloração com Azul de Comassie G250	32
4.4.2. Coloração com Nitrato de Prata	32
4.5. Zimogramas SDS-PAGE	32
4.5.1. Caseinolítico e Gelatinolítico	32
4.5.2. Hialuronidásico	33
4.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa (RP-HPLC)	33
4.6.1. Fracionamento da peçonha bruta	33
4.6.2. Purificação dos peptídeos	34
4.7. Quantificação das frações purificadas	34
4.8. Ensaio antimicrobiano	34
4.8.1. Ensaio preliminar	34
4.8.2. Determinação de MIC	35
4.9. Ensaio hemolítico	35

4.9.1.	Ensaio preliminar	35
4.10.	Ensaio farmacológico em nervo periférico de anfíbio (<i>Sucrose Gap</i>)	36
4.11.	Ensaio cardiotóxico	37
4.12.	Redução e alquilação	37
4.13.	Hidrólise enzimática	38
4.14.	Espectrometria de Massa e Sequenciamento De Novo	39
4.15.	<i>Peptide Mass Fingerprinting</i> (PMF)	39
4.16.	Degradação de Edman e Sequenciamento N-terminal	39
5.	Resultados	42
5.1.	Fracionamento cromatográfico e análises por Espectrometria de Massa	42
5.2.	Ensaio com a peçonha bruta de <i>N. coloratovillosus</i> e GF1	47
5.2.1.	Perfil eletroforético	47
5.2.2.	Zimograma SDS-PAGE – Caseinolítico, Gelatinolítico e Hialuronidásico	48
5.2.3.	Atividades antimicrobiana e hemolítica	49
5.2.4.	Ensaio farmacológico em nervo periférico de anfíbio com GF1	52
5.3.	Purificação e caracterização dos componentes	53
5.3.1.	Recromatografias e Espectrometria de Massa MALDI-TOF	53
5.3.2.	Redução/Alquilação e <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> (PMF)	56
5.3.3.	Sequenciamento, alinhamentos e similaridades	59
5.4.	Identificação da hialuronidase	62
5.5.	Ensaio com RF20	62
5.5.1.	Determinação do MIC	62
5.5.2.	Ensaio farmacológico em nervo periférico de anfíbio	63
5.5.3.	Ensaio cardiotóxico	63
6.	Discussão	64
6.1.	Componentes da peçonha de <i>N. coloratovillosus</i>	64
6.2.	Ensaio preliminares com a peçonha bruta de <i>N. coloratovillosus</i>	68
6.3.	Atividades enzimáticas	69
6.3.1.	Atividade proteolítica	69
6.3.2.	Atividade hialuronidásica	71
6.4.	Sequenciamento	73
6.5.	Ensaio eletrofisiológicos	74
7.	Conclusões	78
8.	Referências Bibliográficas	79

Lista de Figuras

Figura 1. Aparatos para inoculação de peçonha desenvolvidos pelo caramujo-cone (<i>cone snail</i>), anêmona-do-mar, cobra, monstro de Gila, aranha e escorpião.	1
Figura 2. Estruturas de acilpoliaminas identificadas em aranhas.	6
Figura 3. Modelo de atuação dos peptídeos na membrana plasmática.	12
Figura 4. Representação do modelo Shai-Matsuzaki-Huang.	13
Figura 5. Representação molecular das estruturas tridimensionais de neurotoxinas isoladas da peçonha de aranhas.	18
Figura 6. Fêmea de <i>Nhandu coloratovillosus</i> .	28
Figura 7. Modelo esquemático da preparação do ensaio farmacológico com nervo periférico de anfíbio (<i>Sucrose Gap</i>).	37
Figura 8. Esquema geral da estratégia experimental adotada no isolamento e caracterização de componentes bioativos na peçonha de <i>N. coloratovillosus</i> .	41
Figura 9. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da peçonha bruta de <i>N. coloratovillosus</i> .	42
Figura 10. Sobreposição do perfil cromatográfico de 1 mg de peçonha bruta de fêmeas (preto) e machos (azul) de <i>N. coloratovillosus</i> .	43
Figura 11. Freqüência dos componentes de massas obtidas das frações cromatográficas da peçonha de <i>N. coloratovillosus</i> .	46
Figura 12. Distribuição dos componentes de massas em relação à hidrofobicidade.	46
Figura 13. Perfil eletroforético da peçonha bruta de <i>N. coloratovillosus</i> (40 µg) em SDS-PAGE 12%.	47
Figura 14. Zimograma em SDS-PAGE 8% da peçonha bruta fresca (40 µg) de <i>N. coloratovillosus</i> .	48
Figura 15. Zimograma hialuronidásico em SDS-PAGE 12%, ácido hialurônico 0,14%.	49
Figura 16. Inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> (A) e <i>E. coli</i> (B) causada pela peçonha bruta de <i>N. coloratovillosus</i> .	50
Figura 17. Ensaio farmacológico em nervo ciático isolado de rã.	52
Figura 18. Ensaio farmacológico no nervo ciático isolado de rã.	53
Figura 19. Purificação da fração 16.	54

Figura 20. Purificação da fração 20.	54
Figura 21. Purificação da fração 29.	55
Figura 22. Purificação da fração 32.	56
Figura 23. Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da RF20 nativa (em azul) e da RF20 reduzida e alquilada (em roxo).	57
Figura 24. Identificação de RF20 por <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> revelou alta similaridade com LTx2.	58
Figura 25. Sequenciamento de novo do digesto tríptico de m/z 898,43.	60
Figura 26. Alinhamento do fragmento N-terminal de RF20 realizado por meio do programa ClustalW (Thompson <i>et al.</i> , 1994).	61
Figura 27. Zimograma hialuronidásico em SDS-PAGE 12%, ácido hialurônico 0,14% da peçonha bruta de <i>N. coloratovillosus</i> e RF32.	62
Figura 28. Ensaio farmacológico em nervo ciático isolado de rã.	63
Figura 29. Microcardiograma da fatia de ventrículo isolado de <i>L. catesbeianus</i> após aplicação de 365 nM de RF20.	63
Figura 30. Estrutura proposta parcialmente elucidada para as acilpoliaminas APC ₆₀₀ e APC ₇₂₈ .	66
Figura 31. Árvore da subfamília Theraphosinae.	74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Peptídeos de aranhas com atividades antimicrobianas contra os microorganismos indicados com os valores de seus respectivos MICs.	14
Tabela 2. Função fisiológica e farmacológica dos diferentes tipos e subtipos de canais para Ca⁺⁺.	21
Tabela 3. Drogas desenvolvidas a partir de toxinas animais.	27
Tabela 4. Massas obtidas nas frações cromatográficas em fracionamento por RP-HPLC da peçonha bruta de <i>N. coloratovillosus</i>.	44
Tabela 5. Massas obtidas por fração cromatográfica em fracionamento por RP-HPLC da peçonha bruta de <i>N. coloratovillosus</i>.	45
Tabela 6. Porcentagens de inibição de crescimento microbiano e atividade hemolítica das frações majoritárias de <i>N. coloratovillosus</i>.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Da	Dalton
g	grama
L	litro
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
mg	miligrama
mL	mililitro
m/Z	Massa/carga
nM	nanomolar
nm	nanômetro
NMDA	Ácido n-metil-D-aspártico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
rpm	rotação por minuto
RP-HPLC	<i>Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography</i>
s	segundo
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i>
v	volume
μL	microlitro
μM	micromolar
μs	microsegundos

A	Alanina	M	Metionina
C	Cisteína	N	Asparagina
D	Aspartato	P	Prolina
E	Glutamato	Q	Glutamina
F	Fenilalanina	R	Arginina
G	Glicina	S	Serina
H	Histidina	T	Treonina
I	Isoleucina	V	Valina
K	Lisina	W	Triptofano
L	Leucina	Y	Tirosina

RESUMO

A peçonha de aranhas tem provado ser uma fonte valiosa de componentes farmacologicamente ativos capazes de exercer as mais diversas funções. Por atuarem em diferentes sistemas biológicos, a caracterização de componentes bioativos desperta grande interesse na prospecção de novos fármacos. Poucos trabalhos com aranhas caranguejeiras brasileiras têm sido desenvolvidos nessa área e nenhum até o momento foi realizado com a peçonha de *Nhandu coloratovillosus*. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a composição bioquímica da peçonha de *N. coloratovillosus* visando à identificação de compostos bioativos. A peçonha bruta foi submetida a fracionamento por RP-HPLC e 35 frações foram eluídas. Análises por MALDI-TOF MS detectaram a presença de 46 componentes de massas moleculares distintas. Por meio de eletroforese foi possível visualizar a presença de componentes de alta massa molecular. Um componente com atividade hialuronidásica foi identificado e purificado, apresentando aproximadamente 42 kDa. Foi possível determinar a concentração inibitória mínima da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Foi identificada atividade antibacteriana em quatro frações cromatográficas e um grupo de frações com baixa massa molecular (GF1), entretanto não foi possível a determinação de MIC. A aplicação de 1,5 mg da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* apresentou um efeito neurotóxico irreversível em nervo ciático de rã, enquanto que GF1 apresentou um leve efeito reversível. Um peptídeo teve sua estrutura primária parcialmente elucidada e análises por alinhamento revelaram 90% de identidade com LTx2, uma toxina isolada de *Lasiodora* sp. que interfere nas correntes de Ca^{++} em canais para Ca^{++} voltagem-dependentes. A utilização de 365 nM desse peptídeo em ensaio cardiotoxíco não causou efeito significativo na amplitude do estímulo. O estudo e caracterização de componentes bioativos presentes na peçonha de aranhas são de extrema relevância, uma vez que podem auxiliar no esclarecimento de questões taxonômicas, na identificação de potenciais drogas terapêuticas e no entendimento da biologia desses animais.

Abstract

Spider venoms had proven to be a valued source of pharmacologically active compounds, capable of performing diverse functions. By acting on different biological systems, the characterization of such compounds exerts great interest in the prospection of new drugs. Few studies with Brazilian spiders have been developed in this area and none so far has been conducted with the venom of *Nhandu coloratovillosus*. Our objective was to characterize the biochemical composition from the venom of *N. coloratovillosus*, aiming at the identification of biologically active compounds. The crude venom was fractionated by RP-HPLC, and 35 fractions were eluted. Analysis by MALDI-TOF MS detected the presence of 46 compounds with different molecular weights. The presence of components with high molecular weights was visualized by SDS-PAGE. One component with hyaluronidase activity was identified and purified, with a molecular mass of approximately 42 kDa. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the crude venom of *N. coloratovillosus* was determined against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Antibacterial activity was identified in four chromatographic fractions and a group of low molecular weight fractions (GF1), however it was not possible to determine their MIC. The application of 1,5 mg of the crude venom of *N. coloratovillosus* showed an irreversible neurotoxic effect in frog sciatic nerve, whereas GF1 showed a mild reversible effect. The primary structure of one peptide was partially elucidated, and alignment analysis revealed 90% identity with LTx2, a toxin isolated from *Lasiodora* sp. which modulates Ca⁺⁺ currents in Ca⁺⁺ voltage-dependent channels. The utilization of 365 nM of this peptide in a cardiotoxic test caused no significant effect at the amplitude of the stimulus. The study and characterization of bioactive compounds present in the venom of spiders is of utmost importance since it may help in the understanding of taxonomic issues, the biology of these animals and in the identification of potential therapeutic drugs.

1. Introdução

Componentes biologicamente ativos podem ser produzidos por plantas, animais e microorganismos, muitas vezes como parte de uma estratégia de defesa e/ou para captura de presas. Diversas toxinas produzidas por diferentes *taxa* têm sido isoladas, e muitas delas podem ser consideradas valiosas ferramentas para pesquisa na prospecção e direcionamento de novas terapias. Essas toxinas podem ser produzidas com a ausência ou presença de um aparato inoculador de veneno. Toxinas que são produzidas sem associação a um aparato inoculador têm sido isoladas de dinoflagelados, como as ciguatoxinas e brevetoxinas, que ativam canais para Na^+ voltagem-dependentes; toxinas presentes em baiacus e caranguejos, que acumulam níveis letais de tetrodotoxina, um potente bloqueador de canais para Na^+ , possivelmente produzidas por bactérias; toxinas presentes em sapos, que acumulam alcalóides por meio de sua dieta, como a batracotoxina e epibatidina, este último causador de potente antinocicepção (Lewis e Garcia, 2003).

Inúmeras toxinas também têm sido estudadas de animais que possuem um aparato inoculador (figura 1). Esse aparato permite a entrega das toxinas para o interior dos tecidos de suas presas por diferentes vias: subcutânea, intramuscular ou intravenosa; facilitando e aumentando a sua ação.

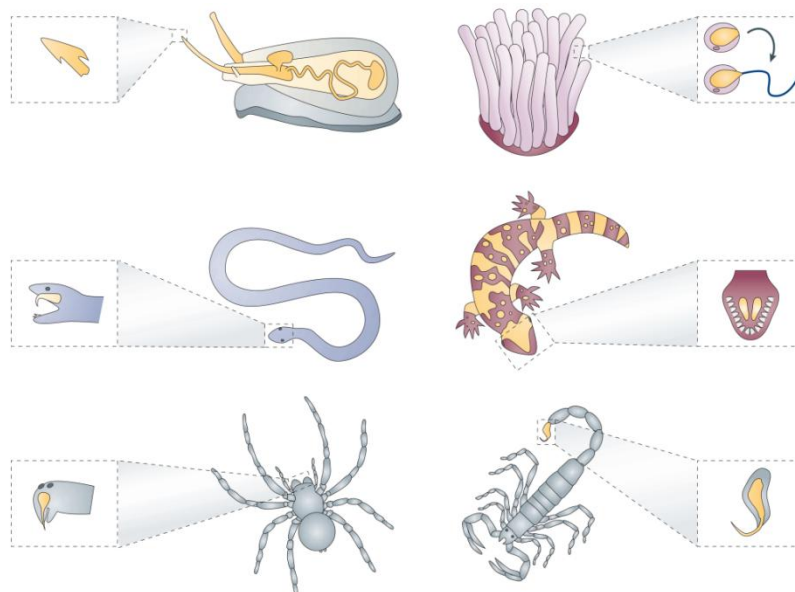


Figura 1. Aparatos para inoculação de peçonha desenvolvidos pelo caramujo-cone (cone snail), anêmona-do-mar, cobra, monstro de Gila, aranha e escorpião. Os aparatos estão destacados (harpão, nematocistos, dentes e ferrão). Retirado de Lewis e Garcia, 2003.

O isolamento, purificação e estudo do mecanismo da ação de toxinas encontradas em cobras, escorpiões, moluscos, insetos e aranhas, pode revelar muito sobre o processo fisiológico no qual elas interferem em diferentes sistemas. Com a crescente percepção da utilidade potencial de muitos componentes encontrados em venenos animais, a peçonha de aranhas tem sido reconhecida como uma das fontes mais promissoras na pesquisa farmacológica para o desenvolvimento de novas drogas com potencial terapêutico (Escoubas e Rash, 2004).

1.1. Aranhas

As aranhas pertencem a um grupo antigo, com registros fósseis que datam de 300 milhões de anos, desde o período Carbonífero (Rash e Hodgson, 2002). Com exceção dos insetos, são os invertebrados mais bem sucedidos na Terra, com 41253 espécies descritas e agrupadas em 3777 gêneros e 109 famílias (Platnick, 2010). A ordem Araneae pode ser dividida em dois grandes grupos: Mesothelae e Opisthothelae. Mesothelae parece especialmente primitivo por reter muitas características plesiomórficas e não apresenta interesse do ponto de vista toxinológico por conter aranhas desprovidas de glândulas de peçonha (Haupt, 2003). Aracnídeos da subordem Opisthothelae apresentam como apomorfia glândulas produtoras de peçonha, e desta maneira despertam grande interesse para toxinólogos e farmacêuticos. As aranhas caranguejeiras pertencem à infra-ordem Mygalomorphae, infra-ordem mais basal dentro de Opisthothelae e são caracterizadas por um par de quelíceras paralelas ao sentido do corpo (Raven, 1985), compreendendo as famílias Theraphosidae, Dipluridae e Hexatelidae.

As maiores aranhas, comumente denominadas tarântulas (família Theraphosidae) estão longe de serem as espécies mais perigosas, com exceção do gênero *Atrax*. Apesar da grande diversidade de espécies de aranhas, somente a minoria dessas representa algum tipo de perigo ao homem (Escoubas *et al.*, 2000), como as aranhas dos gêneros *Latrodectus*, *Loxosceles*, *Phoneutria*, *Atrax* e *Hadronyche* (Vetter e Isbister, 2008). No Brasil, as causadoras de acidentes de maior gravidade pertencem aos gêneros *Latrodectus*, *Loxosceles* e *Phoneutria*.

Todas as aranhas são predadores que produzem peçonha (com exceção das aranhas da família Uloboridae) e a utilizam para paralisar e matar sua presa ou para defender-se de outros predadores e organismos patogênicos. A peçonha de aranhas tem provado ser uma fonte valiosa de componentes farmacologicamente ativos (Nicholson, 2006), com algumas apresentando mais de 1000 peptídeos diferentes (Escoubas *et al.*, 2006). São consideradas misturas complexas, podendo ser encontrados mais de 100 diferentes componentes de distintas naturezas químicas (Vassilevski *et al.*, 2009). A maioria das aranhas se alimenta predominantemente de insetos e outros artrópodes. Entretanto, aranhas de grande porte podem capturar e se alimentar de sapos, lagartos, cobras, pequenas aves e até roedores (Rash e Hodgson, 2002).

1.2. Composição da peçonha de aranhas

Diversos componentes podem ser encontrados na peçonha de aranhas, entre eles: sais e íons inorgânicos, carboidratos, glicose, aminas biogênicas, aminoácidos, acilpoliaminas, proteínas e pequenos polipeptídeos que podem apresentar distintas ações farmacológicas como bloqueadores e moduladores de canais iônicos, formadores de poros em membranas plasmáticas, entre outras (Escoubas *et al.*, 2000; Corzo e Escoubas, 2003). Compreendem tanto componentes de baixa massa molecular quanto polipeptídeos, com massas moleculares variando entre 0,1-14 kDa (Estrada *et al.*, 2007).

As duas maiores classes de moléculas que estão presentes nas peçonhas de aranhas são as acilpoliaminas e os peptídeos (modificadores de canais iônicos e formadores de poros). Estas categorias moleculares representam em torno de 2/3 do peso seco das peçonhas de aranhas (Corzo *et al.*, 2002). Os principais alvos de acilpoliaminas e peptídeos são receptores de insetos, entretanto, devido a similaridade dos mesmos aos receptores de vertebrados, muitas moléculas encontradas na peçonha de aranhas reconhecem e antagonizam receptores de mamíferos (Estrada *et al.*, 2007).

Os componentes encontrados na peçonha de aranhas podem ser divididos convencionalmente em três grupos de acordo com suas massas moleculares: (i)

componentes de baixa massa molecular (< 1 kDa), inclui substâncias com várias estruturas, como as acilpoliaminas; (ii) peptídeos (1–10 kDa), neurotoxinas contendo pontes dissulfeto e peptídeos citolíticos lineares; (iii) substâncias de alta massa molecular (>10 kDa), diferentes polipeptídeos e proteínas incluindo enzimas e neurotoxinas (Vassilevski *et al.*, 2009).

1.3. Componentes de baixa massa molecular (< 1 kDa)

Além do amplo espectro de poliaminas, peptídeos e proteínas biologicamente ativas, a peçonha de aranhas contém uma variedade de componentes de baixa massa molecular que exibem atividades farmacológicas, incluindo aminas biogênicas, aminoácidos livres, nucleotídeos e sais inorgânicos (Rash e Hodgson, 2002).

Aminas biogênicas como serotonina, histamina, noradrenalina, assim como aminoácidos como ácido glutâmico, taurina, ácido aspártico e ácido γ -aminobutírico são encontrados na peçonha de diversas aranhas (Kuhn-Nentwig *et al.*, 1994; Rash *et al.*, 1998). A maioria desses componentes é conhecida como neuromediadores ou neuromoduladores do sistema nervoso de insetos. Alguns casos de sinergismo ocorrem em ação de neurotoxinas e esses componentes, com efeito, provavelmente similar ao dos sais de potássio, que ativam alvos de receptores de neurotoxinas (Adams, 2004). A dor causada pela picada de algumas aranhas ocorre devido a uma combinação dos danos mecânicos causados pelas quelíceras e os efeitos de aminas biogênicas (serotonina e histamina), adenosina e ATP (Escoubas e Rash, 2004). Aminas biogênicas também podem aumentar a permeabilidade de vasos e o fluxo sanguíneo local, contribuindo assim para a propagação de diferentes componentes da peçonha (Vassilevski *et al.*, 2009).

A presença de ATP, ADP e AMP na peçonha de aranhas foi confirmada por Chan *et al.*, 1975 e Savel-Neimann, 1989. ATP foi considerado como participante de um efeito sinérgico com a necrotoxina isolada da peçonha de *Dugesiella hentzi* (Chan *et al.*, 1975). Os derivados de purina, como adenosina, guanosina, inosina e 2,4,6-dihidroxipurina foram detectados na peçonha de *Latrodectus menavodi* (Horn *et al.*, 2001).

Altas concentrações de íons potássio atraem especial atenção. Em uma dada concentração, eles são capazes de causar paralisia na vítima devido à despolarização da membrana de células excitáveis induzidas por potássio. Além disso, sinergismo foi revelado na ação das neurotoxinas peptídicas e sais de potássio, o que é provavelmente um evento generalizado notado não somente para *C. salei*, mas também para a peçonha do escorpião *Paraguthus transvaalicus* (Vassilevski *et al.*, 2009). Supõe-se que o sinergismo é baseado na despolarização induzida por potássio durante a qual canais iônicos voltagem-dependentes, alvos de neurotoxinas, são ativados.

1.3.1. Acilpoliaminas

Um grande número de acilpoliaminas de aranhas tem sido descoberto, e são caracterizadas como componentes hidrofílicos de baixa massa molecular que provocam uma rápida paralisia em suas presas (Adams *et al.*, 1989). Parecem possuir essencialmente atividade inseticida e induzem rápida paralisia por bloqueio irreversível nas junções neuromusculares de insetos.

A estrutura comum de acilpoliaminas de aranhas compreende um grupamento de ácido carboxílico em uma extremidade, e na outra extremidade um grupamento amino primário ou um grupo guanidina (figura 2-A). O grupamento aromático está ligado a uma cadeia principal que inclui de 1 a 9 unidades aminopropil, aminobutil ou aminopentil (Escoubas *et al.*, 2000). As acilpoliaminas podem ter ou não aminoácidos em suas estruturas (McCormick e Meinwald, 1993).

Foram primeiramente encontradas em peçonhas de aranhas da família Theraphosidae, e seu efeito tóxico foi relatado pela primeira vez na década de 80 nas peçonhas de *Nephila clavata* (Aramaki *et al.*, 1986) e *Argiope lobata* (Grishin *et al.*, 1986). Esses componentes têm mostrado forte interação com as junções neuromusculares de insetos (Estrada *et al.*, 2007), visando principalmente os receptores ionotrópicos de glutamato (Stromgaard *et al.*, 2001). A JSTX-3 (figura 2-B) isolada de *N. clavata*, bloqueia receptores pós-sinápticos de glutamato em neurônios centrais de mamíferos (Rash e Hodgson, 2002). A Arg-636 (nomeada argiopina - figura 2-C) isolada da peçonha de *A. lobata* bloqueia irreversivelmente a resposta do músculo

de insetos a glutamato exógeno (Usmanov *et al.*, 1983). Diversos antagonistas de receptores de glutamato (chamados argiotoxinas) foram isolados de *Argiope trifasciata*, *A. florida* e *Araneus gemma*, uma das quais a Arg-636 (isolada por Grishin *et al.*, 1986) foi subsequenteemente encontrada como sendo idêntica a argiopina descrita em 1984 por Usherwood e colaboradores. JSTX-3 foi descrita por ser seletiva para receptores ionotrópicos de glutamato não-NMDA (consistindo de AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole) enquanto que argiopina (Arg-636) foi descrita por inibir tanto receptores ionotrópicos NMDA (N-methyl-D-aspartate) quanto receptores ionotrópicos não-NMDA (Rash e Hodgson, 2002), além de possivelmente inibir canais para Na^+ voltagem-dependentes (Scott *et al.*, 1998).

Acilpoliaminas podem atuar também em canais para cálcio voltagem-sensitivos e receptores nicotínicos de acetilcolina (Fatehi *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997).

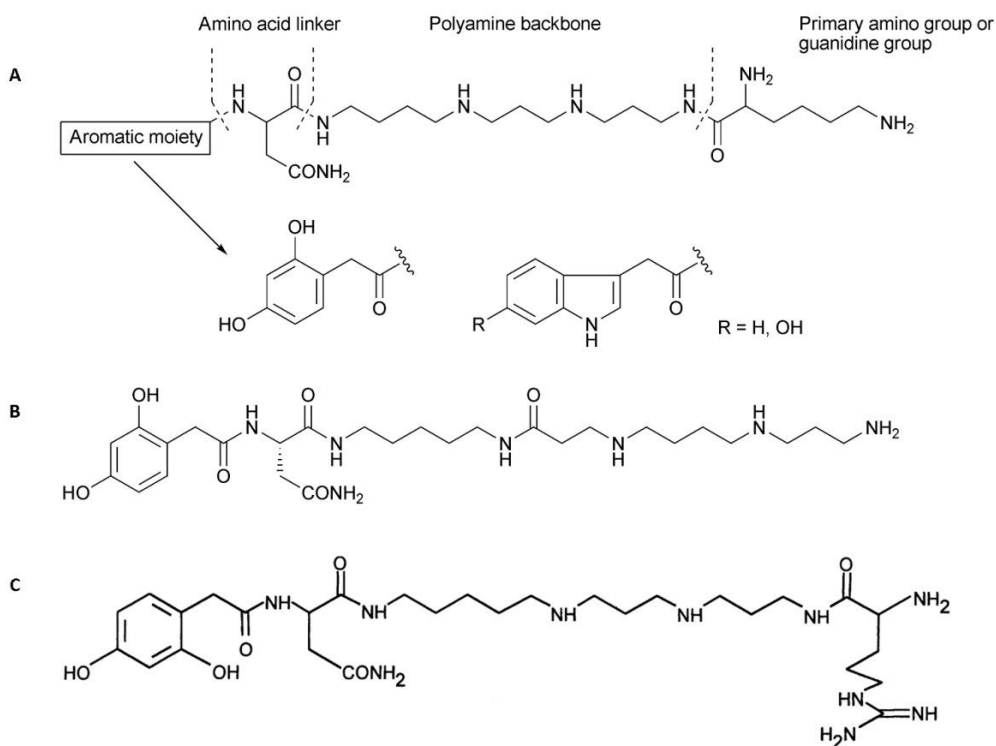


Figura 2. Estruturas de acilpoliaminas identificadas em aranhas. (A) Estrutura geral; **(B)** JSTX-3; **(C)** Argiopina ou Arg-636. Adaptado de Estrada *et al.*, 2007 e Rash e Hodgson (2002).

1.4. Peptídeos de aranhas (1-10 kDa)

A maioria dos peptídeos de aranhas pode ser classificada em dois grandes grupos: peptídeos citolíticos lineares e neurotoxinas com pontes dissulfeto (Corzo e Escoubas, 2003). O tamanho das neurotoxinas de aranhas varia aproximadamente

entre 3 e 7 kDa, enquanto que peptídeos citolíticos são tipicamente menores (aproximadamente 3 kDa) (Kuhn-Nentwig, 2003). Até então o maior peptídeo citolítico identificado apresentava 48 resíduos de aminoácidos (Corzo *et al.*, 2002), entretanto, Vassilevski e colaboradores (2008) identificaram um grupo de peptídeos da peçonha de *Lachesana tarabaevi*, nomeadas cito-insetotoxinas, no qual todos os oito peptídeos contêm 69 resíduos de aminoácidos e apresentam atividade antibacteriana e inseticida.

É desconhecida a exata função dos peptídeos citolíticos lineares encontrados na peçonha de aranhas, sendo atribuída uma função mais acessória do que uma ação a alvos específicos (Vassilevski *et al.*, 2008). Existem algumas sugestões sobre a exata função desses peptídeos, como por exemplo, o efeito tóxico direto em presas. Essa função foi proposta para as licotoxinas da peçonha da aranha *Lycosa carolinensis* (Lycosidae) (Yan e Adams, 1998), para as cupieninas de *Cupiennius salei* (Ctenidae) (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2002) e oxiopininas de *Oxyopes kitabensis* (Oxyopidae) (Corzo *et al.*, 2002). Esses peptídeos podem ainda agir como um agente 'espalhador', facilitando a passagem de neurotoxinas através de barreiras celulares, garantindo seu acesso aos neurônios-alvo. Essa cooperação com neurotoxinas também tem sido atribuída às cupieninas (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2002) e oxiopininas (Corzo *et al.*, 2002). Um papel anti-séptico direto tem sido sugerido para as licotoxinas (Yan e Adams, 1998), cupieninas (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2002) e laticinas (Kozlov *et al.*, 2006), que podem desempenhar um papel de desinfecção e conservação na presa paralisada. Uma função adicional de proteção à glândula de peçonha também tem sido levantada (Kuhn-Nentwig, 2003).

Peptídeos neurotóxicos constituem uma biblioteca combinatória que tem sido bem direcionado no curso da evolução de aranhas para selecionar a melhor ação de moléculas que acionam diferentes alvos no sistema nervoso da presa/agressor (Escoubas *et al.*, 2006).

Aproximadamente 50 peptídeos já foram descritos para peçonhas de aranhas caranguejeiras (Migalomorfos), uma quantidade pequena se considerado o universo de mais de 200 peptídeos isolados de aranhas. Mais de 30 peptídeos já foram descritos

para peçonhas de aranhas da família Theraphosidae e a maioria das sequências primárias desses peptídeos apresenta de 31 a 41 resíduos de aminoácidos com três pontes dissulfeto (Escoubas e Rash, 2004), com exceção de dois peptídeos isolados da peçonha de *Lasiadora parahybana* que apresenta 49 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto (Escoubas *et al.*, 1997).

1.4.1. Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos são encontrados como um componente do sistema imune inato de invertebrados e vertebrados (Hancock *et al.*, 2006). Os seres vivos são expostos diariamente a infecções microbianas e patógenos, e para sua defesa desenvolveram potentes mecanismos que são parte da imunidade inata e adaptativa (Bulet *et al.*, 2004). Um mecanismo do sistema imune inato é a produção de substâncias antimicrobianas, principalmente peptídeos e polipeptídeos. Dependendo do organismo considerado, eles são tanto constitutivamente produzidas por células secretoras quanto induzidas no momento da infecção (Hancock e Diamond, 2000).

Em 2001, mais de 700 peptídeos antimicrobianos já tinham sido identificados em todas as espécies vivas (Daffre *et al.*, 2001). Em geral, são moléculas pequenas de até 10 KDa que exibem um alto teor de aminoácidos básicos e, pelo menos 50% de aminoácidos hidrofóbicos (Bulet *et al.*, 1999; Hancock e Diamond, 2000). Apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. O mecanismo de ação mais bem conhecido se dá por meio da sua inserção na membrana celular que causa a destruição ou a permeabilização da mesma, levando o microorganismo à morte. Alternativamente, os peptídeos antimicrobianos podem se ligar a um receptor da membrana, levando a uma perda específica de sua função. Além disso, ao se translocarem através da membrana, essas moléculas podem atuar intracelularmente, impedindo a síntese de metabólitos importantes para o microorganismo. Por atuarem em diferentes compartimentos celulares, esses compostos tornam-se candidatos promissores para o desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (Daffre *et al.*, 2001).

Peptídeos com ação antimicrobiana podem ser classificados de acordo com suas propriedades químicas e estrutura conformacional em dois grandes grupos: lineares e cíclicos. Os peptídeos lineares são aqueles que não apresentam em sua sequência pontes dissulfeto, e podem ser subdivididos nos que formam uma α -hélice anfipática após contato com a membrana celular e nos ricos em determinados resíduos de aminoácidos, tais como prolina, histidina e triptofano (Daffre *et al.*, 2001). Peptídeos que não apresentam resíduos de cisteína em sua estrutura são representados por peptídeos que agem em membranas lipídicas. Os cíclicos são peptídeos que apresentam resíduos de cisteína em sua estrutura, podendo ter as extremidades amino-terminal abertas ou fechadas (Daffre *et al.*, 2001).

Peptídeos citolíticos lineares constituem o grupo mais estudado e representam um modelo adequado para a concepção de novos medicamentos contra microorganismos resistentes. Exibem principalmente efeito citolítico, não característico de componentes que contém pontes dissulfeto. Por essa razão, podemos considerar os peptídeos lineares como um grupo especial encontrado na peçonha de aranhas (Vassilevski *et al.*, 2009). Além da linearidade, peptídeos citolíticos são geralmente curtos (contendo até 50 resíduos de aminoácidos), catiônicos (com moléculas com carga positiva relativamente alta em pH neutro, PI >10), e polipeptídeos anfifílicos propensos a formação de α -hélices, que exibem afinidade à bicamadas lipídicas e apresentam uma estrutura espacial relativamente simples (Dubovskii *et al.*, 2006). Exemplos de peptídeos antimicrobianos lineares são as laticinas (Ltc), isoladas da peçonha da aranha *Lachesana tarabaevi*, que exibem um grande espectro de ação contra bactérias, agindo em membranas plasmáticas (Dubovskii *et al.*, 2006).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos é catiônica, ou seja, possuem uma carga global final positiva em pH fisiológico devido a presença de uma alta quantidade de lisina e arginina (resíduos positivamente carregados) do que ácido aspártico e ácido glutamínico (resíduos negativamente carregados) (Bulet *et al.*, 2004). Essa característica catiônica pode ser reforçada por uma amidação C-terminal (Bleakman e Smyth, 1987). Em adição a essa propriedade catiônica, peptídeos antimicrobianos freqüentemente adotam uma estrutura anfipática com um lado hidrofóbico de

encontro com um lado hidrofílico. A presença de pontes dissulfeto oferece mais estabilidade e resistência a destanuração e proteólise, mas também ajuda a formar uma superfície de contato da qual a maioria dos resíduos participam, em volta de um núcleo geralmente hidrofóbico (Corzo e Escoubas, 2003). Desse modo, essa característica catiônica dos peptídeos antimicrobianos, associada com sua tendência a adotar anfipaticidade, facilita sua interação e inserção em paredes celulares aniônicas e membranas fosfolipídicas de microorganismos (Oren e Shai, 1998). A associação desses peptídeos à bicamada lipídica das células e formação de poros na membrana pode resultar num desequilíbrio de cargas ou na lise celular (Villegas e Corzo, 2005).

É sugerido que a membrana de procariotos seja mais suscetível à ação dos peptídeos antimicrobianos devido à alta densidade de cargas negativas (Yeaman e Yount, 2003) em decorrência da composição fosfolipídica de sua membrana: em procariotos encontra-se basicamente o fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilserina enquanto que em eucariotos são basicamente a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomielina. Essa composição distinta de fosfolipídios resulta em cargas e hidrofobicidade diferenciadas para as membranas.

O modo de ação dos peptídeos antimicrobianos é ainda bastante discutido, no entanto, existem alguns modelos que buscam descrever o seu modo de ação. Todos os modelos propostos causam rompimento da membrana celular, resultando num fluxo excessivo de íons e de pequenas moléculas através dessa membrana, levando à lise celular. Os principais modelos para modo de ação dos peptídeos nas membranas são: formação de poros (*Barrel-stave*) e poros toroidais (*Toroid-pore*); formação de carpetes (*Carpet-like*) (Pouny *et al.*, 1992) e atuação como detergentes (*Detergent-like*) (Shai, 1999; Bechinger e Lohner, 2006) (figura 3).

Modelo *Barrel-Stave*: Nesse modelo, o peptídeo anfipático e helicoidal se liga paralelamente na parte externa da bicamada lipídica, e depois penetra nessa bicamada para induzir a formação de poros (Figura 3-A) que são orientados perpendicularmente ao plano da bicamada (Bechinger, 1999; Yeaman e Yount, 2003), por meio de atrações eletrostáticas entre os resíduos carregados e sítios iônicos da bicamada. Uma quantidade mínima de resíduos de aminoácidos é necessária para atravessar a

bicamada e o tamanho do poro é aumentado com o progressivo recrutamento de mais monômeros (Nascimento *et al.*, 2003). Confirmação experimental deste modelo foi obtida com o peptídeo antibiótico alameticina (He *et al.*, 1996).

Modelo carpete (*Carpet-like*): Outro modelo de associação de peptídeos antimicrobianos com a membrana é a formação de carpetes (Bechinger, 1999). Os peptídeos catiônicos se associam paralelamente à membrana como um carpete, e não chegam a formar a estrutura quaternária de um poro (Figura 3-B). Ao atingirem uma concentração limiar sujeitam a membrana a um balanço de cargas desfavorável, prejudicando a integridade e provocando a ruptura da mesma (Yeaman e Yount, 2003). Este modelo foi proposto para peptídeos antimicrobianos isolados da pele de anfíbios (dermaseptinas) e da hemolinfa de insetos (cecropinas) (Shai, 1999; Oren e Shai, 1998; Pouny *et al.*, 1992) e é sugerido para muitas laticinas (Dubovskii *et al.*, 2008; Vassilevski *et al.*, 2007).

Modelo do poro toroidal (*Toroid-pore*): Os peptídeos que interagem fortemente com lipídios resultam na formação de poros toroidais (Figura 3-C), auxiliando na estabilização do poro, uma vez que reduzem a repulsão eletrostática existente entre os peptídeos positivamente carregados (Shai, 1999). Peptídeos formadores de α -hélice são dispostos perpendicularmente na bicamada, mas permanecem fortemente ligados aos grupos lipídios por toda sua extensão, devido ao rearranjo dos lipídios. Como resultado, tem-se a formação de poros aquosos por onde os íons fluem. As magaininas parecem atuar por esse tipo de mecanismo (Nascimento *et al.*, 2003). Supõe-se que a maioria dos peptídeos citolíticos de aranhas ajam apenas desta maneira (Dubovskii *et al.*, 2008; Vassilevski *et al.*, 2007; Belokoneva *et al.*, 2004; Nomura e Corzo, 2006).

Modelo detergente (*Detergent-like*): Esse modelo sugere a inserção intercalada dos peptídeos na camada lipídica e a formação de micelas dos peptídeos juntamente com fosfolipídios retirados da membrana plasmática, provocando a destruição celular. Assim, os peptídeos atuam de modo similar a detergentes como Triton-X, por exemplo, fato que determinou o nome do modelo proposto (Bechinger e Lohner, 2006).

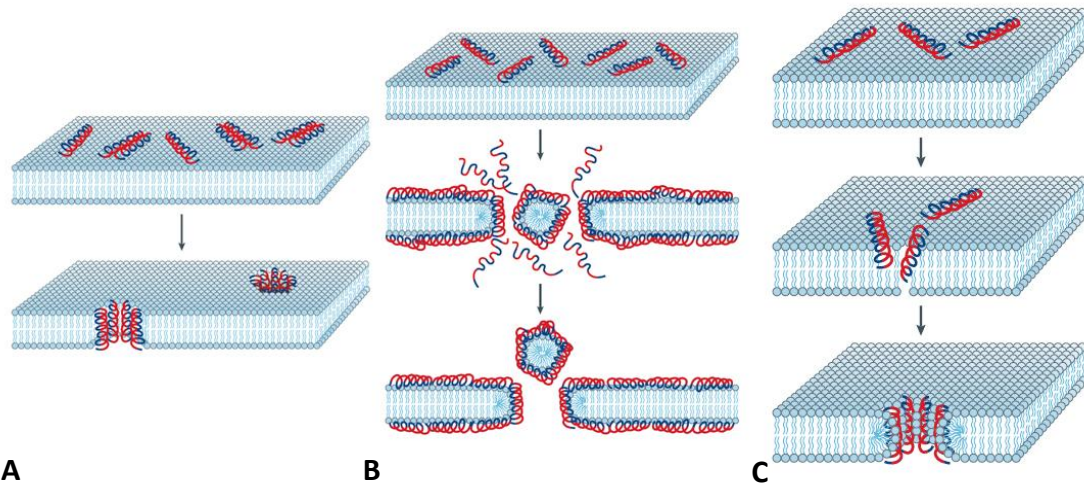


Figura 3. Modelo de atuação dos peptídeos na membrana plasmática. (A) Barrel-stave, (B) Carpet-like, (C) Toroid-pore. Adaptado de Brodgen, 2005.

Modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH): Tal mecanismo envolve tanto a formação de carpete quanto de poro (figura 4). Esse modelo propõe uma interação do peptídeo com a membrana seguido de um deslocamento dos lipídios, uma alteração estrutural da membrana com a formação de poros e, em alguns casos, na passagem do peptídeo para o interior da célula atingindo possíveis alvos intracelulares. Finalmente, a membrana tem a sua integridade perdida (Nascimento *et al.*, 2003). Geralmente, peptídeos que atuam por esse mecanismo são letais para microorganismos em concentrações da ordem de micromolares (Zaslouff, 2002).

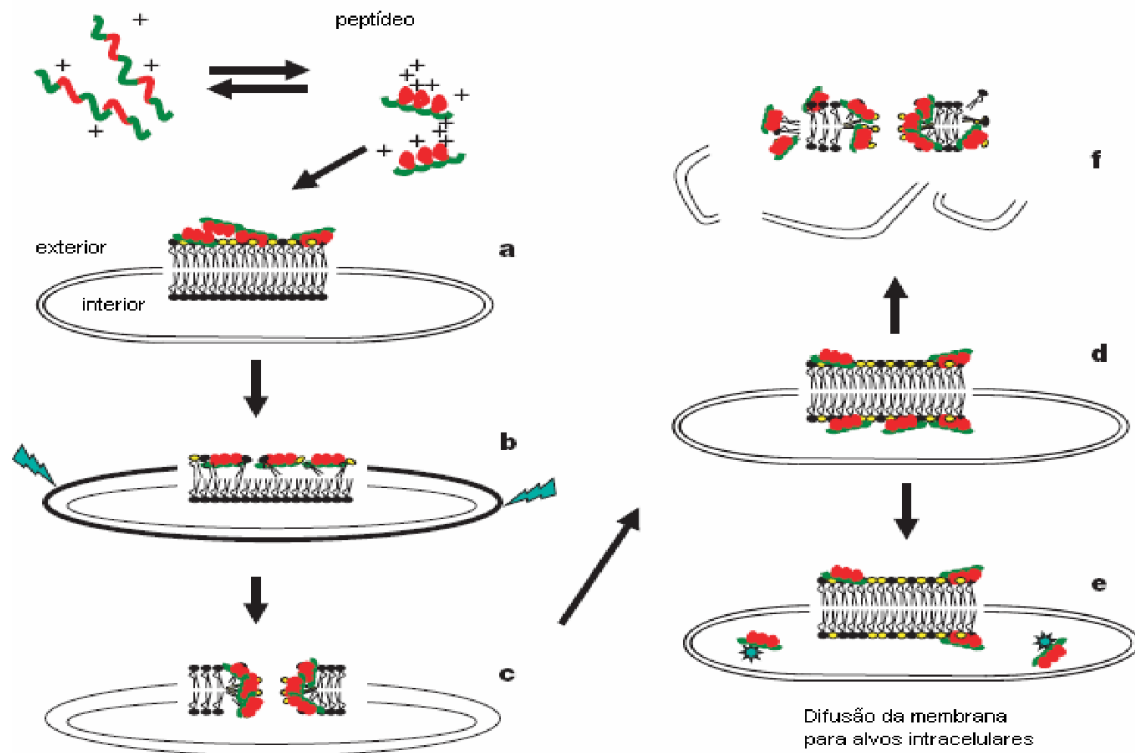


Figura 4. Representação do modelo Shai-Matsuzaki-Huang. (a) Formação de um carpete de peptídeos na superfície da membrana; (b) Integração dos peptídeos à membrana; (c) Formação de poros transitórios; (d) Transporte de lipídeos e peptídeos para a face interna; (e) Difusão dos peptídeos para alvos intracelulares (em alguns casos); (f) Colapso da membrana. Adaptado de Zasloff (2002).

Apesar de a ação membranolítica ser considerada a principal causa de morte celular, peptídeos antimicrobianos também podem desencadear processos de morte celular programada interagindo com alvos intracelulares (Morton *et al.*, 2007).

Em 1989, Xu e colaboradores relataram o primeiro peptídeo antimicrobiano da peçonha da aranha *Lycosa singoriensis*. A partir daí, diversos peptídeos antimicrobianos foram isolados da peçonha de aranhas, como é mostrado na tabela 1.

A gomesina (tabela 1) é um peptídeo catiônico cíclico rico em resíduos de cisteína, que apresenta homologia com taquiplesina e polifemusina, peptídeos isolados de caranguejos. Gomesina foi isolada da hemolinfa de *Acanthoscurria gomesiana* e apresenta forte atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias e fungos (Silva Jr. *et al.*, 2000).

Tabela 1. Peptídeos de aranhas com atividades antimicrobianas contra os microorganismos indicados com os valores de seus respectivos MICs.

Espécie	Peptídeo	M.M. (Da)	N° a.a.	Sequência	MIC (µM)			Referência
					Bactérias		Fungos	
					Gram-positivas	Gram-negativas		
<i>L. singoriensis</i>	Licocitina 1	1959.12	18	GKLQAFLLAKMKEIAAQTL	1.60-3.20 – <i>B. subtilis</i>	3.20-6.40 – <i>E. coli</i>		Budnik et al., 2003
	Licocitina 2	1987.15	18	GRLQAFLLAKMKEIAAQTL	1.57-3.14 – <i>B. subtilis</i>	3.14-6.29 – <i>E. coli</i>	1.25-2.51 – <i>C. albicans</i> 5.02-10.05 – <i>P. aeruginosa</i>	
<i>L. carolinensis</i>	Licotoxina 1	2844.50	25	IWLTALKFLGKHAAKHLAKQQLSKL	<5.0 – <i>B. thurigiensis israelensis</i>	10-20 – <i>E. coli</i> (D31) 80-150 – <i>E. coli</i> (DH5)	100-150 – <i>C. glabrata</i> 100-200 – <i>C. albicans</i>	Yan e Adams, 1998
	Licotoxina 2	3204.80	27	KIKWFKTMKSIKFAKQKMKHLGGE	10-60 – <i>B. thurigiensis israelensis</i>	<10 – <i>E. coli</i> (D31) <40 – <i>E. coli</i> (DH5)	100-150 – <i>C. glabrata</i> ND – <i>C. albicans</i>	
<i>C. salei</i>	Cupienina 1a	3798.59	35	GFGALFKFLAKKVAVTVAKQAQKQAKYVVKQME	0.31-0.63 – <i>S. aureus</i> 2.50-5.0 – <i>E. faecalis</i>	0.31-0.63 – <i>E. coli</i> 0.31-0.63 – <i>P. aeruginosa</i>		Kuhn-Nentwig et al., 2002
	Cupienina 1d	3795.55	35	GFGSLFKFLAKKVAKTVAKQAQKQAKYVANKHME	0.63-1.25 – <i>S. aureus</i> 1.25-2.50 – <i>E. faecalis</i>	0.08-0.16 – <i>E. coli</i> 0.16-0.31 – <i>P. aeruginosa</i>		
<i>L. tarabaevi</i>	Latarcina 1	3071.80	25	SMWSGMWRRKLLKLRNALKKLLKGE	0.5 – <i>A. globiformis</i> 1.0 – <i>B. subtilis</i>	1.0 – <i>E. coli</i> (DH5α) 0.7 – <i>E. coli</i> (MH1) 4.1 – <i>P. aeruginosa</i>	17.0 – <i>P. pastoris</i> >33.0 – <i>S. cerevisiae</i>	Kozlov et al., 2006
	Latarcina 2a	2900.80	26	GLFGKLIKFKRKAISYAVKARGKH	0.7 – <i>A. globiformis</i> 0.4 – <i>B. subtilis</i>	0.5 – <i>E. coli</i> (DH5α) 0.7 – <i>E. coli</i> (MH1) 6.7 – <i>P. aeruginosa</i>	6.7 – <i>P. pastoris</i> >54.0 – <i>S. cerevisiae</i>	
	Latarcina 3a	2481.40	20	SWKSMAKKLKEYMEKLLKQRA	0.3 – <i>A. globiformis</i> 1.2 – <i>B. subtilis</i>	2.5 – <i>E. coli</i> (DH5α) 6.0 – <i>E. coli</i> (MH1) >40 – <i>P. aeruginosa</i>	20.0 – <i>P. pastoris</i> 20.0 – <i>S. cerevisiae</i>	
	Latarcina 3b	2424.30	20	SWASMAKKLKEYMEKLLKQRA	0.7 – <i>A. globiformis</i> 2.9 – <i>B. subtilis</i>	23 – <i>E. coli</i> (DH5α) 28 – <i>E. coli</i> (MH1) >45 – <i>P. aeruginosa</i>	23.0 – <i>P. pastoris</i> 23.0 – <i>S. cerevisiae</i>	
	Latarcina 4a	2900.60	24	GLKDKFKSMGKELKQYIQTWKAKF	0.3 – <i>A. globiformis</i> 1.1 – <i>B. subtilis</i>	4.5 – <i>E. coli</i> (DH5α) 3.2 – <i>E. coli</i> (MH1) >35 – <i>P. aeruginosa</i>	36.0 – <i>P. pastoris</i> 18.0 – <i>S. cerevisiae</i>	
	Latarcina 4b	2882.60	24	SLKDKVKSMGKELKQYIQTWKAKF	0.3 – <i>A. globiformis</i>	4.4 – <i>E. coli</i> (DH5α)	>35.0 – <i>P. pastoris</i>	

					1.1 – <i>B. subtilis</i>	4.4 – <i>E. coli</i> (MH1) >35 – <i>P. aeruginosa</i>	35.0 – <i>S. cerevisiae</i>		
	Latarcina 5	3427.90	28	GFFGKMKEYFKKFGASFKRRFANLKKRL	1.1 – <i>A. globiformis</i> 0.6 – <i>B. subtilis</i>	0.6 – <i>E. coli</i> (DH5α) 0.6 – <i>E. coli</i> (MH1) 18 – <i>P. aeruginosa</i>	>37.0 – <i>P. pastoris</i> >37.0 – <i>S. cerevisiae</i>		
<i>O. kitabensis</i>	Oxiopinina 1	5221.30	48	FRGLAKLLKIGLKS FARVLKVKLPKAAKAGKALAKSMADENAIRQQNQ	6.2 – <i>S. aureus</i>	1.6 – <i>E. coli</i>		Corzo et al., 2002	
	Oxiopinina 2a	4127.10	37	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDLKDNQ	6.2 – <i>S. aureus</i>	12.5 – <i>E. coli</i>			
<i>A. gomesiana</i>	Gomesina	2270.40	18	ZCRRLCYKQRCVTYCRGR	0.8-1.6 – <i>A. viridans</i> 6.25-12.5 – <i>B. cereus</i> 0.2-0.4 – <i>B. megaterium</i> 1.6-3.15 – <i>B. thuringiensis</i> 6.2-12.5 – <i>E. faecalis</i> 0.8-1.6 – <i>L. monocytogenes</i> 0.4-0.8 – <i>M. luteus</i> 3.15-6.25 – <i>P. acidolacrici</i> 1.6-3.15 – <i>S. aureus</i> 0.8-1.6 – <i>S. epidermis</i> 0.8-1.6 – <i>S. haemolyticus</i> 0.8-1.6 – <i>S. saprophyticus</i> 1.6-3.15 – <i>S. pyogenes</i> 1.6-3.15 – <i>N. asteroides</i>	ND – <i>A. tumegaciens</i> <100 – <i>A. faecalis</i> 0.8-1.6 – <i>E. coli</i> (1106) 0.4-0.8 – <i>E. coli</i> (D22) 0.8-1.6 – <i>E. coli</i> (D31) 0.4-0.8 – <i>E. coli</i> (SBS363) 3.15-6.25 – <i>E. carolovora carolovora</i> 3.15-6.25 – <i>E. cloacae</i> β12 3.15-6.25 – <i>K. pneumoniae</i> 1.6-3.15 – <i>P. aeruginosa</i> 0.8-1.6 – <i>S. thyphinurium</i> ND – <i>S. marcescens</i> Db11 3.15-6.25 – <i>X. campestris</i>	0.4-0.8 – <i>A. brassicola</i> 1.6-3.15 – <i>A. fumigatus</i> 12.5-25 – <i>B. bassiana</i> 0.4-0.8 – <i>F. culmorum</i> 0.4-0.8 – <i>F. oxysporum</i> 0.4-0.8 – <i>N. crassa</i> 0.2-0.4 – <i>N. haematococca</i> 0.4-0.8 – <i>T. viridae</i> 0.8-1.6 – <i>T. mentagrophytes</i> 0.15-0.3 – <i>C. albicans</i> 12.5-25 – <i>C. glabrata</i> 3.15-6.25 – <i>C. tropicalis</i> 0.8-1.6 – <i>C. neoformans</i> 1.6-3.15 – <i>S. cerevisiae</i>		Silva Jr. et al., 2000
<i>G. spatulata</i>	GsMTx-4	4092.96	34	GCLEFWWKCNPNDDKCCRPKLC SKLFLKCNFSF	0.5 – <i>B. subtilis</i> 4-8 – <i>S. epidermidis</i> 2-4 – <i>S. aureus</i>	8-16 – <i>P. aeruginosa</i> 32-64 – <i>S. typhimurium</i> 8-16 – <i>E. coli</i>		Oswald et al., 2002 Jung et al., 2006	

1.4.2. Peptídeos neurotóxicos

A maioria das aranhas estudadas produz uma peçonha com predominância de peptídeos neurotóxicos com massas moleculares variando de 3 a 7 kDa. Esses peptídeos apresentam um grande número de resíduos de cisteína, que podem formar de 3 a 7 pontes dissulfeto (Grishin, 1999). Peptídeos que contém a mesma quantidade de pontes dissulfeto geralmente apresentam grande homologia estrutural, mas diferem em suas características funcionais.

Como o principal objetivo da peçonha é a de paralisar a presa, as aranhas produzem uma variedade de toxinas que afetam o sistema nervoso. No aspecto biológico, os principais alvos de toxinas de aranhas devem ser procurados em insetos. O efeito em mamíferos pode ser: (i) também biologicamente justificado e realizar a função de proteção e ataque, (ii) resultado da homologia de moléculas-alvo entre os membros de diferentes *taxa*, ou (iii) acidental por possuírem requerimentos estruturais com ligantes dos receptores correspondentes (Vassilevski *et al.*, 2009). Os principais alvos de peptídeos que contém pontes dissulfeto atualmente caracterizados são, de acordo com seus efeitos neurotóxicos, componentes proteicos de membranas celulares eletro-excitáveis (de neurônios e miócitos).

As neurotoxinas isoladas da peçonha de aranhas podem ser classificadas de acordo com seu modo de ação como toxinas que agem em canais para cálcio (Ca^{++}), sódio (Na^+) e potássio (K^+); toxinas que estimulam a liberação de neurotransmissores e toxinas que bloqueiam receptores colinérgicos pós-sinápticos (Rash e Hodgson, 2002).

1.4.2.1. *Ação em canais para K^+*

Canais para K^+ desempenham um papel fundamental no processo de sinalização celular regulando a liberação de neurotransmissores, frequência cardíaca, secreção de insulina, excitabilidade neuronal, transporte de eletrólitos epitelial, contração do músculo liso e regulação do volume celular (Estrada *et al.*, 2007).

Neurotoxinas animais que agem em canais para K^+ têm sido isoladas da peçonha de diversas espécies animais, como caramujos marinhos, aranhas, escorpiões, anêmonas marinhas e cobras (Mouhat *et al.*, 2004). A maioria dessas toxinas apresenta entre 22 e 60 resíduos de aminoácidos e podem estar estabilizadas por duas

a quatro pontes dissulfeto. Componentes que influenciam em canais para K^+ são menos abundantes em peçonhas de aranhas.

Dois peptídeos com 35 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto – hanatoxina 1 (HaTx1) (figura 5-A) e hanatoxina 2 (HaTx2) – ambas isoladas de *Grammostola spatulata*, bloqueiam canais para K^+ K_v 2.1 em concentrações nanomolares (Swartz e MacKinnon, 1995). As hanatoxinas não apresentam homologia estrutural nítida com outros inibidores conhecidos de canais para K^+ mas sua estrutura primária é similar (>40% de identidade) com o bloqueador de canais para Ca^{++} ω -gramotoxina-SIA isolada da peçonha da mesma aranha (Grishin, 1999). Estudos têm indicado que hanatoxinas e gramotoxinas podem interagir tanto em canais para K^+ quanto em canais para Ca^{++} voltagem-dependentes.

Outro grupo de peptídeos de aranhas que também inibem canais para K^+ foi isolado da peçonha de *Heteropoda venatoria*. As heteropodatoxinas (HpTx1–3) consistem de peptídeos com 30 – 33 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto capazes de prolongar a duração do potencial de ação em miócitos ventriculares isolados de ratos, sugerindo que essas toxinas bloqueiam correntes de potássio (Estrada *et al.*, 2007).

As frixotoxinas (PaTxs) isoladas da peçonha de *Phrixothichus auratus* (Diochot *et al.*, 1999) bloqueiam especificamente correntes K_v 4.3 e K_v 4.2 com IC_{50} de 5 a 70 nM, alterando as propriedades de propagação dos canais. Em 2002, Escoubas e colaboradores isolaram peptídeos de aranhas que inibem canais para K^+ voltagem-dependentes nas subfamílias K_v 2 e K_v 4, ScTx1 de *Stromatopelma calceata* e HmTx1 e HmTx2 de *Heteroscodra maculata*. ScTx1 é o primeiro inibidor de alta afinidade para canais do subtipo K_v 2.2, e também inibe com alta afinidade canais do subtipo K_v 4.2. Similarmente, TLTx1 de *Theraphosa blondi* inibe canais para K^+ do subtipo K_v 4.2 (Ebbinghaus *et al.*, 2004). SGTx1, isolada da peçonha de *Scodra griseipes*, inibe reversivelmente mais de 40% das correntes de potássio (Marvin *et al.*, 1999).

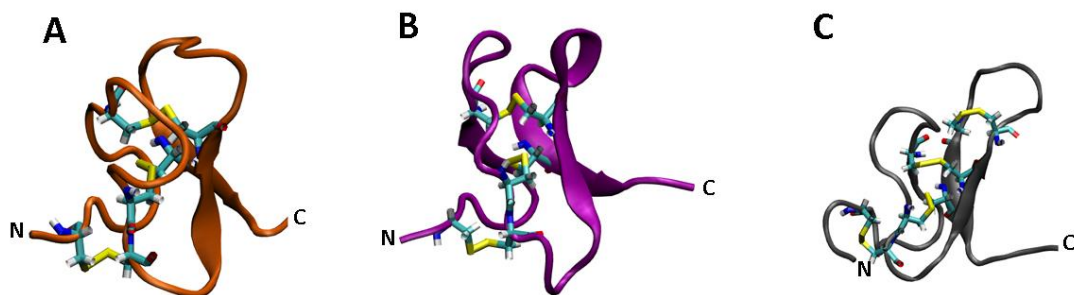


Figura 5. Representação molecular das estruturas tridimensionais de neurotoxinas isoladas da peçonha de aranhas. (A) Hanatoxina-1, atua em canais para K^+ (PDB 1D1H; Takahashi *et al.*, 2000); **(B)** Huwentoxina-IV, atua em canais para Na^+ (PDB 1MB6; Peng *et al.*, 2002); **(C)** ω -Agatoxina-IVA, atua em canais para Ca^{++} (PDB 1OAV; Kim *et al.*, 1995). As pontes dissulfeto estão representadas em amarelo. Imagens obtidas com auxílio do programa VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>; Humphrey *et al.*, 1996).

1.4.2.2. Ação em canais para Na^+

Canais para Na^+ voltagem-dependentes juntamente com os canais para K^+ representam a base fisiológica da transmissão de sinal no sistema nervoso (Estrada *et al.*, 2007) e toxinas que agem nesses canais claramente possuem mais de um mecanismo de ação, e muitas vezes podem ser classificados como modificadores de canais (Mouhat *et al.*, 2004). A organização dos canais para Na^+ em neurônios pode afetar na atividade do nervo, levando a disfunções sensoriais e motoras em humanos, contribuindo para mecanismos pato-fisiológicos de diversas doenças neurológicas, como esclerose múltipla, epilepsia, neuropatias periféricas e dor neuropática (Estrada *et al.*, 2007). Esse tipo de canal é o alvo molecular primário de numerosas drogas terapêuticas, como anestésicos, anticonvulsivantes e antiarrítmicos; e inseticidas, como piretróides. Peptídeos de escorpiões, anêmonas marinhas e caramujos têm contribuído significativamente no entendimento da topologia e farmacologia dos canais para Na^+ (Cestele e Catterall, 2000).

Ainda que todos os subtipos de canais para Na^+ apresentem mais de 70% de homologia e farmacologia similares, suas respostas a uma variedade de toxinas de aranhas pode ser diversa. Duas categorias principais de canais para Na^+ têm sido caracterizadas em mamíferos com base na utilização da tetrodotoxina (TTX). Os canais sensíveis a TTX encontram-se essencialmente no cérebro de mamíferos e músculo esquelético (Na_v 1.1-1.3, 1.4, 1.6 e 1.7), e os canais resistentes a TTX são encontrados no coração (Na_v 1.5) e neurônios sensitivos nos gânglios periféricos (Na_v 1.8 e 1.9)

(Estrada *et al.*, 2007). A habilidade de uma determinada toxina em discriminar dentre os diferentes subtipos de canais para Na⁺ em tecidos de mamíferos é de grande valia do ponto de vista terapêutico no desenvolvimento de novas drogas.

Os primeiros peptídeos que apresentaram ação bloqueadora em canais para Na⁺ foram isolados das aranhas Australianas *Atrax robustus* (δ -atracotoxina Ar1 ou robustoxina) (Sheumack *et al.*, 1985) e *Hadronyche versuta* (δ -atracotoxina Av1 ou versutoxina) (Brown *et al.*, 1988). Ambos os peptídeos com 42 resíduos de aminoácidos estabilizados por quatro pontes dissulfeto, atrasam a inativação de canais para Na⁺ sensíveis a TTX se ligando ao mesmo sítio do canal em invertebrados e em vertebrados (Estrada *et al.*, 2007). PnTx1, um conjunto de peptídeos isolado de *Phoneutria nigriventer*, produz inibição reversível em Na_v 1.2 recombinante (Martin-Moutot *et al.*, 2006). Outra neurotoxina que age em canais para Na⁺, nomeada huwentoxina-IV (HWTX-IV) (figura 5-B), foi isolada de *Selenocosmia huwena* (agora *Haplopelma huwenum*). Esse peptídeo inibe especificamente canais para Na⁺ neuronais sensíveis a TTX e não apresenta efeito significativo em canais resistentes a TTX, sendo proposto que essa neurotoxina tem um mecanismo de ação similar a tetrodotoxina. PaurTx3, isolado de *Phrixotrichus auratus*, é um dos peptídeos moduladores de canais voltagem-dependentes para Na⁺ mais potentes já descritos em peçonha de aranhas, com ação em concentrações nanomolares (Bosmans *et al.*, 2006). Uma família de peptídeos que afetam somente canais para Na⁺ voltagem-dependentes de insetos, nomeadas μ -agatoxinas (μ -Aga-I-IV), foi isolada de *Agelenopsis aperta* (Skinner *et al.*, 1989). Esses peptídeos que apresentam de 36 – 38 resíduos de aminoácidos e oito resíduos de cisteínas possuem mecanismo de ação semelhante a das insetotoxinas escorpiônicas, induzindo deslocamento da curva da ativação para potenciais mais negativos em canais para Na⁺ de insetos. As curtatoxinas (I-III) (Stapleton *et al.*, 1989) isoladas de *Holoena curta* e as δ -palutoxinas (Corzo *et al.*, 2000) de *Paracoelotes luctuosus* também afetam somente canais para Na⁺ voltagem-dependentes de insetos.

1.4.2.3. Ação em canais para Ca⁺⁺

Muitos peptídeos e polipeptídeos neurotóxicos afetam a funcionalidade de diferentes canais para Ca⁺⁺. Membros dessa família de canal desempenham um papel

crucial no acoplamento da atividade elétrica dos neurônios de uma variedade de processos celulares, tais como neurotransmissores e secreção hormonal, proliferação celular e expressão gênica (Corzo e Escoubas, 2003).

São reconhecidos seis grupos de canais para Ca^{++} (tabela 2) ativados por voltagem baseados em suas propriedades eletrofisiológicas e sensibilidade para vários ativadores/inibidores e íons (Uchitel, 1997). Correntes de cálcio tipo-L geralmente requerem uma despolarização forte para a ativação, são de longa duração, e são bloqueados por antagonistas como dihidropiridinas, fenilalquilaminas e benzotiazepinas. Canais para Ca^{++} dos tipos-N, -P e -Q, e também do tipo-R exigem forte despolarização para a ativação. Eles são relativamente pouco afetados por drogas antagonistas a canais para Ca^{++} do tipo-L, mas são bloqueadas por toxinas polipeptídicas específicas de peçonhas de caramujos e aranhas. São expressos principalmente em neurônios, onde iniciam a neurotransmissão nas sinapses mais rápidas e mediam a entrada de cálcio nos corpos celulares e dendritos. Correntes de cálcio do tipo-T são ativados por despolarização fraca e são transitórios. Eles são resistentes tanto a antagonistas orgânicos quanto a toxinas de cobras e aranhas usadas para definir correntes de cálcio dos tipos -N e -P/-Q. São expressos em uma grande variedade de tipos celulares onde estão envolvidos na definição do potencial de ação e controle de padrões de disparos repetitivos (Catterall *et al.*, 2005). A função fisiológica, localização, antagonistas específicos e funções celulares de cada tipo de canal para Ca^{++} estão presentes na tabela 2.

Tabela 2. Função fisiológica e farmacológica dos diferentes tipos e subtipos de canais para Ca⁺⁺. Adaptado de Catterall *et al.*, 2005.

Canal	Corrente	Localização	Antagonistas específicos	Funções celulares
Ca _v 1.1	L	Músculo esquelético; túbulos transversos	Dihidropiridinas; Fenil-alquilaminas; benzotiazepinas	Acoplamento excitação-contração
Ca _v 1.2	L	Miócitos cardíacos; miócitos musculares lisos; células endócrinas; corpos celulares neuronais; dendritos proximais	Dihidropiridinas; Fenil-alquilaminas; benzotiazepinas	Acoplamento excitação-contração; liberação de hormônios; regulação da transcrição; integração sináptica
Ca _v 1.3	L	Células endócrinas; corpos de células neuronais e dendritos; miócitos cardíacos atriais e células marca-passo; células ciliadas da cóclea	Dihidropiridinas; Fenil-alquilaminas; benzotiazepinas	Liberação de hormônios; regulação da transcrição; regulação sináptica; marca-passo cardíaco; audição; liberação de neurotransmissores de células sensoriais
Ca _v 1.4	L	Células da retina bastonetes e bipolares; cordão espinhal; glândula adrenal; mastócitos	Dihidropiridinas; Fenil-alquilaminas; benzotiazepinas	Liberação de neurotransmissores de fotoreceptores
Ca _v 2.1	P/Q	Nervos terminais e dendritos; células neuroendócrinas	ω-Agatoxina IVA	Liberação de neurotransmissores; Ca ⁺⁺ transitório dendrítico; liberação de hormônios
Ca _v 2.2	N	Nervos terminais e dendritos; células neuroendócrinas	ω-Conotoxina-GVIA	Liberação de neurotransmissores; Ca ⁺⁺ transitório dendrítico; liberação de hormônios
Ca _v 2.3	R	Corpos celulares neuronais e dendritos	SNX-482	Disparos repetitivos; Ca ⁺⁺ transitório dendrítico
Ca _v 3.1	T	Corpos celulares neuronais e dendritos; miócitos musculares cardíacos e lisos	Nenhum	Marca-passo; disparos repetitivos
Ca _v 3.2	T	Corpos celulares neuronais e dendritos; miócitos musculares cardíacos e lisos	Nenhum	Marca-passo; disparos repetitivos
Ca _v 3.3	T	Corpos celulares neuronais e dendritos	Nenhum	Marca-passo; disparos repetitivos

A presença de toxinas de aranhas bloqueadoras de canais para Ca^{++} foi sugerida a partir de estudos com a peçonha de *Agelenopsis aperta*, que causou um bloqueio pré-sináptico irreversível nas junções neuromusculares de drosófilas (Rash e Hodgson, 2002). Trabalhos posteriores com a peçonha de *A. aperta* resultaram na descoberta das ω -agatoxinas, uma família de peptídeos com massas moleculares entre 5 e 10 kDa que apresentam diferentes seletividades em canais para Ca^{++} (Uchitel, 1997). As ω -agatoxinas são os representantes de toxinas bloqueadoras de canais para Ca^{++} , e podem ser classificadas em quatro grupos: as do grupo I bloqueiam a transmissão nervo-músculo em insetos, mas não influenciam na ligação da ω -conotoxina GVIA (bloqueador de canais para Ca^{++} do tipo-L isolados de caramujos marinhos) aos sinaptossomos; as ω -agatoxinas do grupo II bloqueiam a transmissão nervo-músculo em insetos e inibem a ligação da ω -conotoxina GVIA aos sinaptossomos; ω -agatoxinas do grupo III inibem a ligação da ω -conotoxina GVIA, mas não agem na transmissão nervo-músculo em insetos e as do grupo IV são bloqueadoras seletivas de canais para Ca^{++} do tipo-P (Grishin, 1999). Um peptídeo do grupo ω -Agatoxina-IV, ω -Aga-IVA (figura 5-C) mostrou bloqueio seletivo em canais para Ca^{++} do tipo-P (K_d de aproximadamente 2 nM para tipo-P e aproximadamente 90 nM para tipo-Q) em sistemas de mamíferos (Mintz *et al.*, 1992). Todos os peptídeos desse grupo contêm 48 resíduos de aminoácidos estabilizados por quatro pontes dissulfeto (Grishin, 1999).

Um peptídeo isolado de *Grammostola spatulata*, ω -gramotoxina SIA (GsTxSIA), que possui 36 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto, bloqueia canais para Ca^{++} voltagem-dependentes dos tipos -N, -P e -Q, mas não bloqueia canais do tipo-L (Lampe *et al.*, 1993). Esse peptídeo foi originalmente identificado como um inibidor de canais para Ca^{++} voltagem-dependentes, porém também apresenta atividade em canais para K^+ com uma afinidade muito menor. Um peptídeo de 74 resíduos de aminoácidos isolado da peçonha de *Filistata hibernalis* nomeada DW13.3, bloqueia potencialmente todas as correntes de canais para Ca^{++} estudadas, com exceção dos canais tipo-T (Sutton *et al.*, 1998). O peptídeo SNX-325 (49 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto), isolado da peçonha de *Segestria florentina*, bloqueia canais do tipo-N em concentrações nanomolares, mas não bloqueia nenhum outro tipo de canal para Ca^{++} (Newcomb *et al.*, 1995). Similarmente, huwentoxina-I (HWTX-I) e

huwentoxina-X (HWTX-X) da peçonha de *Selenocosmia huwena* (agora *Haplopelma huwenum*), inibem canais para Ca^{++} do tipo-N e apresentam fracos efeitos em canais para Ca^{++} do tipo-L (Peng *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006).

Existem ainda toxinas isoladas da peçonha de aranhas que apresentam atividade bloqueadora em canais para Ca^{++} específicos de insetos. As ω -atracotoxinas, Hv1a – f, são uma família de neurotoxinas isoladas de *Hadronyche versuta* (Fletcher *et al.*, 1997), que bloqueiam canais para Ca^{++} voltagem-dependentes de insetos e não de vertebrados. É sugerido que a natureza da carga e as propriedades dos resíduos da região N-terminal desses peptídeos contribuam significativamente para o potencial inseticida das ω -atracotoxinas (Fletcher *et al.*, 1997; Corzo e Escoubas, 2003).

Foi descrita que GsMTx-4, uma toxina isolada de *Grammostola spatulata*, além de atuar em canais mecano-sensitivos, também interage com canais para Ca^{++} ativados por estiramento, facilitando a contratilidade cardíaca e mantendo sua frequência persistente por vários minutos mesmo após a morte do animal (Bowman *et al.*, 2007). Esse peptídeo também apresenta atividade antimicrobiana em concentrações micromolares (tabela 1).

1.5. Componentes proteicos

Independentemente da estratégia escolhida para formação da composição dos componentes, várias proteínas são geralmente encontradas na peçonha de aranhas. Dentre algumas proteínas estudadas nos quais homologias foram encontradas em banco de dados, várias são enzimas e proteínas de transporte, proteínas regulatórias, proteínas estruturais, e a maioria realiza funções intracelulares (Vassilevski *et al.*, 2009). Os componentes proteicos da peçonha de aranhas podem exercer efeito tóxico direto, agir como fatores de propagação de peçonha (enzimas que destroem estruturas teciduais), ou estar relacionadas com maturação de toxinas (Vassilevski *et al.*, 2009).

A peçonha de aranhas apresenta compostos com ações biológicas diferenciadas, como atividades: hemorrágica, neurotóxica, citotóxica; podendo causar, dermo/mionecrose, edema, hemólise, inflamação, agregação plaquetária e interferência na coagulação do plasma (Rash e Hodgson, 2002; Nagaraju *et al.*, 2006).

Muitas neurotoxinas e enzimas como hialuronidasas, proteases, fosfolipases D e esfingomielinasas têm sido isoladas e caracterizadas da peçonha de aranhas (Devaraja *et al.*, 2008). Aranhas reclusas do gênero *Loxosceles* apresentam em sua peçonha uma grande quantidade de componentes com massa molecular >10 kDa (Da Silveira *et al.*, 2002; Barbaro *et al.*, 2005), e contém um grande número de diferentes enzimas, dentre elas fosfatases, hialuronidasas, fosfolipases e diferentes proteases (Feitosa *et al.*, 1998; Barbaro *et al.*, 2005; Da Silveira *et al.*, 2007). Cerca de dez diferentes isoformas de esfingomielinase D, responsáveis pelos efeitos dermonecroticos da picada, foram identificadas em peçonhas de três espécies de *Loxosceles* usando investigações proteômicas (Machado *et al.*, 2005).

Existiram diversos relatos conflitantes em relação à presença de atividade proteásica detectada na peçonha de aranhas do gênero *Loxosceles*. Em 1973, Geren e colaboradores não detectaram atividade proteolítica utilizando caseína e hemoglobina como substrato na peçonha obtida a partir da dissecação da glândula. Em contrapartida, Jong e colaboradores (1979) detectaram atividade proteolítica na peçonha obtida por eletroestimulação da mesma aranha. Perret (1977) defendeu a hipótese de que a atividade proteolítica detectada foi decorrente de contaminação da peçonha com secreções digestivas no momento da eletroestimulação. Kuhn-Nentwig e colaboradores (1994) sustentaram essa hipótese ao não detectarem atividade proteolítica na peçonha cuidadosamente obtida das quelíceras de *Cupiennius salei*. Em oposição a essa hipótese, diversos trabalhos relataram o isolamento de metaloproteases e serino-proteases com atividades gelatinolítica, caseinolítica, fibronectinolítica e fibrinogenolítica na peçonha obtida por eletroestimulação e por meio da dissecação da glândula de diversas aranhas do gênero *Loxosceles* (Feitosa *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 2000b; Da Silveira *et al.*, 2002).

As aranhas do gênero *Latrodectus* (família Theridiidae), conhecidas como “viúva-negra”, estão entre as espécies de aracnídeos mais perigosos para o homem (Vetter e Isbister, 2008). Uma família de neurotoxinas de alta massa molecular (>100 kDa), as latrotoxinas, apresentam forte efeito tóxico contra diversos animais (Longenecker *et al.*, 1970). Proteínas semelhantes foram encontradas em peçonhas de aranhas do gênero *Steatoda* (Cavalieri *et al.*, 1987). Mais de 400 publicações tratam da

investigação das latrotoxinas e seus receptores. A mais bem estudada é a α -latrotoxina (α -LTX), que é eficaz contra vertebrados. Foi possível mostrar por meio de técnicas eletrofisiológicas que esta toxina causa a liberação exaustiva de neuromediadores das terminações nervosas dos vertebrados, resultando em bloqueio da transmissão do sinal.

Hialuronidase é um componente freqüente em peçonhas de aranhas (Rash e Hodgson, 2002; Kuhn-Nentwig *et al.*, 2004; Nagaraju *et al.*, 2007; Da Silveira *et al.*, 2007), incluindo aranhas da família Theraphosidae (Rocha e Silva *et al.*, 2009). As hialuronidases pertencem a um grupo de enzimas que naturalmente clivam ácido hialurônico e podem ser encontradas na peçonha de cobras, abelhas, escorpiões e lagartos (Meyer, 1971; Kreil, 1995). Agem principalmente como fator de espalhamento, facilitando a difusão de toxinas dentro da circulação sistêmica da presa. As metalo-proteases e hialuronidases são os principais componentes envolvidos no dano tecidual local e espalhamento gravitacional da peçonha, degradando proteínas e glicosaminoglicanos na matriz extracelular em torno de vasos sanguíneos e capilares (Xu *et al.*, 1982; Baramova *et al.*, 1989; Maruyama *et al.*, 1992; Girish *et al.*, 2002).

1.6. Potencial biotecnológico

Como consequência de sua alta seletividade, componentes isolados da peçonha de aranhas tem se revelado particularmente úteis para estudos *in vitro* e *in vivo*. No entanto, para aplicações terapêuticas, uma quantidade de questões associadas com segurança, farmacocinética e entrega, precisa ser resolvida. A otimização da entrega dos peptídeos aos alvos periféricos e centrais ajudará a determinar se esses peptídeos podem ou não ser candidatos para desenvolvimento de drogas. Ainda restam determinar quantos e quais peptídeos presentes em peçonhas podem realmente apresentar utilidade clínica. A tabela 3 mostra o estágio de desenvolvimento clínico de algumas drogas desenvolvidas a partir de componentes de peçonha isolados de diversos animais.

Acilpoliaminas que bloqueiam junções neuromusculares visam principalmente receptores ionotrópicos de glutamato e, devido ao seu pequeno tamanho e solubilidade aquosa, são candidatos promissores em estudos com esses receptores.

Uma vez que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, receptores de glutamato desempenham um papel importante na mediação da transmissão sináptica excitatória. O desenvolvimento de agonistas e antagonistas específicos a receptores ionotrópicos de glutamato têm potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos envolvidos com distúrbios neurológicos, mentais e psiquiátricos (Estrada *et al.*, 2007).

Como os insetos abrangem a maioria das presas de aranhas, e essa interação é altamente específica, as insetotoxinas vêm sendo apontadas como promissoras bioinseticidas na biotecnologia agrícola. A criação de vetores virais afetando insetos (por exemplo, com o uso de baculovírus) contendo genes de toxinas é de particular interesse porque nesse caso o problema da entrega da toxina ao seu alvo no organismo da vítima é resolvido automaticamente (Vassilevski *et al.*, 2009).

Quanto à presença de peptídeos antimicrobianos encontrados na peçonha de aranhas, diversos estudos vêm demonstrando que tais moléculas possuem atividade contra uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Kozlov *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2006; Budnik *et al.*, 2003; Haeberli *et al.*, 2000). Com o surgimento de linhagens de microorganismos resistentes aos antibióticos convencionais, cada vez se torna mais importante à busca por novas moléculas capazes de substituir de forma eficiente os antibióticos atualmente utilizados no mercado. O controle dessa resistência depende diretamente do desenvolvimento de novos medicamentos. Nesse contexto, a pesquisa, a purificação, e a caracterização química, biológica e estrutural de novas substâncias antimicrobianas são de grande valia, uma vez que a própria evolução tratou de selecionar um vastíssimo espectro de substâncias eficientes que defendem contra infecções (Daffre *et al.*, 2001).

Tabela 3. Drogas desenvolvidas a partir de toxinas animais.

Espécie	Medicamento	Princípio Ativo	Empresa	Ação	Estágio	Fonte
<i>Bothrops jararaca</i> (serpente)	Capoten	Captopril	Par Pharm	Inibidor de ACE (anti-hipertensivo)	Aprovada em 1981	Food and Drug Administration
<i>Sistrurus m. barbouri</i> (serpente)	Integrilin	Eptifibatide (barbourina)	Schering	Inibidor de integrina (anti-trombose)	Aprovada em 1998	Food and Drug Administration
<i>Agkistrodon rhodostoma</i> (serpente)	Viprinex™	Ancrod	RxMed	Cliva fibrinogênio (usado no tratamento de derrames)	Fase III	ClinicalTrials.gov
<i>Pseudonaja textilis</i> (serpente)		Textilina-1	QRxPharma	Inibidor de plasmina - Antifibrinolítico (anti-hemorrágico)	Aguarda testes clínicos	QRxPharma
<i>Bothrops atrox</i> (serpente)	Baquting	Batroxobina	Nuokang	Hemocoagulase (anti-hemorrágico)	Aguarda aprovação do FDA	QRxPharma
<i>Conus marmoreus</i> (gastrópode)	XEN2174	χ -MrIA	Xenome Ltd.	Inibidor de transportador de noradrenalina (tratamento da dor neuropática – mais eficiente que morfina)	Fase II	Martin <i>et al.</i> 2009; Brust <i>et al.</i> , 2009
<i>Conus magus</i> (gastrópode)	Prialit	ω -conotoxina MVIIA	Elan Pharms	Inibidora de canal de cálcio Ca _v 2.2 (tratamento da dor crônica severa inflamatória e neuropática de câncer e AIDS)	Aprovado em 2004	Food and Drug Administration
<i>Heloderma suspectum</i> (monstro de Gila)	Byetta	Exenatide	Amylin Pharms Inc.	Peptídeo glucagon-símile-1 (tratamento de diabetes tipo 2)	Aprovado em 2005	Food and Drug Administration
<i>Grammostola spatulata</i> (aranha)	-	GsMTx-4	-	Inibidor de canais mecano-sensitivos (tratamento da dor, arritmia cardíaca, distrofia muscular, atividade antimicrobiana, etc)	-	Bowman <i>et al.</i> 2007; Park <i>et al.</i> 2008

1.7. *Nhandu coloratovillosus* (Schmidt, 1998)

A família Theraphosidae compreende 116 gêneros e mais de 900 espécies (Platnick, 2010), com distribuição principalmente em áreas tropicais e semi-tropicais, e encontradas em áreas secas e úmidas, savanas, desertos e ambientes semi-temperados (Escoubas e Rash, 2004). Estas aranhas, referidas em muitas partes do mundo como caranguejeiras, são popularmente conhecidas devido ao seu grande porte.

O gênero *Nhandu* foi descrito na década de 80 (Lucas, 1983) e apresenta cinco espécies: *N. carapoensis*, *N. cerradensis*, *N. chromatus*, *N. vulpinus* e *N. coloratovillosus*. *Nhandu coloratovillosus* (figura 6) é uma aranha caranguejeira endêmica do Brasil sendo encontrada na região centro-norte do país, com registros nos estados do Pará, Tocantins, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e habita regiões de cerrado com influências amazônicas (Bertani, 2001).



Figura 6. Fêmea de *Nhandu coloratovillosus*.

2. Justificativa

A busca por novos componentes na peçonha de aranhas que apresentem características e propriedades desejáveis para a criação de novas drogas e inseticidas é de extrema importância. A peçonha de apenas cerca de uma centena de espécies de aranhas, algo em torno de 0,25% das espécies conhecidas, foi estudada. Devido ao pequeno tamanho de muitas aranhas, pouca ou nenhuma quantidade de suas peçonhas é obtida. Esta é uma das razões pela escassez ou completa ausência de informação sobre peçonhas de membros de muitas famílias. Para investigações mais amplas, métodos padronizados de fracionamento e análise estrutural de componentes ativos precisam ser otimizados, e novas tecnologias são necessárias. A abordagem que combina métodos genéticos (obtenção de cDNA de glândulas de peçonha) e proteômica ou peptidômica (baseadas em cromatografia analítica e espectrometria de massa) é promissora nesse aspecto.

O Brasil é um país de grande extensão que abriga uma das maiores biodiversidades de fauna do Planeta. Ainda assim, pouco se sabe sobre as peçonhas de aranhas caranguejeiras brasileiras. A caracterização de componentes bioativos presentes na peçonha destas aranhas pode levar a ferramentas atraentes para a compreensão de bases moleculares e da seletividade destas toxinas em nível de receptores, bem como de mecanismos fisiológicos. Assim, é possível a exploração como potencial para o desenvolvimento de novos terapêuticos como inseticidas mais eficientes e seguros, e fármacos com propriedades neuroprotetoras e analgésicas.

O presente trabalho se trata do primeiro estudo com caracterização de componentes bioativos da peçonha da aranha caranguejeira brasileira *Nhandu coloratovillosus*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo identificar a composição química da peçonha bruta de *Nhandu coloratovillosus*, buscando verificar a presença de diferentes atividades biológicas.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a composição peptídica/proteica da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* por meio de RP-HPLC, espectrometria de massa e perfil protéico em SDS-PAGE unidimensional;
- Avaliar as atividades antimicrobiana, hemolítica, proteolítica, hialuronidásica e neurotóxica da peçonha bruta de *N. coloratovillosus*;
- Isolar, purificar e identificar peptídeos com possíveis atividades presentes na peçonha bruta de *N. coloratovillosus*.

4. Material e Métodos

4.1. Reagentes químicos

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

4.2. Animais e coleta

Indivíduos adultos de *Nhandu coloratovillosus* (figura 6) foram coletados sob licença do IBAMA no estado do Tocantins e mantidos em cativeiro no Laboratório de Aracnologia, sob coordenação do professor Paulo César Motta. Os animais foram alimentados regularmente, aproximadamente uma vez ao mês, com camundongos neonatos (*Mus musculus*) e insetos.

4.3. Extração e quantificação da peçonha

A peçonha de exemplares adultos de *N. coloratovillosus* (ambos os sexos) foi obtida por meio de estimulação elétrica (aproximadamente 100 V, baixa corrente e pulsada) da região basal das quelíceras. A peçonha foi coletada individualmente em água destilada com o auxílio de tubos de polietileno tipo eppendorff, de acordo com Estrada *et al.* (2007). Estas amostras foram imediatamente congeladas e liofilizadas. A quantificação da peçonha bruta foi realizada pelo método de microdosagem de proteínas de Bradford (1976) medindo-se a absorbância em 595 nm.

4.4. Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida 12% (SDS-PAGE)

Gel de poliacrilamida 12% foi preparado entre placas de vidro utilizando o sistema de eletroforese Mini-PROTEAN III (Bio-Rad), seguindo o método de Laemmli (1970). O gel separador foi elaborado para o volume total de 5 mL, sendo composto por 2 mL de acrilamida 30%, 1,25 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 1,645 mL de Água Milli-Q, 50 µL de SDS 10%, 50 µL de PSA 10% e 5 µL de TEMED. O gel concentrador 4% (constituído por 266,7 µL de acrilamida 30%, 500 µL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 1,192 µL de Água MiliQ, 20 µL de SDS 10%, 20 µL de PSA 10% e 2 µL de TEMED) foi preparado em um volume total de 2 mL e polimerizado sobre o separador entre as placas de vidro juntamente com o pente.

Após a polimerização, 20 µL da peçonha bruta fresca (40 µg) de *N. coloratovillosus* foi misturado a 5 µL de tampão de amostra 5x (Tris-HCl 312,5 mM pH 6,8, SDS 10%, Glicerol 50%, 0,05 mg/mL de azul de bromofenol) com ou sem 25% de β-mercaptoetanol. Amostras reduzidas ou não e/ou fervidas ou não foram aplicadas no gel. O marcador de massa molecular BenchMark (Invitrogen) consiste de uma mistura de proteínas artificialmente produzidas com massas moleculares conhecidas entre 10 e 200 kDa. A eletroforese foi realizada com tampão Tris-Glicina (Tris 25 mM e Glicina 192 mM, pH 8,3), sob corrente constante de 150 V a 25 °C por 16 h.

4.4.1. Coloração com Azul de Coomassie G250

Ao final da eletroforese, os géis foram corados com solução de Azul de Coomassie G250 0,25% (p/v) em 45% de metanol (v/v) e 10% de ácido acético (v/v) por 30 min, e descorados com solução descorante (metanol e ácido acético nas mesmas proporções da solução corante).

4.4.2. Coloração com Nitrato de Prata

A coloração com nitrato de prata ocorreu de acordo com Blum *et al.*, 1987. Primeiramente o gel foi fixado com metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formaldeído 0,05% (v/v) por 1 h. Em seguida, foi incubado em etanol 50% (v/v) três vezes por 20 min e sensibilizado por tiosulfado de sódio 0,01% (p/v) por 1 min. A sensibilização foi seguida de lavagem em água Milli-Q por 1 min e impregnação com solução de nitrato de prata 0,1% (v/v) e formaldeído 0,075% (v/v) por 30 min. Finalmente o gel foi lavado com água Milli-Q duas vezes por 20 seg e revelado em sala escura com carbonato de sódio 6% (p/v), formaldeído 0,05% (v/v) e tiosulfato de sódio 0,27% (p/v). A reação foi interrompida incubando-se o gel em solução metanol 50% (v/v) e ácido acético 12% (v/v) até o surgimento das bandas.

4.5. Zimogramas SDS-PAGE

4.5.1. Caseinolítico e Gelatinolítico

SDS-PAGE 8% foi preparado de acordo com o método de Laemmli (1970). Alíquotas de 20 µL da peçonha bruta fresca (40 µg) de *N. coloratovillosus* (reduzidas ou não e/ou fervidas) foram misturadas ao tampão de amostra 5x (Tris-HCl 312,5 mM pH 6,8, SDS 10%, Glicerol 50%, 0,05 mg/mL de azul de bromofenol) e aplicadas em gel

SDS-PAGE 8% contendo 0,1% (p/v) de gelatina ou caseína como substrato para atividade proteolítica. A eletroforese ocorreu a 4° C, em aparelho Mini-PROTEAN III (BioRad), sob voltagem constante de 90 V. Após a corrida, os géis foram submetidos a cinco lavagens de 15 min em 2,5% (v/v) de Triton X-100 para remover traços de SDS. Finalmente, foram lavados com água destilada para remover o excesso de Triton X-100 e incubados a 25° C por 16 h em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 sob constante agitação.

Os géis foram corados e descorados como descrito anteriormente (coloração em Coomassie Brilliant Blue G250) para revelar bandas onde houve atividade gelatinolítica ou caseinolítica. A digestão da gelatina e da caseína foi identificada como zonas claras contra o fundo corado em azul.

4.5.2. Hialuronidásico

A atividade hialuronidásica foi verificada em gel SDS-PAGE 12% como descrito anteriormente, contendo 0,14% de ácido hialurônico como substrato para atividade enzimática, utilizando com modificações o método de Miura e colaboradores (1995). O gel foi lavado com água destilada para remover o excesso de Triton X-100 e incubado em tampão de atividade contendo Tris-HCl 20 mM pH 7,4 com 0,5 mM de CaCl₂ por 16 h a 37° C sob constante agitação e em seguida corado com 0,5% de Alcian Blue em 25% de metanol e 10% de ácido acético. A digestão do ácido hialurônico foi identificada como zonas claras contra o fundo corado em azul.

4.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa (RP-HPLC)

4.6.1. Fracionamento da peçonha bruta

Alíquotas (1 mg) da peçonha bruta (ambos os sexos) de *N. coloratovillosus* liofilizadas foram ressuspensas em 100 µL de solução aquosa de 0,12% de TFA/água (v/v) e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi aplicado em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC) Shimadzu Co. (Kioto, Japan) série LC10A; equipado com arranjo de diodo SPD-M10A em coluna analítica C18 Shim-pack CLC-ODS (4,6 mm x 250 mm). A eluição foi realizada com gradiente binário de solventes: A - Solução aquosa de TFA 0,12% e B - Solução de acetonitrila e TFA 0,1% (v/v) com fluxo de 1 mL/min (Chen *et al.*, 2004). O gradiente

teve início com 0% de B por 10 minutos; seguido de 0 a 60% de B em 60 minutos; 60 a 100% de B em 10 minutos; 100% de B por 10 minutos e 100 a 0% de B em 5 minutos; com monitoramento em 216 e 280 nm. As frações foram manualmente coletadas, secadas a vácuo e armazenadas a -20 °C.

4.6.2. Purificação dos peptídeos

As frações de interesse passaram por processo de recromatografia em sistema de RP-HPLC em coluna analítica C18 Phenomenex Luna 3u 100 A (4,6 mm x 150 mm). O gradiente utilizado variou de acordo com o tempo de retenção de cada fração. A eluição foi realizada com fluxo de 1 mL/min e detecção UV a 216 e 280 nm. As frações manualmente coletadas foram liofilizadas.

4.7. Quantificação das frações purificadas

A quantificação das frações purificadas foi realizada medindo-se a absorvância do material em 280 nm com o auxílio de espectrofotômetro (modelo), assumindo que uma unidade de absorvância em uma cubeta de quartzo de 1 cm equivale a 1 mg/mL de concentração proteica (Caliskan *et al.*, 2006).

4.8. Ensaio antimicrobiano

4.8.1. Ensaio preliminar

Para verificar a presença de frações cromatográficas ativas contra microorganismos, foi realizado um ensaio antimicrobiano inicial em placa multi-poços (Nunc F96, Denmark) utilizando duas corridas de cada fração majoritária (ou grupo de frações) contra as bactérias patogênicas Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922) e Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), baseado no protocolo proposto por Nascimento *et al.* (2007). Primeiramente estas bactérias foram crescidas em 5 mL de meio Mueller-Hinton a 37 °C sob agitação até a densidade óptica igual a 1 a 590 nm. As bactérias, em fase logarítmica de crescimento, foram então diluídas em meio Mueller-Hinton nas proporções 1:50 para Gram-negativa e 1:100 para Gram-positiva. Uma alíquota de 50 µL de cada cultura bacteriana (contendo aproximadamente 1.10^5 células/mL) foi incubada (por 22h a 37 °C) com 50 µL de cada fração. O crescimento e inibição bacteriana foram determinados pela leitura da densidade óptica a 595 nm com uma leitora de placa BioRad (Modelo 3550-UV, Hercules, CA, USA).

4.8.2. Determinação de MIC

A mesma metodologia descrita acima foi utilizada para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC), ou seja, a menor concentração onde nenhum crescimento bacteriano é detectado por meio de leitura espectrofotométrica da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* e da fração purificada que apresentou maior atividade antimicrobiana. Para a peçonha bruta de *N. coloratovillosus* foi adotada uma diluição seriada partindo-se de uma concentração inicial de 1024 µg/mL. Para a fração purificada RF20, a concentração inicial utilizada foi de 128 µM. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9. Ensaio hemolítico

4.9.1. Ensaio preliminar

Foi realizada uma varredura para detectar atividade hemolítica com a peçonha bruta de *N. coloratovillosus* e com duas corridas de cada fração cromatográfica majoritária (ou grupo de frações), de modo a determinar seu HC₅₀, ou seja, a concentração capaz de provocar hemólise em 50% das hemácias presentes na preparação.

De acordo com o protocolo utilizado por Castro e colaboradores (2005), as células foram separadas do plasma por centrifugação e então foi preparada uma suspensão de 1% de eritrócitos do sangue humano O⁺ obtidos no Hemocentro de Brasília (previamente lavado três vezes com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 contendo NaCl 150 mM). Cada amostra, que correspondeu a duas corridas de cada fração majoritária (ou grupo de frações) foi suspensa em 75 µL do tampão salino e adicionadas a tubos de polietileno com 75 µL da solução de hemácias. Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 2 min. Uma alíquota de 100 µL de cada sobrenadante foi transferida para uma placa multi-poços (Nunc F96, Denmark) e a leitura se deu a 405 nm em leitora de placas (BioRad Modelo 3550-UV, Hercules, CA, USA). Para controle do experimento foi utilizado 1% (v/v) da suspensão de eritrócitos incubados com 0,1% (v/v) de Triton X-100 como referência de 100% de lise e 1% (v/v) da suspensão de eritrócito com tampão salino como referência de 0% de hemólise. Para determinação da HC₅₀ da peçonha bruta de *N. coloratovillosus*, o mesmo protocolo descrito acima foi

empregado, sendo que foi adotada uma diluição seriada partindo-se de uma concentração inicial de 1,5 mg/mL. Cada experimento foi realizado em triplicata.

4.10. Ensaio farmacológico em nervo periférico de anfíbio (*Sucrose Gap*)

A técnica de *Sucrose Gap* permite o registro preciso do potencial de ação composto de nervos periféricos. A amplitude dos potenciais registrada está diretamente relacionada com a atuação de uma determinada toxina com canais iônicos expressos em axônios de nervos periféricos, particularmente em canais para Na⁺ e para K⁺ voltagem-dependentes (predominantemente canais para Na⁺). Esses são responsáveis pela geração do potencial de ação nas membranas de neurônios e de quase todas as células excitáveis.

O experimento foi realizado utilizando nervo ciático isolado de rã (*Lithobates catesbeianus*) com modificações da técnica descrita por STRONG e colaboradores (1973). As duas primeiras câmaras (figura 7-D) receberam a estimulação supramaximal, que consistiu de pulsos de voltagem (6 – 7 V) com duração de 25 µs, gerado por estimulador S8 (*Grass Instruments*) (figura 7-A). Esses parâmetros são utilizados para estimulação seletiva de fibras mielinizadas de condução rápida, provocando resposta elétrica homogênea. A quarta câmara, com volume de 400 µL, é perfundido com solução Ringer ou com a substância a ser testada. Este é separado da quinta câmara, contendo 400 µL de solução de sacarose renovada constantemente durante todo o ensaio. Em todas as outras câmaras o nervo é submerso em solução Ringer. A diferença de potencial entre a terceira câmara contendo solução-teste e a quinta câmara é medida por meio de um amplificador diferencial de alta impedância e com ganho de voltagem de 50 vezes (figura 7-B), acoplado a um osciloscópio digital Tektronic TDS 360 (figura 7-C).

O ensaio eletrofisiológico ocorreu em temperatura ambiente, utilizando: solução fisiológica para anfíbios (Ringer) 111 mM de NaCl, 1,9 mM de KCl, 2,4 mM de NaHCO₃ e 1,1 mM de CaCl₂ e solução não-iônica composta por sacarose 216 mM.

Os registros foram realizados após 10 min de aplicação da amostra e após 30 min de lavagem com solução Ringer. Esses registros foram comparados com o registro controle, obtido antes da aplicação das amostras.

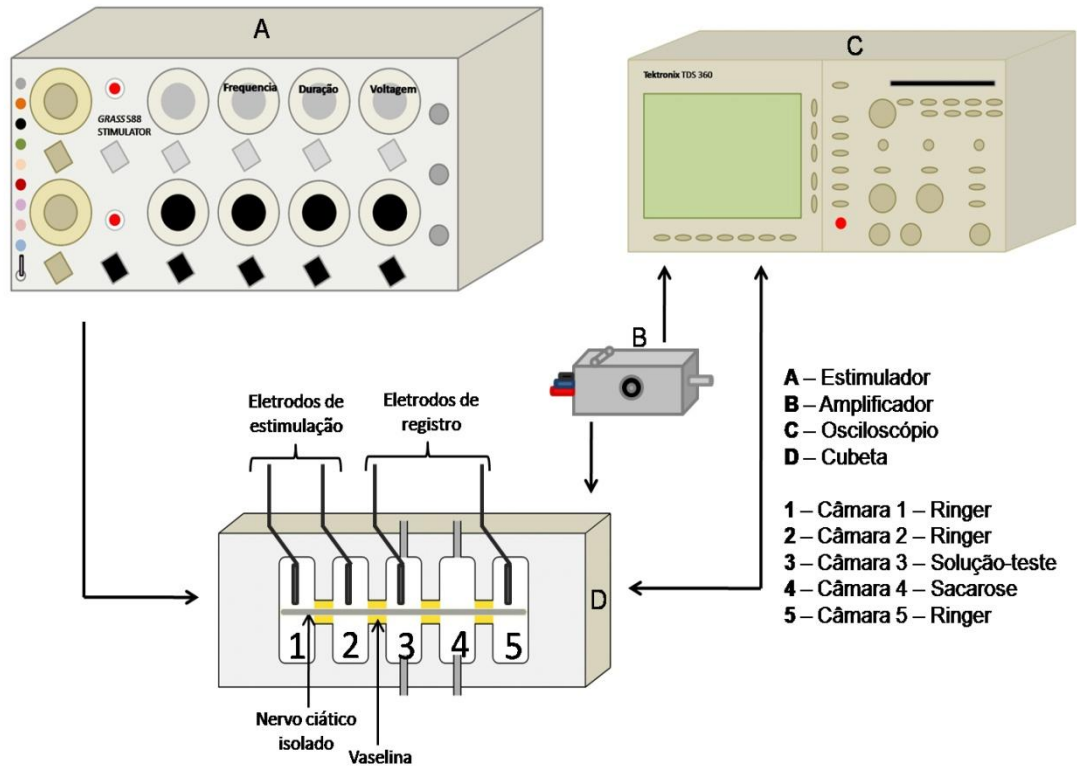


Figura 7. Modelo esquemático da preparação do ensaio farmacológico com nervo periférico de anfíbio (Sucrose Gap). O nervo ciático isolado de *L. catesbeianus* foi colocado na canaleta que percorre as cinco câmaras, isoladas mecânica e eletricamente entre si por selos de vaselina. O impulso nervoso é gerado nas câmaras 1 e 2 e captado nas câmaras 3 e 5. O potencial de ação composto se propaga através da câmara, que está preenchida por solução de sacarose 216 mM. As câmaras 3 e 4 possuem sistemas de perfusão podendo ser constantemente lavadas. As amostras são aplicadas na câmara 3.

4.11. Ensaio cardiotóxico

A atividade cardiotóxica foi realizada utilizando um macho adulto de *Lithobates catesbeianus*. O animal foi espinhalado, decerebrado, e seu coração isolado. Uma fina fatia foi cortada do ventrículo e imersa em solução Ringer para anfíbios sendo constantemente aerada. A contração no coração foi constantemente registrada em polígrafo (NARCO Bio Systems) e estimulada eletricamente por meio de um estimulador S8 (Grass Instruments) nas condições de 100 V (voltagem), 3,0 ms (duração do estímulo) e 0,4 Hz (frequência). A atividade cardíaca foi registrada e analisada no momento em que a preparação recebeu cada uma das amostras testadas.

4.12. Redução e alquilação

As frações purificadas por RP-HPLC foram dissolvidas em 100 µL de tampão desnaturante (cloridato de guanidina 6,0 M + Tris-HCl 0,3 M em pH 8,6) adicionado de DTT (na proporção de 1,5 mg de DTT para cada 1,0 mL de tampão desnaturante). As

amostras foram incubadas sob agitação constante de 300 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf) durante 1 h à 37 °C. Após esse período, 4 µL de 4-vinilpiridina foram adicionados sob atmosfera de nitrogênio. As toxinas foram novamente incubadas a 37 °C, sob agitação constante de 300 rpm durante 1 h.

Após a redução e alquilação das amostras, cada fração foi dessalinizada utilizando-se coluna de fase reversa em sistema de HPLC com coluna C4 Vydac 4.6 x 150 mm/5 µm, equilibrada previamente com TFA 0,1% (v/v) com fluxo de 1 mL/min e detecção em 216 nm.

4.13. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de peptídeos de maior massa molecular se faz necessária como uma alternativa para complementar o sequenciamento por MS/MS, PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*) e sequenciamento N-terminal por degradação de Edman.

Para realização do *Peptide Mass Fingerprinting*, após redução e alquilação, o peptídeo purificado de interesse foi submetido à hidrólise enzimática com tripsina em tampão de atividade (50 mM NH₄HCO₃, 2 mM CaCl₂, pH 8,6) por 16 h à 37 °C. A razão de enzima/substrato utilizada foi de 1:50 (v/v) em um volume final de 50 µL. Com o intuito de se obter digestões parciais que pudessem auxiliar na obtenção da sequência do peptídeo, alíquotas de 3 µL foram retiradas a cada 30 minutos e tiveram suas reações interrompidas com TFA 0,05%. Em seguida, aplicou-se 1 µL de cada alíquota em uma placa AncorchipTM dissolvidas em matriz ácido α-ciano 4-hidroxi-cinâmico.

O sequenciamento N-terminal por degradação de Edman foi realizado pela Dra. Isabel de Fátima Correia Batista, pesquisadora do Laboratório de Bioquímica e Biofísica – Instituto Butantan. Para o sequenciamento N-terminal por degradação de Edman, o peptídeo purificado de interesse já reduzido e alquilado, foi digerido com a endoproteínase Glu-C de *Staphylococcus aureus* V8 (Sigma Chemical Co.) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 por 16 h à 37 °C. A razão de enzima/substrato utilizada foi de 1:50 (v/v) em volume final de 24 µL. Os peptídeos gerados após digestão com SV8 foram fracionados por RP-HPLC usando coluna C4 (250 x 4.6 mm, Vydac).

4.14. Espectrometria de Massa e Sequenciamento De Novo

Espectrometria de Massa em sistema MALDI-TOF/TOF (AutoFlex II, Bruker Daltonics, Karlsruhe, Alemanha), operando no modo refletor ou linear positivo, foi realizado para a inspeção de massas moleculares (MS) e para fragmentação das amostras de interesse (MS/MS). Para MALDI-TOF as frações foram dissolvidas em uma matriz saturada ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico dissolvida em acetonitrila/água/3% de ácido trifluoroacético (2,5/2/0,5).

4.15. *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF)

Os peptídeos resultantes da digestão com tripsina em solução foram submetidos primeiramente à técnica de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) usando espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF (AutoFlex II, Bruker Daltonics, Karlsruhe, Alemanha). A amostra (1 μ L) foi aplicada numa placa AnchorchipTM seguido, depois de seca, por 0,5 μ L de solução matriz (5 mg/mL de ácido 2,5-diidroxibenzóico em 30% de acetonitrila, 0,1% de TFA) e seco antes da análise. O aparelho foi usado com extração tardia de íons e no modo refletor. As massas moleculares foram avaliadas num intervalo de 700 a 4000 m/z. A identificação de proteínas foi realizada por meio de buscas usando o *software* MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) contra o banco de dados não redundante NCBI, com tolerância de erro de 100 ppm e até no máximo um sítio de clivagem enzimática perdido por peptídeo. As proteínas que não puderam ser identificadas por PMF foram submetidas à fragmentação/seqüenciamento por espectrometria de massa (*Peptide Fragment Fingerprinting* - PFF) utilizando o mesmo equipamento sendo operado no modo LIFT, que permite a seleção durante o vôo de um dentre os variados peptídeos para fragmentação. Neste caso foi adicionado ao mesmo poço, já com a amostra, 1 μ L da solução com 0,5 mg/mL de ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico em 0,1% de TFA e 90% de acetonitrila) e a identificação foi realizada também com o *software* MASCOT. Tanto para o PMF quanto para o PFF foi considerado a piridietilação de cisteínas como modificação fixa e a oxidação de metioninas como modificação variável.

4.16. Degradação de Edman e Sequenciamento N-terminal

Após a determinação das massas moleculares e do grau de pureza, os peptídeos formados após digestão com a endoproteínase Glu-C de *Staphylococcus*

aureus V8 (Sigma Chemical Co.) foram sequenciados automaticamente pelo método de degradação de Edman (realizado pela Dra. Isabel de Fátima Correia Batista, pesquisadora do Laboratório de Bioquímica e Biofísica – Instituto Butantan). A determinação da estrutura primária dos peptídeos por meio de seqüenciamento automático N-terminal foi realizada no sequenciador modelo PPSq-21 (Shimadzu). O sistema cromatográfico foi calibrado com PTH aminoácidos padrões antes de cada análise. Buscas por similaridade foram realizadas por meio dos programas Fasta3 sob o servidor Expasy (*Expasy Molecular Biology Server*; <http://www.expasy.org>) e BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Outros programas como Clustal foram utilizados para o alinhamento das seqüências e comparação das substituições de aminoácidos.

O esquema geral da estratégia experimental adotada nesse trabalho é ilustrado na figura 8.

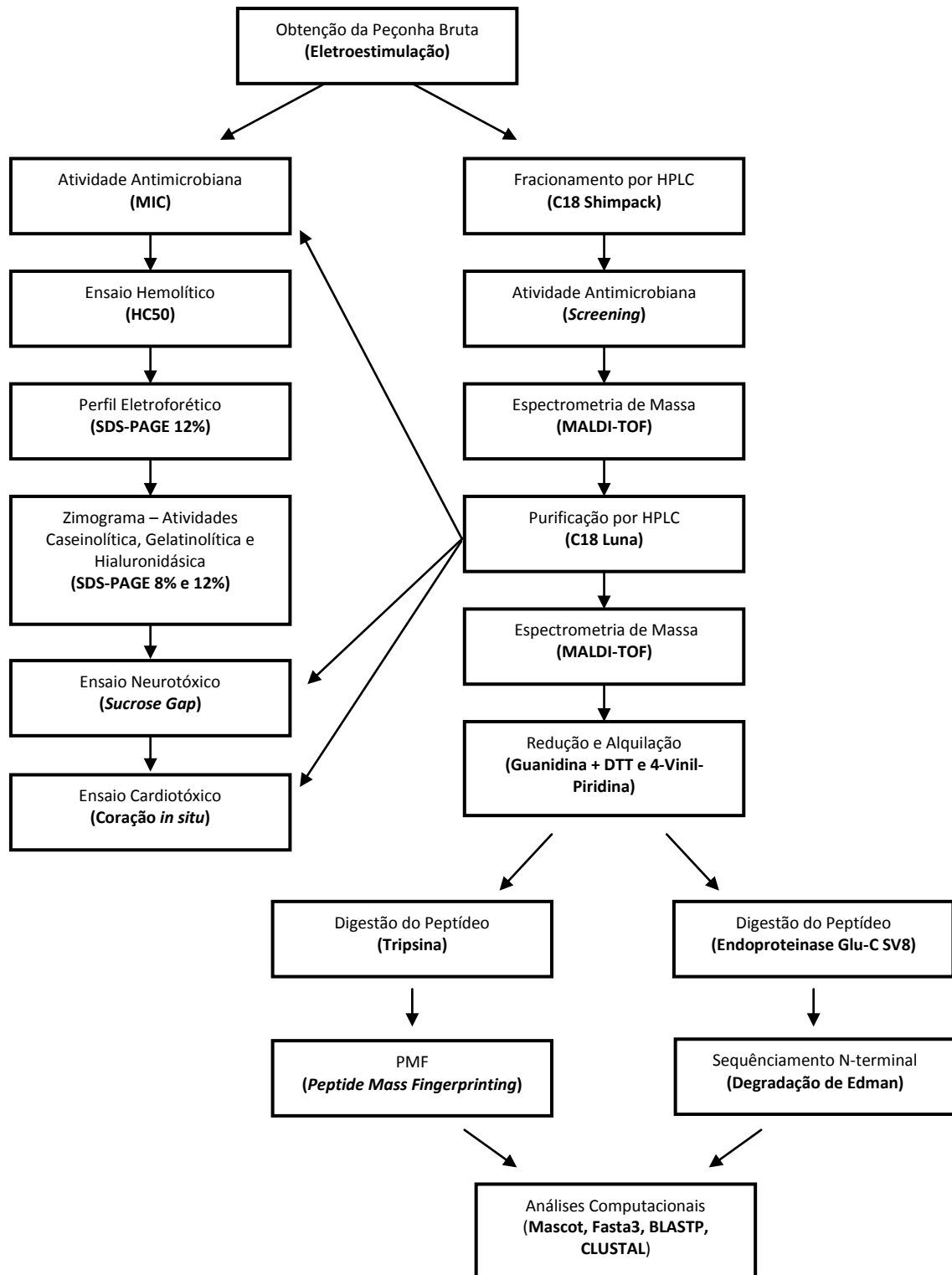


Figura 8. Esquema geral da estratégia experimental adotada no isolamento e caracterização de componentes bioativos na peçonha de *N. coloratovillosus*.

5. Resultados

5.1. Fracionamento cromatográfico e análises por Espectrometria de Massa

A peçonha bruta de *N. coloratovillosus* foi fracionada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC) e produziu perfis reproduzíveis, resultando na eluição de 35 frações. As frações em destaque na figura referem-se àquelas que apresentaram algum tipo de atividade biológica (figura 9).

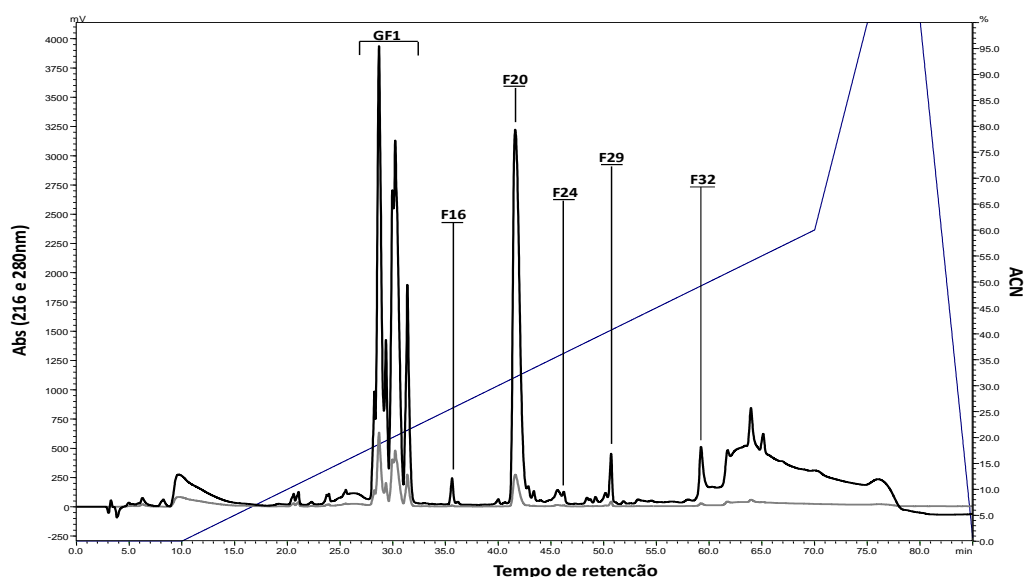


Figura 9. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da peçonha bruta de *N. coloratovillosus*. Fracionamento por RP-HPLC, coluna analítica C18 Shim-pack CLC-ODS (4,6 mm x 250 mm). As frações cromatográficas foram monitoradas em 216 nm (linha preta) e 280 nm (linha cinza).

O perfil cromatográfico obtido de 1 mg de peçonha bruta, em coluna C18 de fase reversa foi similar entre as peçonhas brutas de machos e fêmeas de *N. coloratovillosus*, revelando diferenças apenas quantitativas entre as frações, como é mostrado na figura 10.

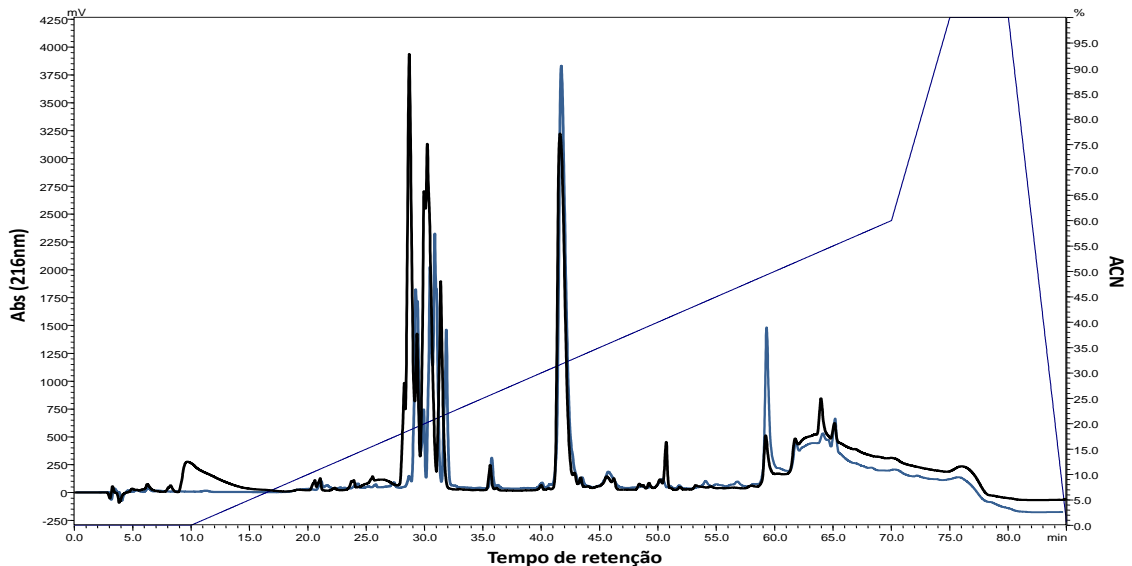


Figura 10. Sobreposição do perfil cromatográfico de 1 mg de peçonha bruta de fêmeas (preto) e machos (azul) de *N. coloratovillosus*. Fracionamento por RP-HPLC, coluna analítica C18 Shim-pack CLC-ODS (4,6 mm x 250 mm).

O perfil de massas moleculares característico da peçonha de *N. coloratovillosus* foi obtido por meio de análises de espectrometria de massa em sistema MALDI-TOF de cada uma das frações cromatográficas obtidas no primeiro fracionamento. A tabela 4 apresenta todos os 46 componentes detectados, separados por faixas de massa (m/z).

As massas detectadas (m/z) em cada uma das 35 frações cromatográficas foram agrupadas (tabela 5). Destaca-se a abundância na faixa 500-999 m/z , um total de 16 componentes, representando mais de 30% do total de massas moleculares observadas (figura 11).

Tabela 4. Massas obtidas nas frações cromatográficas em fracionamento por RP-HPLC da peçonha bruta de *Nhandu coloratovillosus*. Dados obtidos a partir de análise utilizando espectrômetro de massa MALDI-TOF, nos modos refletor (matriz α -ciano 4-hidroxi-cinâmico) e linear (matriz ácido sinapínico) com intervalo de faixa de 500 a 20000 m/z.

500-999	1000-1499	1500-1999	2000-2499	2500-2999	3000-3499	3500-3999	4000-4499	4500-4999	5000-5499	5500-5999	6000-6499	6500-6999	7000-7499	7500-7999	8000-8499
580,60			2017,18		3162,11	3947,91		4714,16	5132,77	5664,21		6701,64	7016,97		8330,70
601,21			2099,28		3363,19	3950,01		4737,10	5209,68	5686,94		6907,40	7253,32		
615,51			2198,29			3983,68			5225,55	5883,95		6988,69			
653,68			2333,91						5375,43	5902,06					
657,36			2356,77						5473,71						
662,26									5478,66						
708,82									5488,80						
729,23									5489,19						
774,17															
785,71															
788,83															
841,78															
844,76															
847,68															
902,70															
905,55															

Tabela 5. Massas obtidas por fração cromatográfica em fracionamento por RP-HPLC da peçonha bruta de *N. coloratovillosus*. Dados obtidos a partir de análise utilizando espectrômetro de massa MALDI-TOF, nos modos refletor (matriz α -ciano 4-hidroxi-cinâmico) e linear (matriz ácido sinapínico), com intervalo de faixa de 500 a 20000 m/z.

Fração	Massa Molecular (m/z)								
1	ND								
2	ND								
3	ND								
4	ND								
5	ND								
6	ND								
7	662,26								
8	ND								
9	580,60	601,21	708,82						
10	601,21	729,23	785,71	847,68					
11	601,21	653,68	657,36	729,23	785,71	788,83	841,78	844,76	902,70
12	601,21	729,23							
13	601,21	653,68	729,23	785,71					
14	601,21	729,23							
15	601,21	615,51	657,36	774,17	905,55				
16	2356,77	6701,64	6907,40						
17	7093,17								
18	5132,77	5902,06							
19	4737,10	5209,68	5225,55	5375,43	5883,95				
20	5478,66	5686,94							
21	2017,10	2744,40	5478,66						
22	5489,19	5664,21	6988,69						
23	3950,01	5488,80							
24	3363,19	3947,91	8330,70						
25	3363,19	3947,91	8330,70						
26	2099,28	2198,29							
27	2198,29								
28	2198,29	2333,91							
29	2333,91	7253,32							
30	ND								
31	4714,16	3983,68	3162,11						
32	ND								
33	ND								
34	ND								
35	ND								

ND – Não-detectado.

Em negrito destacam-se os dois componentes mais abundantes e freqüentes de GF1.

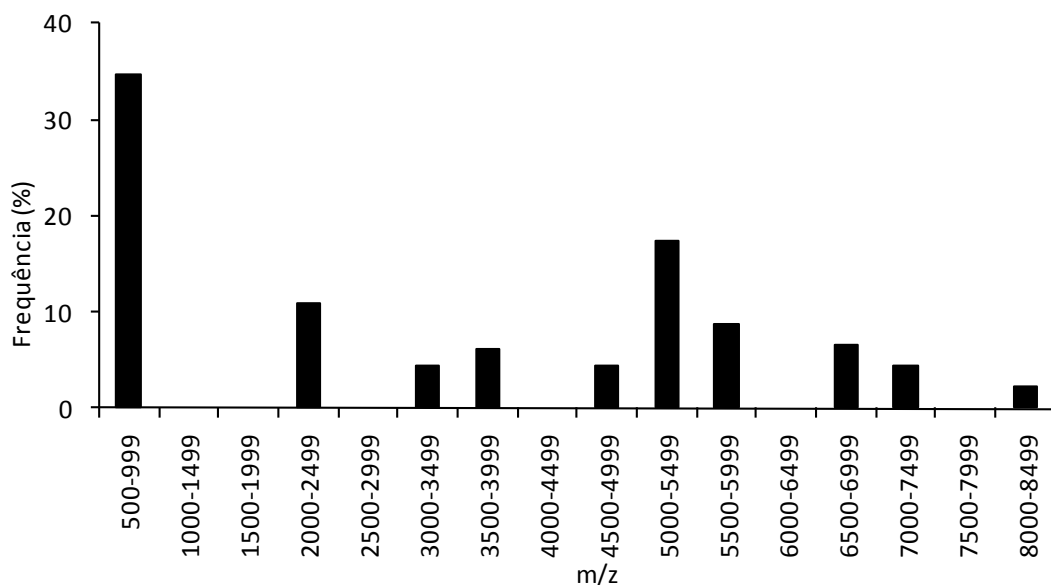


Figura 11. Frequência dos componentes de massas obtidas das frações cromatográficas da peçonha de *N. coloratovillosus*. Dados obtidos a partir de análise utilizando espectrômetro de massa MALDI-TOF, nos modos refletor (matriz α -ciano 4-hidroxi-cinâmico) e linear (matriz ácido sinapínico) com intervalo de faixa de 500 a 20000 m/z.

A figura 12 mostra a distribuição de massas moleculares encontradas na peçonha de *N. coloratovillosus* por MALDI-TOF em relação ao tempo de retenção e porcentagem de acetonitrila necessária para a eluição em sistema RP-HPLC. Todas as frações observadas apresentam massas moleculares abaixo de 10 kDa (utilizando intervalo de faixa de prospecção de 500 à 20000 m/z).

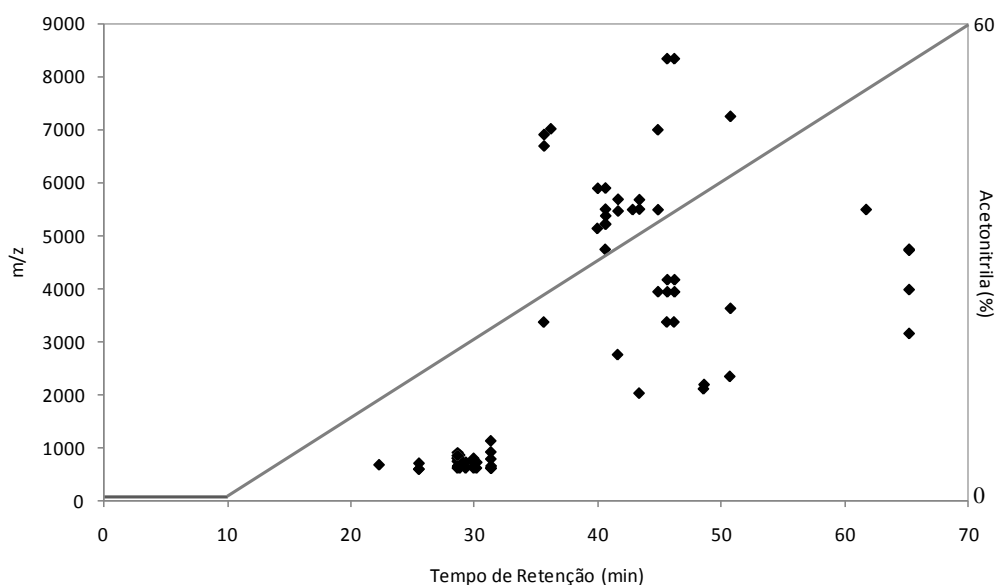


Figura 12. Distribuição dos componentes de massas em relação à hidrofobicidade. A linha cinza indica o gradiente de acetonitrila.

5.2. Ensaio com a peçonha bruta de *N. coloratovillosus* e GF1

5.2.1. Perfil eletroforético

A peçonha bruta de *N. coloratovillosus* foi separada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% como descrito anteriormente. As amostras foram fervidas ou não e/ou reduzidas ou não, para averiguar as diferenças nos padrões de migração. Foi possível observar, em todas as condições, que as proteínas de massa molecular próximas a 40 kDa são responsáveis pela maior parcela do peso seco total da peçonha bruta (figura 13). Além disso, a peçonha bruta não-reduzida (figura 13, poços 3, 4, 3' e 4') apresenta uma maior quantidade de proteínas de alto peso molecular (maiores do que 120 kDa) quando comparada com a peçonha reduzida (figura 13, poços 1, 2, 1' e 2'). As proteínas de baixa massa molecular só puderam ser visualizadas após coloração com nitrato de prata (figura 13, poços 1', 2', 3' e 4') e estavam ligeiramente mais visíveis nas amostras reduzidas (figura 13, poços 1' e 2').

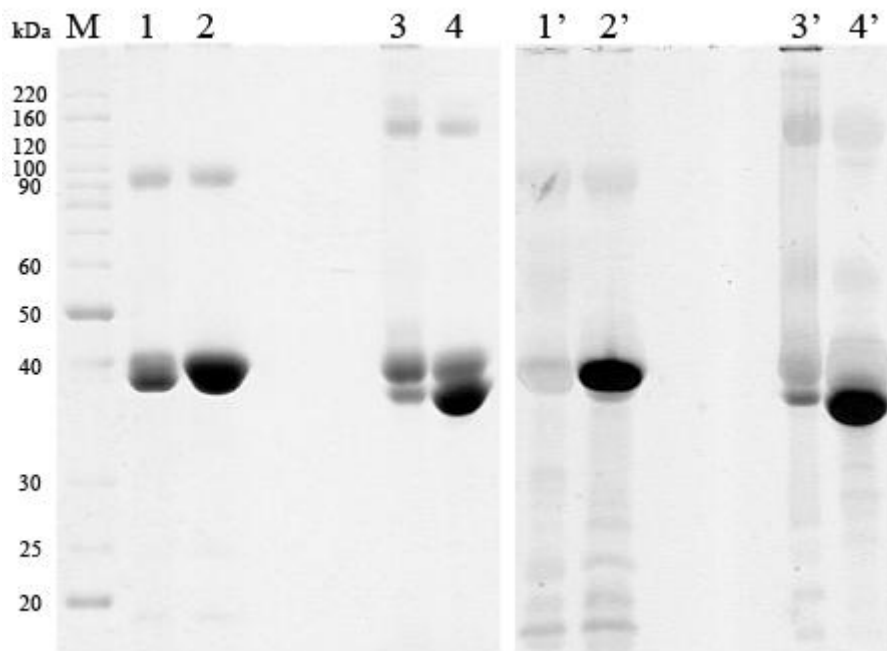


Figura 13. Perfil eletroforético da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* (40 µg) em SDS-PAGE 12%. (M) Marcador de massas moleculares (BenchMark Protein Ladder, Invitrogen); (1, 2, 3 e 4) gel corado com Azul de Comassie, (1', 2', 3' e 4') gel corado com nitrato de prata; (1 e 1') amostras reduzidas e fervidas; (2 e 2') amostras reduzidas e não-fervidas; (3 e 3') amostras não-reduzidas e fervidas e (4 e 4') amostras não-reduzidas e não-fervidas.

5.2.2. Zimograma SDS-PAGE – Caseinolítico, Gelatinolítico e Hialuronidásico

A atividade caseinolítica foi visualizada por meio de zimografia. A aplicação de 40 µg de peçonha bruta fresca de *N. coloratovillosus* em gel SDS-PAGE 8% copolimerizado com 0,1% (p/v) de caseína, incubado em pH 8,0, revelou bandas com uma leve atividade caseinolítica acima de 160 kDa para a amostra reduzida (figura 14-B, poço 2) e acima de 220 kDa para a não-reduzida (figura 14-B, poço 4). A atividade mostrou-se mais intensa na amostra não-reduzida e ao serem fervidas não apresentaram atividade (figura 14-B, poços 1 e 3). Não foi observada atividade gelatinolítica sob as mesmas condições (figura 14-C).

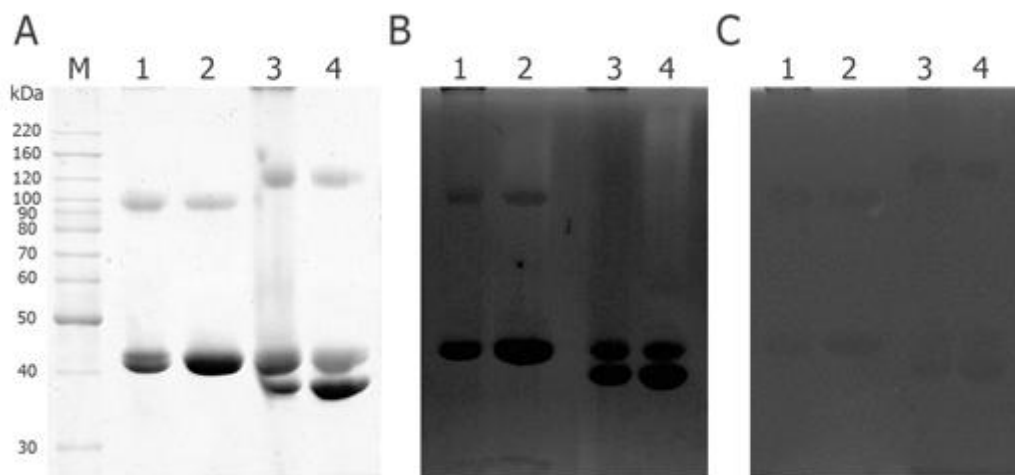


Figura 14. Zimograma em SDS-PAGE 8% da peçonha bruta fresca (40 µg) de *N. coloratovillosus*. (A) Perfil eletroforético em SDS-PAGE 8%; (B) Zimograma caseinolítico, caseína 0,1%; (C) Zimograma gelatinolítico, gelatina 0,1%; (M) Marcador de massas moleculares (BenchMark Protein Ladder, Invitrogen); (1) amostra reduzida e fervida; (2) amostra reduzida e não-fervida; (3) amostra não-reduzida e fervida; (4) amostra não-reduzida e não-fervida. Os géis foram corados com Azul de Comassie G250.

A aplicação de 20 µg da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* revelou uma forte atividade hialuronidásica em uma banda entre 35 e 50 kDa (figura 15).

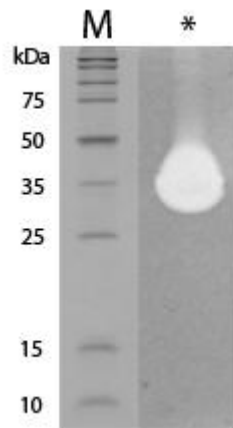


Figura 15. Zimograma hialuronidásico em SDS-PAGE 12%, ácido hialurônico 0,14%. (M) Marcador de massas moleculares (Broad Range Protein Molecular Weight Markers); (*) Peçonha bruta de *N. coloratovillosus* (20 µg).

5.2.3. Atividades antimicrobiana e hemolítica

A peçonha bruta de *N. coloratovillosus* (pool de machos e fêmeas) foi testada em diluição seriada, concentração inicial de 1024 µg/mL, para detectar possível inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). A concentração inibitória mínima da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* foi de 256 µg/mL para *S. aureus* (Figura 16-A) e 1024 µg/mL para *E. coli* (figura 16-B).

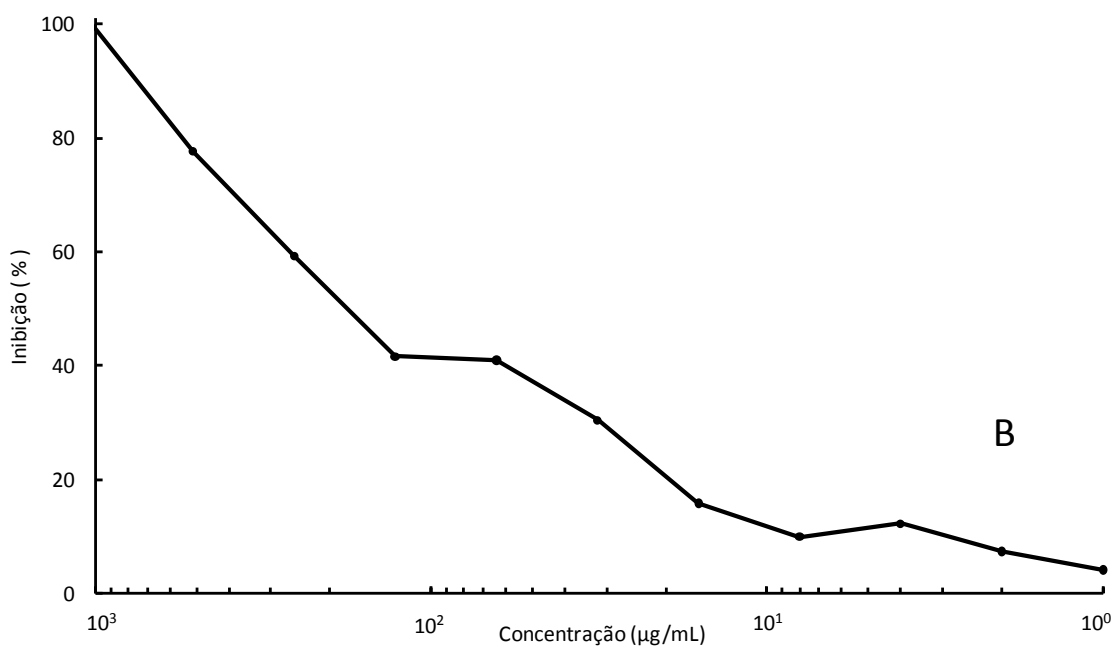
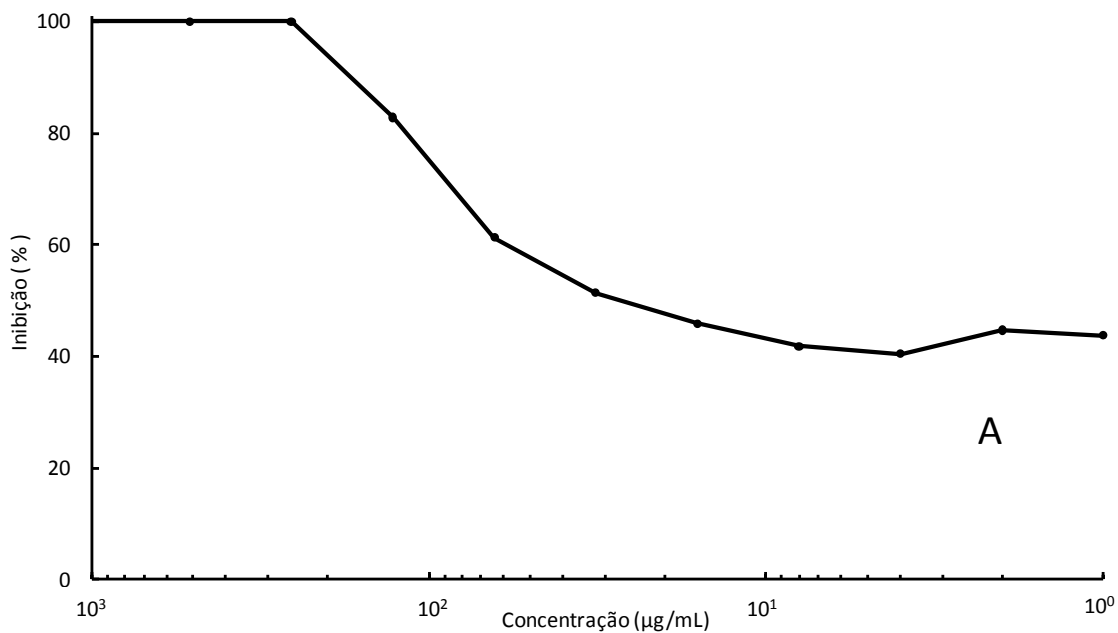


Figura 16. Inibição do crescimento de *S. aureus* (A) e *E. coli* (B) causada pela peçonha bruta de *N. coloratovillosus*. Maior concentração utilizada de 1024 µg/mL.

A partir do material obtido com duas cromatografias, realizou-se um ensaio preliminar das frações majoritárias presentes na peçonha de *N. coloratovillosus* para testar a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*. O grupo de frações 1 (GF1) e as frações 20 e 24 apresentaram inibição de crescimento para *E. coli* (tabela 6) com porcentagem de inibição variando entre 75 e 83,90%, enquanto que todas as frações

testadas apresentaram inibição de crescimento para *S. aureus* (tabela 6) com porcentagem de inibição variando entre 2,96 e 56%.

Não foi detectada atividade hemolítica para a peçonha bruta de *N. coloratovillosus* (concentração inicial de 1,5 mg/150 µL) e nem para o grupo de frações 1 (GF1) e frações 16, 20, 24 e 29.

Tabela 6. Porcentagens de inibição de crescimento microbiano e atividade hemolítica das frações majoritárias de *N. coloratovillosus*. Frações 16, 20, 24 e 29 e grupo de frações 1 (GF1) contra bactérias as patogênicas *Escherichia coli* (ATCC 25923) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), (-) sem atividade.

Frações	GF1	16	20	24	29
<i>E. coli</i>	75%	-	75,84%	83,90%	-
<i>S. aureus</i>	15,19%	24%	2,96%	6,30%	56%
Hemolítico	-	-	-	-	-

5.1.1 Ensaio farmacológico em nervo periférico de anfíbio

O efeito farmacológico de 1,5 mg (dissolvido em 400 µL de solução Ringer) da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* (pool de machos e fêmeas) foi testado em nervo ciático de rã *Lithobates catesbeianus*. Foi registrada alteração do potencial de ação composto após a aplicação do extrato bruto, conforme mostrado na figura 17. Após 10 min da aplicação da peçonha, o potencial de ação composto foi reduzido em mais de 95% (figura 17-B) em relação ao registro controle (figura 17-A). Mesmo após 30 min de lavagem com solução Ringer para retirada da peçonha (figura 17-C), não foi mais possível observar a formação do potencial de ação, demonstrando um efeito irreversível no bloqueio da transmissão dos impulsos nervosos.

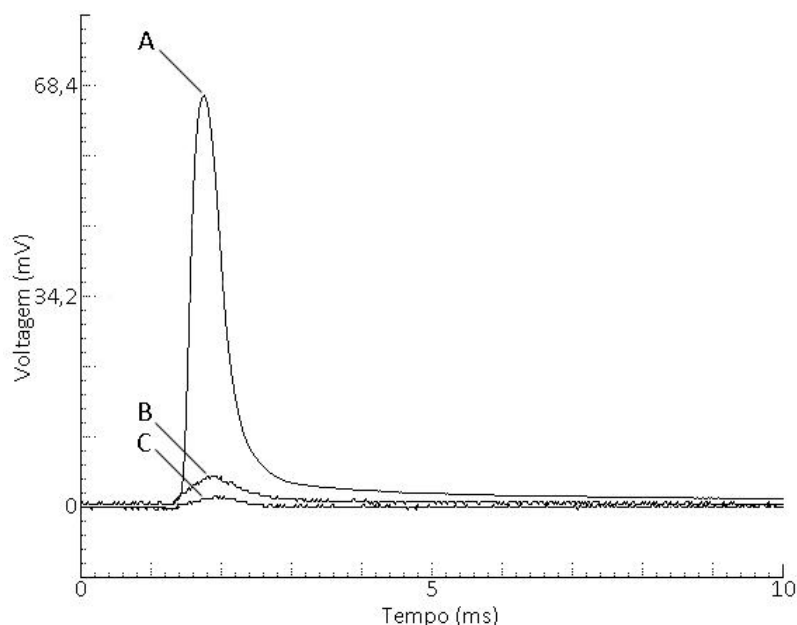


Figura 17. Ensaio farmacológico em nervo ciático isolado de rã. (A) Potencial de ação composto antes da aplicação de 1,5 mg/400 μ L de peçonha bruta de *N. coloratovillosus*; **(B)** potencial de ação composto 10 minutos após a aplicação de 1,5 mg/400 μ L de peçonha bruta de *N. coloratovillosus*; **(C)** potencial de ação composto após 30 minutos de lavagem com solução Ringer para retirada da peçonha.

5.2.4. Ensaio farmacológico em nervo periférico de anfíbio com GF1

O efeito farmacológico de 100 μ g/400 μ L do grupo de frações 1 (GF1) em nervo ciático de rã foi diferente do observado com a aplicação da peçonha bruta (figura 18 *versus* figura 17). Após 10 min da aplicação da amostra na câmara-teste, houve uma ligeira diminuição do potencial de ação composto registrado (figura 18-B) em relação ao registro controle (figura 18-A), acompanhado de um pequeno deslocamento para direita, possivelmente ocasionado por uma alteração no tempo de abertura dos canais para Na⁺ voltagem-dependentes.

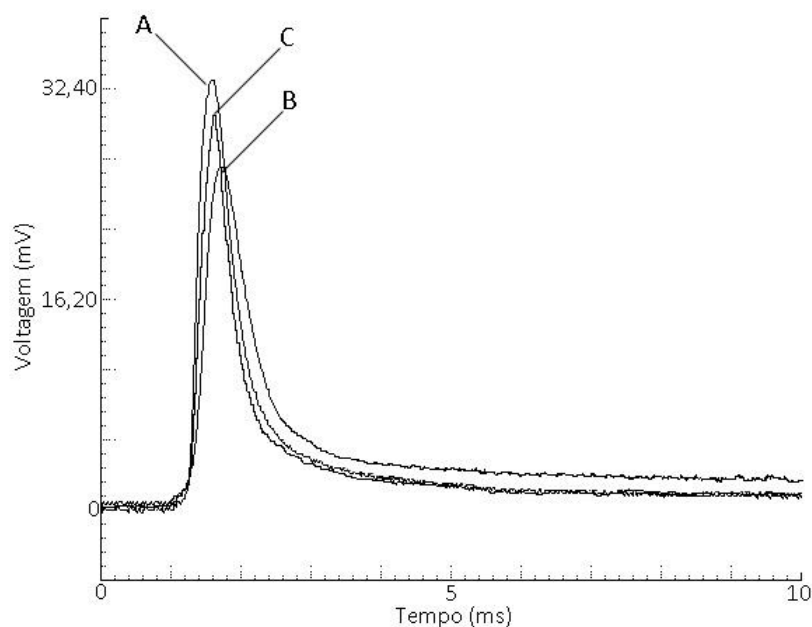


Figura 18. Ensaio farmacológico no nervo ciático isolado de rã. (A) Potencial de ação composto antes da aplicação de 100 $\mu\text{g}/400 \mu\text{L}$ de GF1; **(B)** potencial de ação composto 10 minutos após a aplicação de 100 $\mu\text{g}/400 \mu\text{L}$ de GF1; **(C)** potencial de ação composto após 30 minutos de lavagem com solução Ringer para retirada da amostra.

5.3. Purificação e caracterização dos componentes

5.3.1. Recromatografias e Espectrometria de Massa MALDI-TOF

Após realização do ensaio antimicrobiano preliminar para as frações 16, 20, 24 e 29 e grupo de frações 1 (GF1), as frações de interesse 16, 20, 24 e 29 foram submetidas a recromatografia para purificação dos componentes responsáveis pela atividade biológica apresentada.

A fração 16 foi recromatografada para a obtenção do seu componente principal RF16 (figura 19-A) e analisada em sistema de espectrometria de massa em MALDI-TOF para verificação da pureza da amostra (figura 19-B).

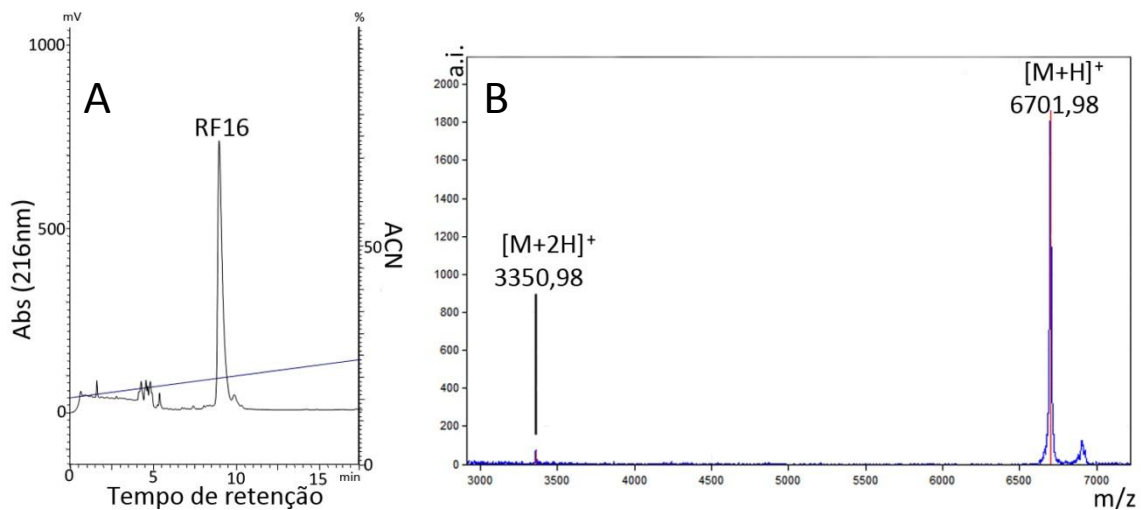


Figura 19. Purificação da fração 16. (A) Recromatografia da Fração 16 (RF16) em sistema RP-HPLC, coluna analítica C18 Phenomenex Luna 3u 100 A (4,6 mm x 150 mm), gradiente de acetonitrila otimizado; (B) Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF, matriz ácido sinapínico, modo linear.

A figura 20-A mostra a recromatografia da fração cromatográfica 20 (RF20) e o espectrograma de massa do componente RF20 (figura 20-B).

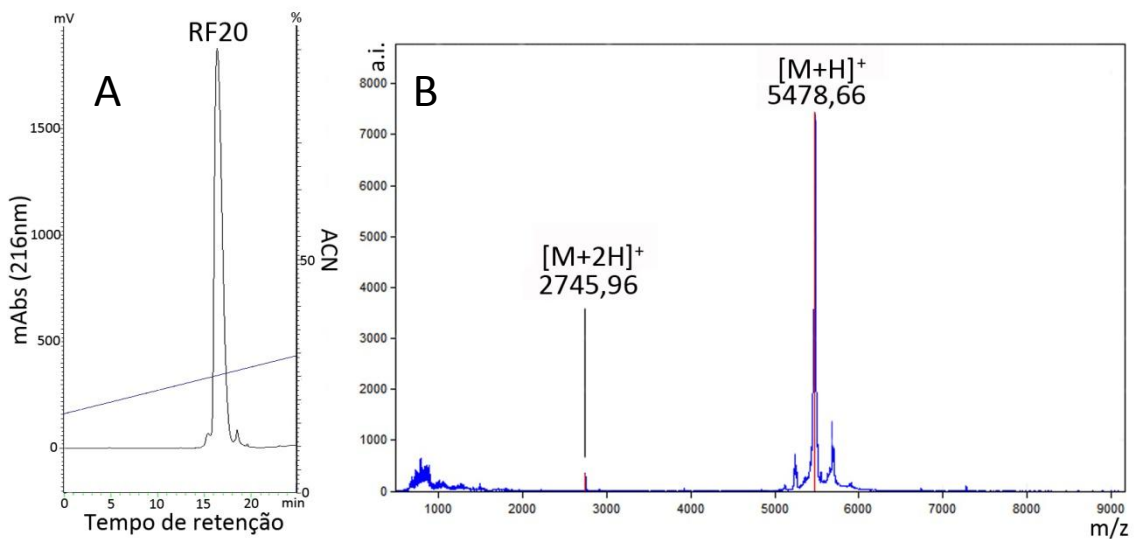


Figura 20. Purificação da fração 20. (A) Recromatografia da fração 20 (RF20) em sistema RP-HPLC, coluna analítica C18 Phenomenex Luna 3u 100 A (4,6 mm x 150 mm), gradiente de acetonitrila; (B) Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF, matriz ácido sinapínico, modo linear.

A figura 21-A mostra a recromatografia da fração cromatográfica 29 (RF29) e o espectrograma de massa do componente RF29 (figura 21-B).

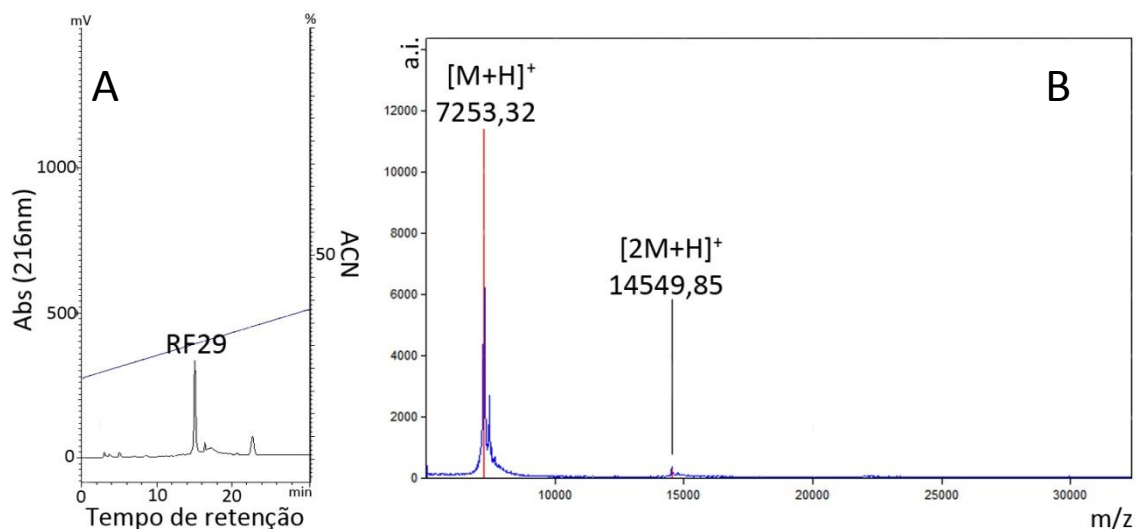


Figura 21. Purificação da fração 29. (A) Recromatografia da fração 29 (RF29) em sistema RP-HPLC, coluna analítica C18 Phenomenex Luna 3u 100 A (4,6 mm x 150 mm), gradiente de acetonitrila otimizado. (B) Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF, matriz ácido sinapínico, modo linear.

A atividade hialuronidásica detectada na peçonha bruta de *N. coloratovillosus* foi identificada como uma banda com massa molecular entre 35 e 50 kDa (figura 15). Nagaraju e colaboradores (2007) identificaram uma banda de massa molecular aproximada de 42 kDa como a responsável pela atividade hialuronidásica na peçonha bruta de *Hippasa partita*. A proteína responsável por tal atividade em *H. partita* foi isolada, apresentando eluição em aproximadamente 50% de acetonitrila por RP-HPLC. A trigésima segunda fração cromatográfica identificada na peçonha bruta de *N. coloratovillosus* apresentou características similares àquelas encontradas no trabalho de Nagaraju e colaboradores (2007). Desta maneira, a fração 32 foi purificada e submetida à análise por MALDI-TOF MS, com faixa de prospecção de massas variando entre 20 e 45 kDa, já que a banda que apresentou atividade hialuronidásica possui massa molecular entre 35 e 50 kDa.

A figura 22-A mostra a recromatografia da fração cromatográfica 32 (RF32) e o espectrograma de massa de RF32 (figura 22-B), com detecção de um componente de massa molecular de aproximadamente 42 kDa.

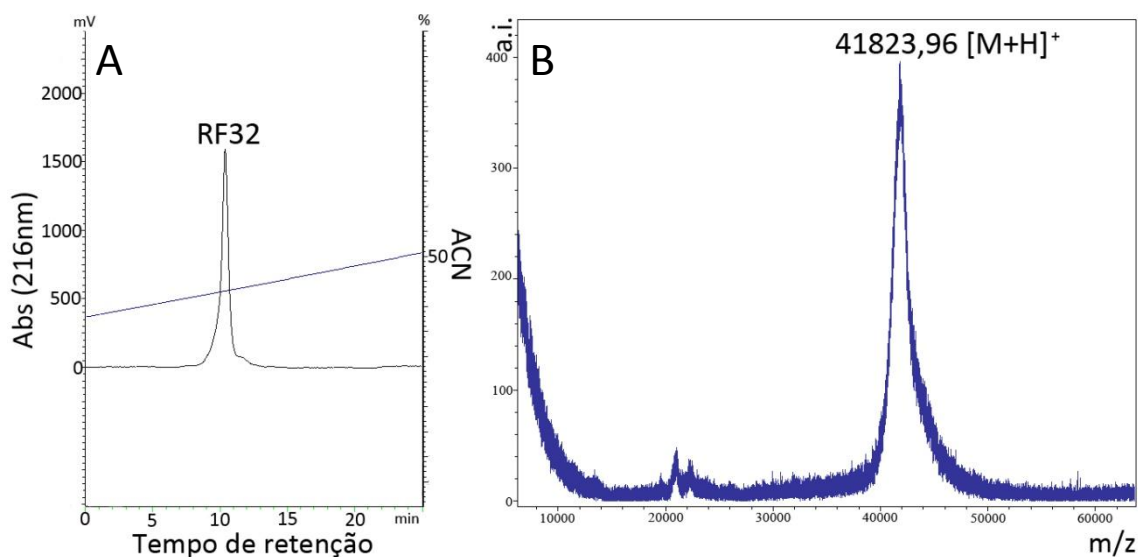


Figura 22. Purificação da fração 32. (A) Recromatografia da fração 32 (RF32) em sistema RP-HPLC, coluna C18 Phenomenex Onyx Monolithic (4,6 mm x 100 mm), gradiente de acetonitrila otimizado. (B) Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF, matriz ácido sinapínico, modo linear.

5.3.2. Redução/Alquilação e Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

A fração purificada RF20 foi submetida à redução com DTT e alquilação com 4-vinilpiridina a fim de proteger os resíduos de cisteína possivelmente presentes em sua estrutura. Alíquotas dessa fração foram analisadas por MALDI-TOF para determinar o número de resíduos de cisteína presentes nos peptídeos.

A massa molecular de RF20 após redução e alquilação observada foi de 6336,28 m/z (figura 23), uma diferença de 857,62 em relação à massa molecular do peptídeo nativo (5478,66 m/z), evidenciando a presença de oito resíduos de cisteína (a massa da cisteína é acrescida em 105 após alquilação).

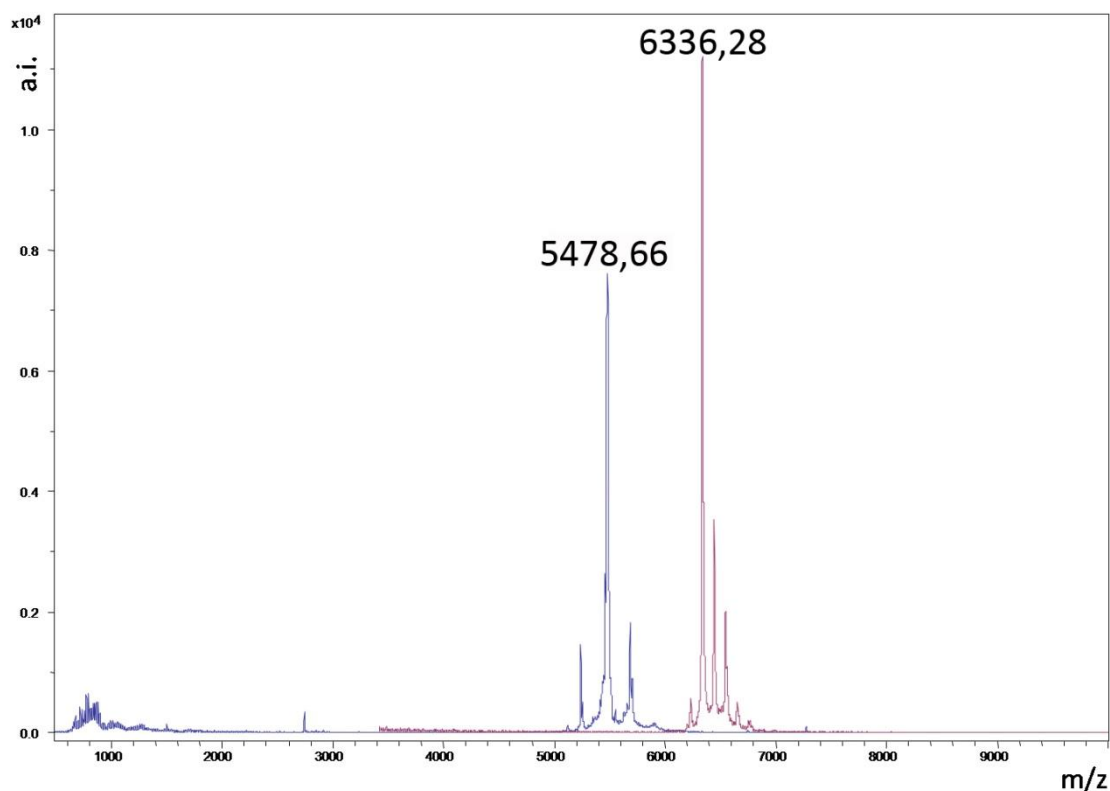


Figura 23. Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da RF20 nativa (em azul) e da RF20 reduzida e alquilada (em roxo). A redução foi realizada com DTT e alquilação com 4-vinilpiridina.

Após redução e alquilação, e hidrólise de RF20 com tripsina, os digestos foram analisados por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. A identificação de proteínas foi realizada por meio de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) usando o *software* MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). A pontuação de probabilidade calculada pelo software foi usada como critério para a correta identificação do peptídeo, onde escores maiores do que 78 foram considerados significantes ($p < 0,05$) (figura 24).

Foi obtido um total de 14 fragmentos após digestão com tripsina, e a busca por similaridades usando o *software* MASCOT revelou que sete desses fragmentos apresentaram similaridade com uma toxina isolada de *Lasiodora* sp., a theraphotoxina Lp1b ou toxina LTx2. Não foram identificadas proteínas por PMF das frações purificadas RF16, RF29 e RF32.

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: [gi|74779055](#) Score: **121** Expect: **2.9e-06**
 RecName: Full=U1-theraphotoxin-Lp1b; Short=U1-TRTX-Lp1b; AltName: Full=Toxin LTx2; Flags: Precursor

Nominal mass (M_r): **12010**; Calculated pI value: **6.28**
 NCBI BLAST search of [gi|74779055](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Lasiodora parahybana](#)
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
[gi|55976977](#) from [Lasiodora sp. IBSP 8539](#)

Fixed modifications: Pyridylethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Number of mass values searched: **14**
 Number of mass values matched: **7**
 Sequence Coverage: **34%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

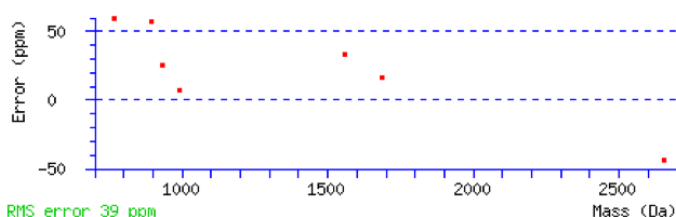
1 MRSLLTAAALL LCSLLLVFHT SAAEELQAQE GHLMIPGDTD TALETVDDER
 51 **LFECTFECDI KKEGKPKPK** GCKCDDKDNK DHK**KCSGGWR** CK**LKLCLKI**

Show predicted peptides also

Sort Peptides By Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
51 - 61	1557.7629	1556.7556	1556.7043	33	0	R.LFECTFECDIK.K
51 - 62	1685.8336	1684.8264	1684.7993	16	1	R.LFECTFECDIKK.E
51 - 70	2658.2118	2657.2045	2657.3208	-44	2	R.LFECTFECDIKKEGKPKPK.G
63 - 70	991.5471	990.5398	990.5320	8	0	K.EGKPKPK.G
84 - 90	898.4869	897.4797	897.4279	58	1	K.KCSGGWR.C
85 - 90	770.3863	769.3790	769.3330	60	0	K.CSGGWR.C
93 - 99	935.6352	934.6279	934.6037	26	2	K.LKLCLKI.-

No match to: 903.6805, 1200.5994, 1687.8409, 1790.8144, 2763.3087, 3298.5109, 3299.4881



Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 78 are significant ($p < 0.05$).

Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

1. [gi|74779055](#) Mass: 12010 Score: **121** Expect: **2.9e-06** Queries matched: 7
 RecName: Full=U1-theraphotoxin-Lp1b; Short=U1-TRTX-Lp1b; AltName: Full=Toxin LTx2; Flags: Precursor

Figura 24. Identificação de RF20 por Peptide Mass Fingerprinting revelou alta similaridade com LTx2. A identificação foi realizada por meio de buscas utilizando o software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) contra o banco de dados não redundante NCBI.

Apesar de o PMF ser amplamente utilizado para identificação de homólogos, a confirmação da sequência do peptídeo é imprescindível, seja por seqüenciamento *de novo* ou por degradação de Edman. Desta forma, mesmo identificando uma alta similaridade entre RF20 e LTx2 por meio de PMF, houve a tentativa de seqüenciamento por MS/MS (operado no modo LIFT). Entretanto, poucos espectros obtidos na fragmentação apresentaram viabilidade para o seqüenciamento, não sendo possível seqüenciar um grande número de resíduos de aminoácidos. Sendo assim, o seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman fez-se necessária.

5.3.3. Seqüenciamento, alinhamentos e similaridades

O seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman resultou na obtenção de uma sequência parcial de 38 resíduos de aminoácidos: **LFECTFECDIKPEGKPKPKGCKDNKDNKTNKKC_GGW**. Por MS/MS (operado no modo LIFT) foi possível acrescentar dois resíduos de aminoácidos à sequência previamente obtida por Edman. O seqüenciamento *de novo* do fragmento de m/z 898,43, obtido por digestão trípica, resultou na sequência **KCSGGWR** (figura 25).

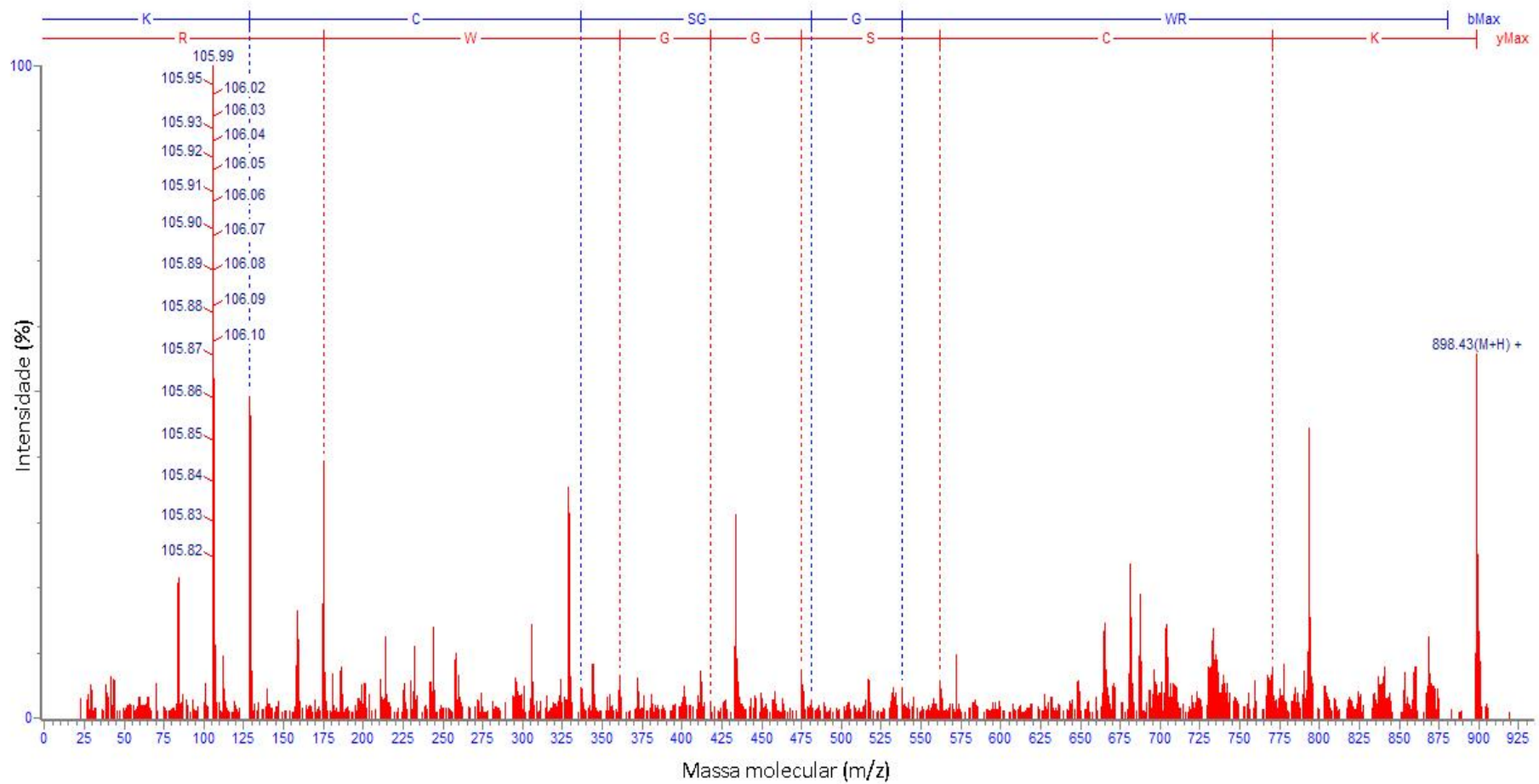


Figura 25. Sequenciamento de novo do digesto trípico de m/z 898,43. A sequencia obtida desse fragmento por MS/MS permitiu o acrescimo de dois resíduos de aminoácidos à sequencia obtida por degradação de Edman.

Alinhando a sequência obtida por Edman à sequência obtida por seqüenciamento *de novo* do fragmento de m/z 898,48, temos:

LFECTFECDIKPEGKPKPKGCKCDNKDNKTNKKC_GGW
KCSGGWR;

onde o espaço não resolvido existente entre o sexto resíduo de cisteína e o resíduo de glicina corresponde a um resíduo de serina. Também foi possível identificar um resíduo de arginina após o resíduo de triptofano. Desta maneira, a combinação de ambas as técnicas permitiu o seqüenciamento de 40 resíduos com sequência parcial final: **LFECTFECDIKPEGKPKPKGCKCDNKDNKTNKKCSGGWR.**

A busca por similaridades em bancos de dados e posterior alinhamento confirmaram que a sequência N-terminal parcial obtida apresenta identidade de 90% com LTx2 (figura 26). Um total de doze toxinas isoladas da peçonha de aranhas apresentou similaridade com RF20, com identidades variando entre 90 e 56%.

Toxina	Sequencia	a.a.	I (%)
RF20	LFECTFECDIKPEGKPKPKGCKCDNKDNKTNKKCSGGWR-----	40	
LTx2	LFECTFECDIKKEGKPKPKGCKCDDKDNKDHKKCSGGWRCKLKLQLKI	49	90
LTx3	FFECTFECDIKKEGKPKPKGCKCDDKDNKDHKKCSGGWRCKLKLQLKF	49	87
LTx1	FFECTFECDIKKEGKPKPKGCKCDDKDNKDHKKCSGGWRCKLKLQLKF	49	85
LpTx1	FFECTFECDIKKEGKPKPKGCKCDDKDNKDHKKCSGGWRCKLKLQLKF	49	85
LpTx2	FFECTLECDIKKEGKPKPKGCKCNDKDNKDHKKCSGGWRCKLKLQLKF	49	82
Ba2	IFECVFSCDIKKEGKPKPKG-----EKKCTGGWRCKIKLQLKI	39	61
BsTx1a	IFECVFSCDIEKEGKPKPKG-----EKKCSGGWCKIKLQLKI	39	58
ESTX2	IFECVFSCDIEKEGKPKPKG-----EKKCSGGWCKIKLQLKI	39	58
Ba1	IIECVFSCDIKKEGKPKPKG-----EKKCTGGWRCKIKLQLKI	39	58
JZTX8.2	LFECVFSVCDIKKNGKPKKGG-----EKKCSGGWRCKMNFQVKV	39	56
ESTX1	IFECVFSCDIEKEGKPKPKG-----EKKCTGGWCKIKLQLKI	39	58
BsTx5	IIECVFSVCDIEKEGKPKPKG-----EKKCSGGWCKIKLQLKI	39	56
	::** :.***: :***** .*		.*****

Figura 26. Alinhamento do fragmento N-terminal de RF20 realizado por meio do programa ClustalW (Thompson et al., 1994). LTx1, LTx2 e LTx3 (*Lasiodora* sp.; Vieira et al., 2004); LpTx1 e LpTx2 (*Lasiodora parahybana*; Escoubas et al., 1997); Ba1 e Ba2 (*Brachypelma albiceps*; Corzo et al., 2009); BsTx1a e BsTx5 (*Brachypelma smithi*; Kaiser et al., 1994); ESTX1 e ESTX2 (*Aphonopelma* sp.; Savel-Niemann, 1989); JZTX8.2 (*Chilobrachys jingzhao*; Chen et al., 2008). “*”: resíduos idênticos, “.”: substituição conservativa, “:”: substituição semi-conservativa.

5.4. Identificação da hialuronidase

Atividade hialuronidásica foi detectada aplicando-se 20 µg da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* (figura 27-1) e 10 µg (figura 27-2) e 20 µg (figura 27-3) de RF32 em gel SDS-PAGE 12% contendo 0,14% (p/v) de ácido hialurônico como substrato (figura 27). A digestão do ácido hialurônico, identificada como zonas claras contra o fundo corado em azul no gel para ambas as amostras, confirmou que RF32 é a responsável pela a atividade hialuronidásica detectada na peçonha de *N. coloratovillosus*.

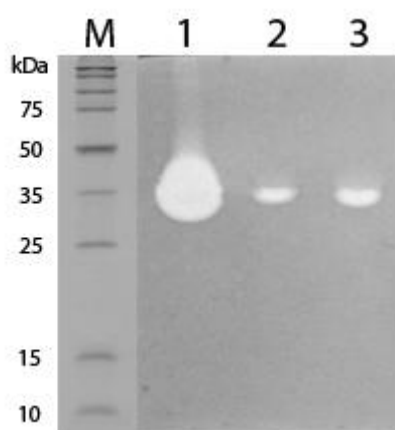


Figura 27. Zimograma hialuronidásico em SDS-PAGE 12%, ácido hialurônico 0,14% da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* e RF32. (M) Marcador de massas moleculares (Broad Range Protein Molecular Weight Markers); (1) Peçonha bruta de *N. coloratovillosus* (20 µg); (2) RF32 (10 µg); (3) RF32 (20 µg).

5.5. Ensaio com RF20

5.5.1. Determinação do MIC

Os dados obtidos no ensaio preliminar com as frações majoritárias presentes na peçonha de *N. coloratovillosus* revelaram que a fração 20 não possui atividade hemolítica e foi responsável pela segunda maior atividade antimicrobiana contra *E. coli* (tabela 6). Todavia, o componente purificado da fração 20 (RF20), foi testado em diluição seriada para a determinação do MIC em *E. coli* e *S. aureus*. Utilizando uma concentração inicial de 128 µM, não houve inibição do crescimento para ambas as bactérias.

Os demais componentes purificados que apresentaram atividade antimicrobiana no ensaio preliminar (frações 16, 24 e 29) não foram acumulados em quantidade ou pureza suficientes para a determinação do MIC.

5.5.2. Ensaio farmacológico em nervo periférico de anfíbio

O efeito farmacológico de 90 nM de RF20 foi testado em nervo ciático de rã *Lithobates catesbeianus*. Não foi registrada alteração significativa do potencial de ação composto após a aplicação da amostra, conforme mostrado na figura 28.

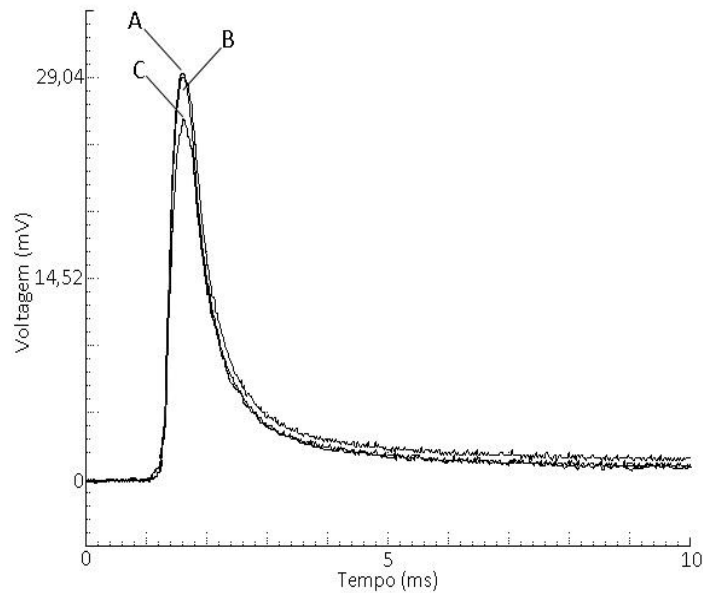


Figura 28. Ensaio farmacológico em nervo ciático isolado de rã. (A) Potencial de ação composto antes da aplicação de 200 µg/400 µL (90 nM) da Fração 20; **(B)** potencial de ação composto 10 minutos após a aplicação de RF20; **(C)** potencial de ação composto após 30 minutos de lavagem com solução Ringer para retirada da amostra.

5.5.3. Ensaio cardiotoxico

A aplicação de 365 nM de RF20 na fatia de coração isolado de *L. catesbeianus* causou um pequeno declínio reversível na amplitude do estímulo, conforme figura 29.

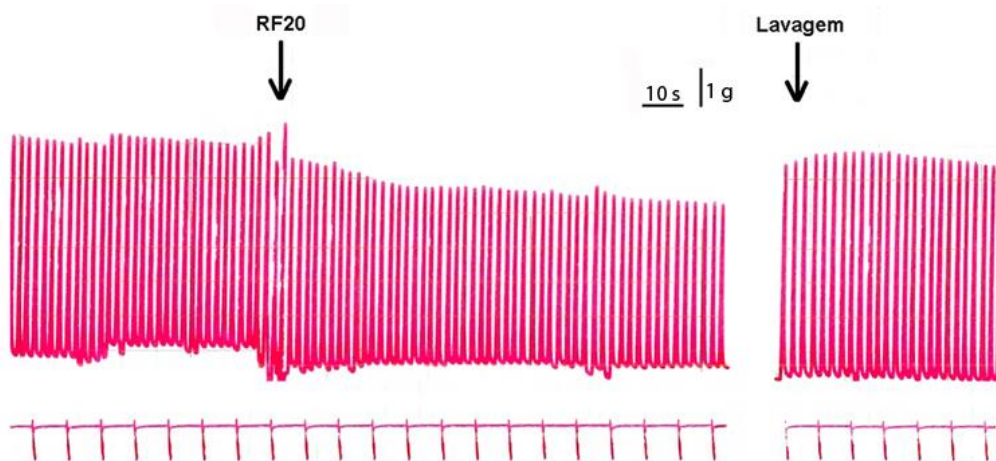


Figura 29. Microcardiograma da fatia de ventrículo isolado de *L. catesbeianus* após aplicação de 365 nM de RF20. A barra horizontal representa um período de 10 segundos e a barra vertical uma força de contração equivalente a um grama.

6. Discussão

6.1. Componentes da peçonha de *N. coloratovillosus*

Para obtenção do perfil peptídico e protéico presente na peçonha bruta de *N. coloratovillosus* foi utilizado uma combinação das técnicas de Cromatografia Líquida (RP-HPLC), eletroforese (SDS-PAGE) e espectrometria de massa (MALDI-TOF). Cromatografia e espectrometria de massa fornecem uma visão detalhada de componentes <10 kDa. Em contraste, o perfil eletroforético que se obtém por SDS-PAGE produz menor resolução para componentes de baixa massa molecular, mas fornece uma melhor visão para polipeptídeos e proteínas com massa molecular >10 kDa.

Os perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC com a utilização de 1 mg de peçonha bruta apresentaram considerável similaridade, observando-se a eluição de 35 frações bem separadas (com exceção do grupo de frações 1 – GF1) (figura 9). Sugerimos que o grupo de frações 1 (GF1) faça parte do grupo das acilpoliaminas, por apresentarem difícil separação (coeluem entre 27 e 32 minutos), caráter hidrofílico e componentes de baixa massa molecular (500 – 800 m/z). Dados da literatura sugerem que frações que eluem no começo em sistemas de cromatografias de fase reversa apresentam como características componentes de baixa massa molecular como aminas biogênicas e poliaminas (Adams *et al.*, 1989; Skinner *et al.*, 1990; Quistad *et al.*, 1991). Componentes que eluem entre 35 – 55% de acetonitrila são provavelmente peptídeos com massas moleculares variando entre 2000 – 8000 Da e componentes que eluem no final da cromatografia podem representar componentes com massa molecular acima de 10000 Da. As frações de interesse eluíram entre 25 – 60 min de tempo de retenção e foram utilizadas no presente estudo.

Os dados obtidos a partir de análise utilizando espectrômetro de massa MALDI-TOF, nos modos refletor (matriz α -ciano 4-hidroxi-cinâmico) e linear (matriz ácido sinapínico) com intervalo de faixa de prospecção de 500 a 20000 m/z, revelaram a presença de 46 componentes de massa variando entre 500 e 8500 m/z, não sendo observados componentes de massa acima de 10 kDa. Esses resultados demonstram que a peçonha de *N. coloratovillosus* contém um número de componentes peptídicos

inferior ao encontrado em peçonhas de outras aranhas da família Theraphosidae (Gentz *et al.*, 2009; Guette *et al.*, 2006; Escoubas *et al.*, 1998).

A análise por MALDI-TOF MS do perfil peptídico obtido da peçonha de 55 tarântulas (Escoubas e Rash, 2004) revelou uma distribuição de massas moleculares bimodal, isto é, 57,8% dos peptídeos detectados estão na classe central de 3500 a 4500 Da, e uma distribuição secundária (6,9%) na classe que vai de 6500 a 7000 Da. No entanto, o perfil obtido por espectrometria de massa da peçonha de *N. coloratovillosus* mostra que 21,73% dos peptídeos detectados se encontram numa faixa de 2000 a 4000 m/z e outros 30,43% numa faixa de 4000 – 6000 m/z, ambos totalizando 52,17% da peçonha total, além de 13,04% entre 6000 e 8500 m/z. Se considerarmos que a massa média de um resíduo de aminoácido seja $118,66 \pm 30,10$ Da (Escoubas e Rash, 2004), podemos inferir que mais de 52% dos peptídeos detectados contém entre 19 e 50 resíduos de aminoácidos.

As análises do grupo de frações GF1 em sistema MALDI-TOF MS no modo refletor permitiram a detecção de 16 componentes (tabela 4). Mais de 30% dos componentes detectados na peçonha bruta de *N. coloratovillosus* apresentaram massas moleculares entre 500 e 1000 m/z (figura 11). Os dois componentes mais abundantes e frequentes nos espectrogramas para GF1 foram os componentes 601,21 e 729,23 m/z (tabela 5). Sugerimos que esses dois componentes sejam acilpoliaminas. Skinner e colaboradores (1990) caracterizaram parcialmente duas acilpoliaminas identificadas na aranha *Aphonopelma chalcodes*. Esses dois componentes correspondiam as duas frações mais proeminentes do cromatograma da peçonha bruta de *A. chalcodes*, sendo então purificadas e subsequentemente analisadas por LMSI-MS, mostrando uma predominância de componentes com massas protonadas $[M+H]^+$ de aproximadamente 601 e 729 m/z. As acilpoliaminas foram designadas APC₆₀₀ e APC₇₂₈ e suas análises mostraram a presença de uma espermina e um componente 1,3-diaminopropano em ambos os componentes, não apresentando aminoácidos em sua estrutura. Em 1993, McCormick e Meinwald sugeriram uma estrutura não completamente elucidada para essas duas acilpoliaminas (figura 30).

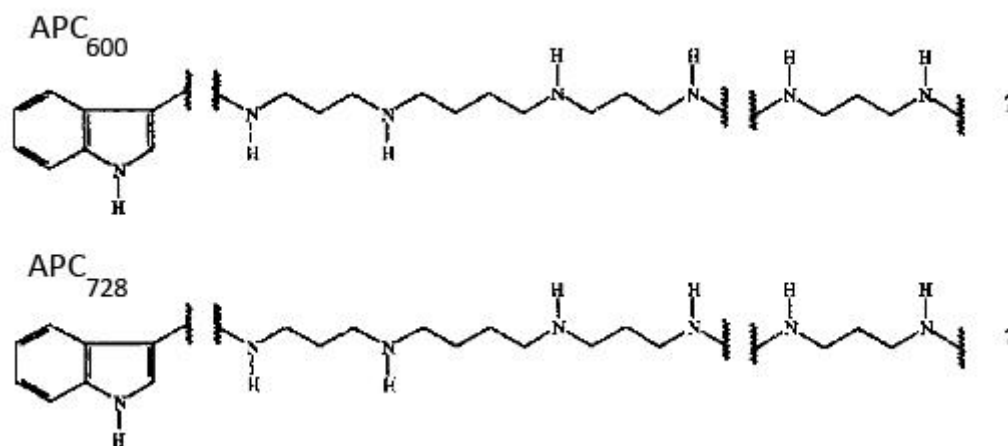


Figura 30. Estrutura proposta parcialmente elucidada para as acilpoliaminas APC₆₀₀ e APC₇₂₈. Adaptado de McCormick e Meinwald (1993).

O perfil de massas moleculares obtido por MALDI-TOF MS da glândula de peçonha de *Lasiodora parahybana* (Guette *et al.*, 2006) apresentou 18 moléculas protonadas como biomarcadores. Dentre essas moléculas, destacam-se duas acilpoliaminas de massas moleculares protonadas 601,38 e 729,35 m/z, muito próximas às encontradas na peçonha bruta de *N. coloratovillosus* (tabela 5, em negrito). Acilpoliaminas com massas muito semelhantes a essas foram também identificadas na peçonha bruta de *Lasiodora* sp. (Vizzotto, 2009).

O perfil cromatográfico obtido de 1 mg da peçonha bruta de machos e de fêmeas de *N. coloratovillosus* revelou diferenças apenas quantitativas (figura 5), não existindo a presença de frações sexo-específicas. Similarmente, os perfis cromatográficos da peçonha de machos e fêmeas de *Atrax versutus* se mostraram muito similares (Sheumack *et al.*, 1984). Entretanto, Richardson e colaboradores (2006) verificaram que em geral, a peçonha de machos de aranhas do gênero *Phoneutria*, apresentou maior número de componentes do que na peçonha de fêmeas. Foram também detectadas diferenças qualitativas relacionadas ao sexo entre as peçonhas de machos e de fêmeas de *A. robustus*, no qual os perfis cromatográficos e perfis eletroforéticos se mostraram significativamente diferentes (Rash e Hodgson, 2002). Escoubas e colaboradores (1999) encontraram diferenças qualitativas e quantitativas em seis das oito espécies de aranhas examinadas. Essas observações indicaram que o sexo pode ser considerado um fator substancial na variação intraespecífica da peçonha de aranhas.

O perfil eletroforético da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* por SDS-PAGE 12% revelou uma variedade de bandas com massas moleculares entre aproximadamente 20 e 220 kDa (figura 13). O gel corado com nitrato de prata (figura 13, poços 1', 2', 3' e 4') revelou um maior número de bandas, principalmente abaixo de 40 kDa, do que o gel corado com Comassie Blue (figura 13, poços 1, 2, 3 e 4).

A diferença entre o perfil eletroforético de amostras não-reduzidas e reduzidas indica a presença de pontes dissulfeto em alguns dos componentes da peçonha de *N. coloratovillosus*. Estas pontes podem ser responsáveis pelo aumento da velocidade de migração da banda de aproximadamente 90 kDa em amostras reduzidas (figura 13, poços 1, 1', 2 e 2' versus 3, 3', 4 e 4'), devido a uma maior facilidade de macromoléculas linearizadas migrarem na matriz de poliacrilamida, ou até mesmo à participação das mesmas na formação de um complexo dimérico. Já a banda de aproximadamente 40 kDa apresentou uma maior taxa de migração quando a amostra não foi reduzida, sugerindo que as pontes dissulfeto possivelmente apresentem um papel de compactação deste componente específico.

No entanto, comparando-se as amostras fervidas e não-fervidas a principal diferença encontrada foi uma redução de intensidade das bandas tanto no gel corado com Azul de Coomassie (figura 13, poços 1 e 3 versus 2 e 4) quanto com nitrato de prata (figura 13, poços 1' e 3' versus 2' e 4'). Tal fato pode ser explicado pela formação de agregados de proteínas desnaturadas, que ao terem suas regiões hidrofóbicas expostas ao tampão de amostra, formam precipitados que têm dificuldade em entrar no gel separador. Esse agregado pode ser observado principalmente nas amostras fervidas (figura 13, poços 1, 1', 3, 3') como uma banda de alta massa molecular (maior que 220 kDa), exatamente na divisão entre o gel concentrador e o separador.

Em ambas as colorações é possível observar a presença de duas bandas principais: uma fracamente corada com massa molecular em torno de 90 kDa e outra fortemente corada em torno de 40 kDa, responsáveis pela maior parcela da peçonha bruta. Gentz e colaboradores (2009) demonstram a presença de dois componentes principais por SDS-PAGE na peçonha de seis aranhas da família Theraphosidae, um componente de aproximadamente 45 e 95 kDa. As massas moleculares desses

componentes se aproximam muito com as encontradas no perfil eletroforético da peçonha bruta de *N. coloratovillosus*. Foi sugerido que essas proteínas possivelmente correspondem a enzimas envolvidas no processamento e secreção de peptídeos menores (Gentz *et al.*, 2009).

6.2. Ensaios preliminares com a peçonha bruta de *N. coloratovillosus*

As concentrações inibitórias mínimas da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* variaram entre as diferentes linhagens bacterianas. O MIC para *S. aureus* (256 µg/mL) foi duas vezes maior do que para *E. coli* (1024 µg/mL) (figura 15-A e -B, respectivamente). Interessantemente, no ensaio preliminar realizado com as frações cromatográficas de interesse (tabela 6), as maiores inibições foram registradas contra *E. coli*, porém, somente três das cinco amostras testadas apresentaram atividade (grupo de frações 1, fração 20 e fração 24), enquanto que todas as amostras testadas apresentaram atividade contra *S. aureus*, ainda que a inibição tenha sido menor que 25% (com exceção da fração 29 com inibição de 56%). O fato de a peçonha bruta apresentar maior atividade antibacteriana contra *S. aureus* do que contra *E. coli*, pode ser explicado por um possível sinergismo entre as frações que a compõem, já que as maiores porcentagens de inibição para as frações cromatográficas isoladas foram contra *E. coli*.

As diferenças de comportamento nos ensaios antimicrobianos contra *E. coli* e *S. aureus* provavelmente estão relacionadas às diferenças na composição da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente. A parede celular bacteriana é um obstáculo a ser ultrapassado pelos peptídeos antimicrobianos, pois dificulta o acesso à superfície com cargas negativas da membrana (Bechinger, 1999). Desta maneira, há diferença na atividade desses peptídeos em Gram-positivas e Gram-negativas, devido as suas diferentes paredes celulares. Uma vez vencidas as barreiras de acesso à membrana, é necessária a interação com a superfície negativamente carregada e o acúmulo de uma concentração limiar de peptídeos para que estes possam atuar na camada lipídica (Yeaman e Yount, 2003; Bechinger, 1999).

A peçonha bruta de *N. coloratovillosus* e nenhuma fração majoritária testada apresentaram atividade hemolítica. A ausência dessa atividade, mesmo nas frações

que apresentaram atividade antimicrobiana, possivelmente está relacionada às diferenças existentes na composição de membranas celulares de eucariotos e procariotos (Bechinger, 1999; Yeaman e Yount, 2003).

6.3. Atividades enzimáticas

6.3.1. Atividade proteolítica

No intuito de avaliar a presença de atividades enzimática e/ou proteásica na peçonha de *N. coloratovillosus*, foram realizados zimogramas da peçonha bruta fresca utilizando gelatina ou caseína como substrato. Ambos os zimogramas foram submetidos às mesmas condições, incubação em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 por 16 horas à 25 °C. Nessas condições, foi possível observar apenas atividade caseinolítica (figura 14-B), e tal atividade foi ligeiramente aumentada, acompanhada de um aumento na massa molecular na amostra não-reduzida em comparação com a reduzida (figura 14-B, poços 4 *versus* 2). Isso pode ser explicado pela importância de pontes dissulfeto na manutenção da estrutura tridimensional da protease em questão. Não foi possível observar atividade gelatinolítica nessas mesmas condições (figura 14-C).

É importante salientar que, apesar da atividade caseinolítica parecer fraca, não há banda visível no gel controle corado com Azul de Comassie com massa molecular semelhante à da banda com atividade no gel com caseína (figura 14, A *versus* B). Isso sugere que mesmo uma pequena concentração da enzima (não identificada com a coloração por Azul de Comassie) é capaz de realizar a quebra do substrato no zimograma. Nas amostras fervidas, não houve sinais de hidrólise, fato que contribui para a hipótese de que o responsável pela atividade hidrolítica no gel é um composto protéico.

A descrição de atividade proteolítica para a peçonha obtida por eletroestimulação de *Loxosceles reclusa* (Eskafi e Norment, 1976; Jong *et al.*, 1979) e para a peçonha de *L. intermedia* (Feitosa *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 1999; Veiga *et al.*, 2000a,b) abriu a crítica de que essa atividade ocorria devido a uma contaminação com o egesto estomacal e de enzimas hidrolíticas que se misturavam à peçonha no momento da coleta. Kuhn-Nentwig e colaboradores (2004) sugeriram que a presença

de uma atividade proteolítica significativa é geralmente um bom indicador de contaminação por regurgito. Com a finalidade de responder se a presença de proteases na peçonha é devido à contaminação com secreção abdominal, Da Silveira e colaboradores (2002) testaram atividade proteásica com as peçonhas de *L. intermedia* e *L. laeta* coletadas diretamente das glândulas de peçonha por microdissecação e homogeneização. O zimograma-SDS-PAGE da peçonha coletada por eletroestimulação foi comparado com o da peçonha obtida da glândula, não havendo diferenças significativas no perfil eletroforético. Nesse trabalho foi detectada atividade gelatinolítica para moléculas entre 32 – 35 kDa, e essa atividade foi inibida por 1,10-fenantrolina, suportando a idéia de que tal atividade é ocasionada por uma metalo-protease.

Depois disso, diversos trabalhos demonstraram a presença de atividade proteolítica na peçonha de aranhas, caracterizadas principalmente por serino e metalo-proteases (Devaraja *et al.*, 2008). Em 1998, Feitosa e colaboradores identificaram duas diferentes metalo-proteases em *L. intermedia*: uma com atividade fibronectinolítica e figrinogenolítica (20 – 28 kDa) e outra com atividade gelatinolítica (32 – 35 kDa). Posteriormente, atividade metalo-proteásica foi encontrada em diversas peçonhas de aranhas e algumas foram até purificadas (Young e Pincus, 2001; Da Silveira *et al.*, 2002; Zanetti *et al.*, 2002; Nagaraju *et al.*, 2007). Barbaro e colaboradores (2005) identificaram atividades caseinolítica e gelatinolítica em cinco espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* (*L. deserta*, *L. gaucho*, *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. reclusa*) com um amplo espectro de proteases, principalmente entre 18,1 e 31,8 kDa, das quais a maioria foi inibida com 1,10-fenantrolina, sugerindo que sejam metalo-proteases. Entretanto, atividade proteolítica causada por uma serino-protease de massa molecular entre 85 e 95 kDa foi relatada pela primeira vez na peçonha de *L. intermedia* (Veiga *et al.*, 2000b). Em 2002, Joo e colaboradores descreveram e isolaram uma serino-protease ativadora de protrombina do fluido corporal de *Nephila clavata*. Em 2008, Devaraja e colaboradores isolaram e caracterizaram uma serino-protease de baixa massa molecular da glândula de peçonha de *H. agelenoides*, apresentando massa de 16,35 kDa.

Existem inúmeras razões possíveis para a presença de enzimas proteolíticas na peçonha de aranhas e escorpiões. Essas enzimas podem atuar como fatores de dispersão e espalhamento, aumentando a permeabilidade tecidual e facilitando a dispersão de proteínas na peçonha. Eles podem ser responsáveis por pancreatite observada em pacientes picados por escorpiões, o que resulta de ativação de tripsinogênio intrapancreático (Almeida *et al.*, 2002), e podem ainda estar envolvidas no processamento pós-traducional de toxinas, como é sugerido para uma proteína identificada em *T. serrulatus*, que se apresenta como uma versão menor da Tsk β (Pimenta *et al.*, 2001).

6.3.2. Atividade hialuronidásica

Uma forte atividade hialuronidásica foi identificada na peçonha bruta de *N. coloratovillosus* por meio de zimografia utilizando ácido hialurônico como substrato (figura 15). Comparando o perfil cromatográfico da peçonha de *N. coloratovillosus* ao perfil de *H. partita* (Nagaraju *et al.*, 2007), identificamos uma fração cromatográfica que possivelmente seria a responsável por tal atividade. Desta maneira, a fração 32 foi purificada (figura 22-A) e aplicada em zimograma hialuronidásico juntamente com a peçonha bruta de *N. coloratovillosus* a fim de confirmar se essa fração era a responsável pela a atividade detectada. A aplicação de 10 e 20 μ g da fração 32 purificada resultou em uma atividade claramente visível, com massa molecular muito semelhante àquela detectada na peçonha bruta (quando considerado o centro da banda resultante da aplicação de 20 μ g da peçonha bruta) (figura 27).

A análise de RF32 em MALDI-TOF MS revelou que esse componente possui uma massa molecular de aproximadamente 42 kDa (figura 22-B). Esse resultado é compatível com hialuronidases identificadas na peçonha de outras aranhas. Além de *H. partita* (Nagaraju *et al.*, 2007), outros trabalhos relatam a identificação de hialuronidases com massa molecular em torno de 40 kDa. Em 2005, Barbaro e colaboradores identificaram atividade hialuronidásica em um componente de aproximadamente 44 kDa nas peçonhas de *L. deserta*, *L. gaucho*, *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. reclusa*. Dois componentes de 41 e 43 kDa em *L. intermedia* (Da Silveira *et al.*, 2007) também apresentaram atividade. Entre aranhas de outros gêneros, um componente de aproximadamente 45 kDa apresentou atividade hialuronidásica em

Vitalius dubius (Rocha e Silva *et al.*, 2009) e a primeira purificação de uma hialuronidase, de aproximadamente 42 kDa, foi realizada por Nagaraju e colaboradores em 2007, da peçonha de *H. partita*.

A maioria dos trabalhos que envolve atividade hialuronidásica foi realizada em aranhas do gênero *Loxosceles*. Aranhas desse gênero são popularmente conhecidas como aranhas marrom, e podem causar um quadro clínico de envenenamento nomeado Loxoscelismo. O Loxoscelismo é notável pelas lesões hemorrágicas e dermonecroticas seguidas de espalhamento gravitacional, podendo em alguns casos induzir manifestações sistemáticas como coagulação intravascular disseminada, hemólise e falência renal (Futrell, 1992; Da Silva *et al.*, 2004; Luciano *et al.*, 2004; Chaim *et al.*, 2006; Swanson e Vetter, 2006). As lesões na pele aparecem entre 4 e 12 h após a picada e são caracterizadas por edema e hemorragia local e pode progredir para uma lesão necrótica. O efeito sistêmico geralmente ocorre 24 – 48 h após o envenenamento. A presença de edema, eritema e necrose são comuns, indicando a ocorrência de distúrbios na matriz extracelular (Tan e Ponnundarai, 1992).

Ácido hialurônico é um glicosaminoglicano de alta massa molecular, sendo o principal componente da matriz extracelular de vertebrados, conectando filamentos de proteínas, fibras de colágeno e células do tecido conectivo (Laurent, 1989; Laurent e Fraser, 1992). É importante para fertilização, desenvolvimento embrionário, migração celular, cicatrização e também pode estar envolvido em diversas desordens, como na resposta inflamatória, alérgica, artrite reumatóide e metástase de células tumorais (Laurent e Fraser, 1986; Kreil, 1995). Hialuronidases podem ser utilizadas como excelentes ferramentas para biologia celular, pesquisa em bioquímica e aplicação em farmacêutica, pois estão envolvidas na fertilização de ovos. Essas enzimas podem ser utilizadas como ferramentas de fertilização *in vitro* e no desenho de métodos contraceptivos, já que inibidores de hialuronidases podem bloquear a fertilização (Kreil, 1995). Além do mais, devido à grande permeabilidade tecidual, elas podem ser usadas para aumentar a absorção de drogas (Bocci *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1997; Menzel e Farr, 1998).

6.4. Sequenciamento

A fração 20 corresponde a mais de 13% da quantidade proteica total encontrada na peçonha de *N. coloratovillosus*. Além de ter sido responsável pela segunda maior atividade antimicrobiana contra *E. coli* (tabela 6) esta fração foi acumulada em quantidade suficiente para realização dos ensaios biológicos e sequenciamento. Foi obtido cerca de 6 mg dessa fração purificada, contra um total de 300 µg da fração 16 e em torno de 200 µg da fração 29 (não foi possível purificar o componente majoritário da fração 24). Desta forma, somente RF20 teve sua sequência N-terminal determinada.

Os resultados obtidos por PMF e degradação de Edman apontaram a LTx2 como a toxina que apresenta maior identidade com RF20, com 90% de identidade (figura 26). A theraphotoxina Lp1b ou LTx2 teve sua sequência predita por banco de cDNA da glândula de peçonha de *Lasiodora* sp. (Vieira *et al.*, 2004). Dutra (2006) em dissertação de mestrado, indicou uma atividade antimicrobiana desse peptídeo na concentração de 400 mg/mL. Em 2008, Dutra e colaboradores realizaram ensaios eletrofisiológicos e indicaram que esta toxina modifica as oscilações do íon Ca^{++} através da membrana, sugerindo que essa toxina pode atuar em canais para Ca^{++} voltagem-dependentes do tipo-L. LTx1 e LTx3 tiveram também suas sequências preditas por banco de cDNA (Vieira *et al.*, 2004) e diferem entre si somente por um resíduo de aminoácido na posição 25 (figura 27). Ainda não se sabe qual a possível atividade biológica dessas duas toxinas.

A figura 31 mostra a proximidade entre os gêneros *Lasiodora* e *Nhandu*, ambos pertencentes à subfamília Theraphosinae. A sequência conservada encontrada entre as LTx's e RF20, além de nos remeter à alta proximidade taxonômica entre os dois gêneros, pode sugerir uma importância evolutiva compartilhada dessa toxina.

Foi detectada a presença de oito resíduos de cisteína após redução e alquilação de RF20 (figura 23). Na sequência N-terminal parcial obtida verifica-se a presença de seis dos oito resíduos de cisteína. Todas as toxinas que apresentaram similaridade com RF20 possuem esses resíduos conservados na mesma posição, sugerindo que dentre os resíduos não resolvidos encontram-se dois resíduos de cisteína, provavelmente nas

mesmas posições observadas no alinhamento (figura 26). Ainda analisando o alinhamento, observa-se nas LTx's a existência de uma sequência conservada – KLKL – entre os dois últimos resíduos de cisteína, sugerindo que essa sequência possivelmente está presente entre os resíduos não resolvidos de RF20.

As diferenças observadas entre as sequências de RF20 e LTx2 podem resultar em alterações nas propriedades físico-químicas do peptídeo. Três das quatro substituições de LTx2 para RF20 foram de resíduos com propriedades ácidas ou básicas para neutras (D → N, D → T e H → N), o que pode interferir tanto no ponto isoelétrico do peptídeo quanto nas suas interações iônicas. Já a substituição de K12 por P12 pode ter um impacto maior na estrutura terciária da molécula, uma vez que um resíduo apolar tende a buscar regiões menos expostas em ambientes aquosos.



Figura 31. Árvore da subfamília Theraphosinae. Em destaque os gêneros *Nhandu* e *Lasiodora* (retirado de Perez-Miles, 2000).

6.5. Ensaios eletrofisiológicos

A peçonha bruta de *N. coloratovillosus* (1,5 mg) apresentou um efeito irreversível no bloqueio da transmissão dos impulsos nervosos em nervo ciático isolado de rã, não sendo possível observar a formação do potencial de ação após 30

minutos de lavagem da peçonha na câmara-teste (figura 17). O grupo de frações 1 (GF1), que sugerimos que sejam acilpoliaminas, mostrou um leve efeito reversível (figura 18). O comportamento observado revela que GF1 (100 µg/ 400 µL) além de ter reduzido levemente o potencial de ação composto no nervo, também reduziu o tempo de ativação dos canais voltagem-dependentes para Na⁺. Os dois componentes mais abundantes e frequentes nos espectros de massa para GF1 foram os componentes 601,21 e 729,23 m/z (tabela 5, em negrito). Componentes de massas muito similares a essas, as acilpoliaminas APC₆₀₀ e APC₇₂₈, foram detectadas na peçonha bruta de *A. chalcodes*, e revelaram atividade parálitica em larvas de *Manduca sexta* (lepidoptera) com ED₅₀ (1 h) de 0,6 µL/g (Skinner *et al.*, 1990). Possivelmente o efeito observado em nervo ciático de rã corresponde ao efeito neurotóxico observado em larvas de lepidoptera.

Entretanto, não é possível afirmar ao certo quais são os componentes presentes na peçonha de *N. coloratovillosus* responsáveis pelo forte efeito irreversível observado no bloqueio do potencial de ação composto. A partir do fracionamento por RP-HPLC, foram obtidas 35 frações, e somente GF1 e RF20 foram testadas em nervo ciático de rã. É possível que existam outras frações que possuam como alvos moleculares canais para Na⁺ voltagem-dependentes. Diversos peptídeos isolados da peçonha de aranhas da família Theraphosidae apresentam atividade contra diferentes alvos, como ação em canais para K⁺, Ca⁺⁺, Na⁺, além de canais mecano-sensitivos, canais iônicos sensíveis a ácidos e membranas fosfolípídicas (Vassilevski *et al.*, 2009).

Não se verificou efeitos significativos nos ensaios eletrofisiológicos realizados com RF20 nas concentrações testadas (figuras 28 e 29). Entretanto, foi possível observar um pequeno declínio reversível na amplitude do estímulo no ensaio cardiotoxíco utilizando 365 nM de RF20. Por RF20 ter apresentado 90% de identidade com LTx2, uma toxina que interfere nas correntes de Ca⁺⁺ e possivelmente atue em canais para Ca⁺⁺ voltagem-dependentes do tipo-L, era esperado que o peptídeo purificado correspondente a fração 20 apresentasse algum efeito cardiotoxíco (já que canais para Ca⁺⁺ do tipo-L são encontrados em células musculares cardíacas).

Entretanto, os resultados observados no ensaio cardiotoxíco podem ser explicados por algumas hipóteses: (i) possivelmente a concentração de RF20 testada não foi adequada. SNX-482 é um peptídeo antagonista seletivo a canais voltagem-dependentes para Ca^{++} dos tipos-R e -L isolado da peçonha da aranha *Hysteroocrates gigas* (Newcomb *et al.*, 1998). Em concentrações nanomolares (em torno de 40 nM), SNX-482 é capaz de bloquear correntes de Ca^{++} (tipo-R) em nervos neurohipofisais terminais, mas em concentrações maiores (200 – 500 nM) não foi detectado efeito nessas correntes. LTx2 alterou as correntes de Ca^{++} na concentração de 80 μ M, muito superior à quantidade de RF20 testada (Dutra *et al.*, 2008); (ii) RF20 pode ser um bloqueador de canais para Ca^{++} de um tipo específico, e não necessariamente de canais do tipo-L, encontrados principalmente em células musculares cardíacas. Peptídeos de aranhas que bloqueiam especificamente um tipo de canal para Ca^{++} têm sido isolados, como SNX-325 de *Segestria florentina* (Newcomb *et al.*, 1995). Esse peptídeo bloqueia canais para Ca^{++} do tipo-N, mas não demonstra efeitos detectáveis em canais dos tipos -L, -P/-Q e -R. Similarmente, huwentoxina-I (HWTX-I) e huwentoxina-V (HWTX-V) isolados da peçonha de *Haplopelma huwenum* (Zhou *et al.*, 1997) são capazes de inibir canais para Ca^{++} do tipo-N e apenas produzem baixos efeitos em canais do tipo-L (Peng *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006); (iii) a ação neurotóxica de RF20 pode ser específica em canais para Ca^{++} de insetos. Poucos peptídeos com ação específica a canais para Ca^{++} de insetos têm sido isolados da peçonha de aranhas. As ω -atratoxinas Hv2 (*Hadronyche versuta*), Hi2a (*H. infensa*) e As2a (*Atrax* sp.) são peptídeos que apresentam fortes efeitos em canais para Ca^{++} de insetos, não apresentando efeitos significativos nas correntes de Ca^{++} em canais voltagem-dependentes de vertebrados (Wang *et al.*, 2001).

A identidade de 58% observada entre a toxina RF20 e ESTX2 pode indicar uma possível atividade inseticida para RF20, já que ESTX2 apresentou forte efeito inseticida em *Periplaneta americana* (Savel-Niemann, 1989).

Embora as toxinas isoladas da peçonha de aranhas sejam consideradas ferramentas valiosas no estudo de uma variedade de receptores celulares e canais iônicos, em particular os dos vertebrados, tais alvos potenciais de interesse farmacêutico são relevantes somente se seus efeitos ocorrerem em condições

naturais. De fato, as presas naturais das aranhas são geralmente muito diferentes taxonomicamente das células de mamíferos, utilizadas em estudos farmacológicos. Apesar de algumas caranguejeiras predarem vertebrados de pequeno porte, como répteis, anfíbios, roedores, aves e até peixes, o comportamento de predação típico gira em torno de uma dieta baseada principalmente em insetos. Como consequência, a evolução molecular dos componentes da peçonha provavelmente selecionou toxinas que eficientemente apresentam como alvos, células excitáveis do sistema nervoso desses pequenos invertebrados (Escoubas e Rash, 2004).

Avanços em espectrometria de massa e bioquímica de peptídeos aliados a métodos modernos em eletrofisiologia têm permitido o isolamento e a identificação de novos peptídeos de toxinas provenientes da peçonha de diversos animais nos últimos anos. Estes avanços também abriram o campo da pesquisa de peçonha de aranhas, anteriormente inexplorada devido a limitações metodológicas.

7. Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento acerca da composição química da peçonha de *Nhandu coloratovillosus* visando à identificação de componentes bioativos. A partir da combinação das técnicas de cromatografia, espectrometria de massa e eletroforese foi possível conhecer o perfil cromatográfico da peçonha de *N. coloratovillosus*, com eluição de 35 frações. As análises em MALDI-TOF resultaram na detecção de 46 componentes com massas moleculares variando entre 600 e 8500 m/z. O perfil eletroforético identificou duas bandas predominantes com massas moleculares aproximadas de 40 e 90 kDa.

Foi possível determinar a concentração inibitória mínima da peçonha bruta de *N. coloratovillosus* contra as duas linhagens de bactérias testadas. Quatro frações cromatográficas e GF1 também inibiram o crescimento bacteriano, porém não foi possível determinar seus MIC's.

Experimentos por zimografia revelaram que a peçonha bruta de *N. coloratovillosus* possui fraca atividade caseinólítica, enquanto que atividade hialuronidásica foi fortemente detectada utilizando 20 µg de peçonha. O responsável por tal atividade foi identificado e purificado, apresentando aproximadamente 42 kDa. Outras condições podem ser utilizadas para verificar a atividade enzimática, por exemplo, a influência da temperatura e do pH. O gel poderá ainda ser incubado com diferentes inibidores para identificar a qual grupo tais enzimas pertencem.

Muito ainda deve ser esclarecido acerca da atividade neurotóxica detectada na peçonha de *N. coloratovillosus*. Como os componentes testados apresentaram baixo efeito quando comparado à peçonha bruta, acredita-se que existam outros componentes responsáveis pela ação neurotóxica e que o sinergismo entre elas resulte no forte efeito visualizado.

Apenas uma fração foi purificada em quantidade suficiente para realização do seqüenciamento N-terminal. Os resultados por alinhamento revelaram que RF20 apresenta identidade com uma toxina moduladora de canais para Ca⁺⁺ e com toxinas inseticidas. Ensaio em *patch clamp* podem confirmar quais são seus possíveis alvos.

8. Referências Bibliográficas

- ADAMS, M. E. 2004. Agatoxins: ion channel specific toxins from the american funnel web spider *Agelenopsis aperta*. *Toxicon*, **43**: 509 – 525.
- ADAMS, M. E., HEROLD, E. E., VENEMA, V. J. 1989. Two classes of channel specific toxins from funnel web spider venom. *Journal of Comparative Physiology*, **164**: 333 – 342.
- ALMEIDA, F. M., PIMENTA, A. M. C., De FIGUEIREDO, S. G., SANTORO, M. M., MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F., DINIZ, C. R., De LIMA, M. E. 2002. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon*, **40**: 1041 – 1045.
- BARAMAKI, Y., YASUHARA, T., HIGASHIJIMA, T., YOSHIOKA, M., MIWA, A., KAWAI, N., NAKAJIMA, T. 1986. Chemical characterization of spider toxin, JSTX and NSTX. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, **62**: 359 – 362.
- BARAMOVA, E. N., SHANNON, J. D., BJARNASON, J. B., FOX, J. W. 1989. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **275**: 63 – 71.
- BARBARO, K. C., KNYSAK, I., MARTINS, R., HOGAN, C., WINKEL, K. 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon*, **45**: 489 – 499.
- BECHINGER, B. 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1462**: 157 – 183.
- BECHINGER, B. and LOHNER, K. 2006. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**: 1529 – 1539.
- BELOKONEVA, O. S., SATAKE, H., MAL'TSEVA, E. L., PAL'MINA, N. P., VILLEGAS, E., NAKAJIMA, T., CORZO, G. 2004. Pore formation of phospholipid membranes by the action of two hemolytic arachnid peptides of different size. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1664**: 182 – 188.
- BERTANI, R. 2001. Revision, cladistic analysis, and zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*; with notes on other Theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae). *Arquivos de Zoologia*, **36**: 265 – 356.
- BLEAKMAN, A., and SMYTH, D. G. 1987. Sequential processing reactions in the formation of hormone amides. *European Journal of Biochemistry*, **167**: 161 – 165.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**: 93 – 99.
- BOCCI, V., MUSCETOLLA, M., GRASSO, G., MAGYAR, Z., NALDINI, A., SZABO, G. 1986. The lymphatic route. (1) Albumin and hyaluronidase modify the normal distribution of interferon in lymph and plasma. *Experientia*, **15**: 432 – 433.
- BOSMANS, F., RASH, L., ZHU, S., DIOCHOT, S., LAZDUNSKI, M., ESCOUBAS, P., TYTGAT, J. 2006. Four novel tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes. *Molecular Pharmacology*, **69**: 419 – 429.

- BOWMAN, C. L., GOTTLIEB, P. A., SUCHYNA, T. M., MURPHY, Y. M., SACHS, F. 2007. Mechanosensitive Ion Channels and the Peptide Inhibitor GsMTx-4: History, Properties, Mechanisms and Pharmacology. *Toxicon*, **49(2)**: 249 – 270.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248.
- BRODGEN, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, **3**: 238 – 250.
- BROWN, M. R., SHEUMACK, D. D., TYLER, M. I., HOWDEN, M. E. H. 1988. Amino acid sequence of versutoxin, a lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax versutus*. *Biochemical Journal*, **250**: 401 – 405.
- BRUST, A., PALANT, E., CROKER, D. E., COLLESS, B., DRINKWATER, R., PATTERSON, B., SCHROEDER, C. I., WILSON, D., NIELSEN, C. K., SMITH, M. T., ALEWOOD, D., ALEWOOD, P. F., LEWIS, R. J. 2009. χ -Conopeptide Pharmacophore Development: Toward a Novel Class of Norepinephrine Transporter Inhibitor (Xen2174) for Pain. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52(22)**: 6991 – 7002.
- BUDNIK, B. A., OLSEN, J. V., EGOROV, T. A., ANISIMOVA, V. E., GALKINA, T. G., MUSOLYAMOV, A. K., GRISHIN, E. V. ZUBAREV, R. A. 2003. *De novo* sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. *Journal of Mass Spectrometry*, **39(2)**: 193 – 201.
- BULET, P., HETRU, C., DIMARCO, J. L., HOFFMANN, D. 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*, **23**: 329 – 344.
- BULET, P., STÖCKLIN, R., MENIN, L. 2004. Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunology Reviews*, **198**: 169 – 184.
- CALISKAN F., GARCIA B. I., CORONAS F. I., BATISTA C. V., ZAMUDIO F. Z., POSSANI L. D. 2006. Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes. *Toxicon*, **48**: 12 – 22.
- CASTRO, M. S., MATSUSHITA, R. H., SEBEN, A., SOUSA, M. V., FONTES, W. 2005. Hylins: Bombinins H Structurally Related Peptides from the Skin Secretion of the Brazilian Tree-Frog *Hyla biobeba*. *Protein and Peptide Letters*, **12**: 89 – 93.
- CATTERALL, W. A., PEREZ-REYES, E., SNUTCH, T. P., STRIESSNIG, J. 2005. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, **57**: 411 – 425.
- CAVALIERI, M., D'URSO, D., LASSA, A., PIERDOMINICI, E., ROBELLO, M., GRASSO, A. 1987. Characterization and some properties of the venom gland extract of a theridiid spider (*Steatoda paykulliana*) frequently mistaken for black widow spider (*Latrodectus tredecimguttatus*). *Toxicon*, **25**: 965 – 974.
- CESTELE, S. and CATTERALL, W. A. 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, **82**: 883 – 892.
- CHAIM, O. M., SADE, Y. B., DA SILVEIRA, R. B., TOMA, L., KALAPOTHAKIS, E., CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., VEIGA, S. S. 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **211**: 64 – 77.

- CHAN, T. K., GEREN, C. R., HOWELL, D. E., ODELL, G. V. 1975. Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. *Toxicon*, **13**: 61 – 66.
- CHEN, J., DENG, M., HE, Q., MENG, E., JIANG, L., LIAO, Z., RONG, M., LIANG, S. 2008. Molecular diversity and evolution of cystine knot toxins of the tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**: 2431 – 2444.
- CHEN, Y., MEHOK, A. R., MANT, C. T., HODGES, R. S. 2004. Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited. *Journal of Chromatography A*, **1043**: 9 – 18.
- CORZO, G. and ESCOUBAS, P. 2003. Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **60**: 2409 – 2426.
- CORZO, G., BERNARD, C., CLEMENT, H., VILLEGAS, E., BOSMANS, F., TYTGAT, J., POSSANI, L. D., DARBON, H., ALAGÓN, A. 2009. Insecticidal peptides from the theraphosid spider *Brachypelma albiceps*: an NMR-based model of Ba2. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1794(8)**: 1190 – 1196.
- CORZO, G., ESCOUBAS, P., STANKIEWICZ, M., PELHATE, M., KRISTENSEN, C. P., NAKAJIMA, T. 2000. Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-paulatoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paradoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). *European Journal of Biochemistry*, **267**: 5783 – 5795.
- CORZO, G., VILLEGAS, E., GOMEZ-LAGUNAS, F., POSSANI, L. D., BELOKONEVA, O. S., NAKAJIMA, T. 2002. Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 23627 – 23637.
- Da SILVA, P. H., SILVEIRA, R. B., APPEL, M. H., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., VEIGA, S. S. 2004. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*, **44**: 693 – 709.
- Da SILVEIRA, R. B. D., CHAIMA, O. M., MANGILIC, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., VEIGA, S. S. 2007. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- β -N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon*, **49**: 758 – 768.
- Da SILVERA, R. B., FILHO, J. F. S., MANGILI, O. C., VEIGA, S. S., GREMSKI, W., NADER, H. B., DIETRICH, C. P. 2002. Identification of proteases in extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon*, **40**: 815 – 822.
- DAFFRE, S., MIRANDA, A., MIRANDA, M. T. M., BULET, P., SILVA JR, P. I., MACHADO, A., FOGAÇA, A. C., LORENZINI, D. M., PEREIRA, L. S., FÁZIO, M. A., ESTEVES, E., BURGIERMAN, M. R. 2001. Peptídeos antibióticos: peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. *Biotechnologia, Ciência & Desenvolvimento*, **23**: 48 – 55.
- DEVARAJA, S., NAGARAJU, S., MAHADESWARASWAMY, Y. H., GIRISH, K. S., KEMPARAJU, K. 2008. A low molecular weight serine protease: Purification and characterization from *Hippasa agelenoides* (funnel web) spider venom gland extract. *Toxicon*, **52**: 130 – 138.
- DIOCHOT, S., DRICI, M. D., MOINIER, D., FINK, M., LAZDUNSKI, M. 1999. Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis. *British Journal of Pharmacology*, **126**: 251 – 263.

- DUBOVSKII, P. V., VOLYNSKY, P. E., POLYANSKY, A. A., CHUPIN, V. V., EFREMOV, R. G., ARSENIIEV, A. S. 2006. Spatial Structure and Activity Mechanism of a Novel Spider Antimicrobial Peptide. *Biochemistry*, **45**: 10759 – 10767.
- DUBOVSKII, P. V., VOLYNSKY, P. E., POLYANSKY, A. A., KARPUNIN, D. V., CHUPIN, V. V., EFREMOV, R. G., ARSENIIEV, A. S. 2008. Three-Dimensional structure/hydrophobicity of laticins specifies their mode of membrane activity. *Biochemistry*, **47**: 3525 – 3533.
- DUTRA, A. A. 2006. Clonagem e expressão do cDNA codificante para a toxina do veneno de *Lasiodora* sp. LTx2, em vetor de expressão pET11a. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em ciências biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.
- DUTRA, A. A., SOUSA, L. O., RESENDE, R. R., BRANDÃO, R. L., KALAPOTHAKIS, E., CASTRO, M. I. 2008. Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiodora* sp. effecting on calcium channels. *Peptide*, **29**: 1505 – 1515.
- EBBINGHAUS, J., LEGROS, C., NOLTING, A., GUETTE, C., CELERIER, M. L., PONGS, O., BAHRING, R. 2004. Modulation of Kv4. 2 channels by a peptide isolated from the venom of the giant bird-eating tarantula *Theraphosa leblondi*. *Toxicon*, **43**: 923 – 932.
- ESCOUBAS, P. and RASH, L. 2004. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, **43**: 555 – 574.
- ESCOUBAS, P., CÉLÉRIER, M. I., ROMI-LEBRUN, R., NAKAJIMA, T. 1997. Two novel peptide neurotoxins from the venom of the tarantula *Lasiodora parahybana*. *Toxicon*, **35**: 805 – 806.
- ESCOUBAS, P., CORZO, G., WHITELEY, B. J., CELERIER, M. L., NAKAJIMA, T. 2002. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **16**: 403 – 413.
- ESCOUBAS, P., CORZO, G., WHITELEY, B. J., CÉLÉRIER, M. L., NAKAJIMA, T. 1999. HPLC and MALDI-TOF-MS study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms. Proceedings of the 5th Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, 37.
- ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CORZO, G. 2000. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochemistry*, **82**: 893 – 907.
- ESCOUBAS, P., SOLLOD, B., KING, G. F. 2006. Venom landscapes: Mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*, **47**: 650 – 663.
- ESCOUBAS, P., WHITELEY, B. J., KRISTENSEN, C. P., CÉLÉRIER, M. L., CORZO, G., NAKAJIMA, T. 1998. Multidimensional peptide fingerprinting by High Performance Liquid Chromatography, Capillary Zone Electrophoresis and Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry for the identification of tarantula venom samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **12**: 1075 – 1084.
- ESKAFI, F. M. and NORMENT, B. R. 1976. Physiological action of *Loxosceles reclusa* venom on insect larvae. *Toxicon*, **14**: 7 – 12.
- ESTRADA, G., VILLEGAS, E., CORZO, G. 2007. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Natural Product Reports*, **24**: 145 – 161.

- FATEHI, M., ROWAN, E. G., HARVEY, A. L., MOYA, E., BLAGBROUGH, I. S. 1997. Polyamine FTX-3.3 and polyamine amide sFTX-3.3 inhibit presynaptic calcium currents and acetylcholine release at mouse motor nerve terminals. *Neuropharmacology*, **36**: 185 – 194.
- FEITOSA, L., GREMSKI, W., VEIGA, S. S., ELIAS, M. C. Q. B., GRANER, E., MANGILI, O. C., BRENTANI, R. R. 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon*, **36**: 1039 – 1105.
- FLETCHER, J. I., SMITH, R., O'DONOGHUE, S. I., NILGES, M., CONNOR, M., HOWDEN, M. E., CRISTIE, M. J., KING, G. F. 1997. The structure of a novel insecticidal neurotoxin, omega-atracotoxin-Hv1, from the venom of an Australian funnel web spider. *Nature Structural & Molecular Biology*, **4**: 559 – 566.
- FUTRELL, J. 1992. Loxoscelism. *American Journal of Medical Sciences*, **304**: 261 – 267.
- GENTZ, M. C., JONES, A., CLEMENT, H., KING, G. F. 2009. Comparison of the peptidome and insecticidal activity of venom from a taxonomically diverse group of theraphosid spiders. *Toxicon*, **53**: 496 – 502.
- GEREN, C. R., CHAN, T. K., WARB, B. C., HOWELL, D. E., PINKSTON, K., ODELL, G. V. 1973. Composition and properties of extract of fiddleback (*Loxosceles reclusa*) spider venom apparatus. *Toxicon*, **11**: 471 – 479.
- GIRISH, K. S., JAGADEESHA, D. K., RAJEEV, K. B., KEMPARAJU, K. 2002. Snake venom hyaluronidase: an evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **240**: 105 – 110.
- GRISHIN, E. 1999. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. *European Journal of Biochemistry*, **264**: 276 – 280.
- GRISHIN, E. V., VOLKOVA, T. M., ARSENIYEV, A. S., RESHETOVA, O. S., ONOPRIENKO, V. V., MAGAZANIC, L. G., ANTONOV, S. M., FEDOROVA, I. M. 1986. Structure-functional characterization of Argiope – an ion channel blocker from the venom of spider *Argiope lobata*. *Bioorganicheskaya Khimiya*, **12**: 1121 – 1124.
- GUETTE, C., LEGROS, C., TOURNOIS, G., GOYFFON, M., CÉLÉRIER, M. L. 2006. Peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of the *Lasiodora parahybana* tarantula venom gland. *Toxicon*, **47**: 640 – 649.
- HAEBERLI, S., KUHN-NENTWIG, L., SCHALLER, J., NENTWIG, W. 2000. Characterisation of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Toxicon*, **38**: 373 – 380.
- HANCOCK, R. E. W. and DIAMOND, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*, **8**: 402 – 410.
- HANCOCK, R. E. W., BROWN, K. L., MOOKHERJEE, N. 2006. Host defense peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology*, **211**: 315 – 322.
- HAUPT, J. 2003. The Mesothelae – a monograph of an exceptional group of spiders (Araneae: Mesothelae). *Zoology (Stuttgart)*, **154**: 1 – 101.
- HE, K., LUDTKE, S. J., WORCESTER, D. L., HUANG, H. W. 1996. Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophysical Journal*, **70**: 2659 – 2666.

- HORNI, A., WEICKMANN, D., HESSE, M. 2001. The main products of the low molecular mass fraction in the venom of the spider *Latrodectus menavodi*. *Toxicon*, **39**: 425 – 428.
- HUMPHREY, W., DALKE, A., SCHULTEN, K. 1996. “VMD – Visual Molecular Dynamics”. *Journal of Molecular Graphics*, **14**: 33 – 38.
- JONG, Y. S., NORMENT, B. R. HEITZ, J. R. 1979. Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa* protease enzyme activity. *Toxicon*, **16**: 529 – 537.
- JOO, H. S., PARK, G. C., CHO, W. R., TAK, E., PAIK, S. R., CHANG, C. S. 2002. Purification and characterization of a prothrombin-activating protease from *Nephila clavata*. *Toxicon*, **40(3)**: 289 – 296.
- JUNG, H. J., KIM, P., LEE, S. K., LEE, C. W., EU, Y., LEE, D. G., EARM, Y., KIM, J. 2006. Lipid membrane interaction and antimicrobial activity of GsMTx-4, an inhibitor of mechanosensitive channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **340**: 633 – 638.
- KAISER, I. I., GRIFFIN, P. R., AIRD, S. D., HUDIBURG, S., SHABANOWITZ, J., FRANCIS, B., JOHN, T. R., HUNT, D. F., ODELL, G. V. 1994. Primary structures of two proteins from the venom of the Mexican red knee tarantula (*Brachypelma smithii*). *Toxicon*, **32**: 1083 – 1093.
- KIM, J. I., KONISHI, S., IWAI, H., KOHNO, T., GOUDA, H., SHIMADA, I., SATO, K., ARATA, Y. 1995. Three-dimensional Solution Structure of the Calcium Channel Antagonist [omega]-Agatoxin IVA: Consensus Molecular Folding of Calcium Channel Blockers. *Journal of Molecular Biology*, **250**: 659 – 671
- KOZLOV, S. A., VASSILEVSKI, A. A., FEOFANOV, A. V., SUROVOY, A. Y., KARPUNIN, D. V., GRISHIN, E. V. 2006. Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**: 20983 – 20992.
- KREIL, G. 1995. Hyaluronidases—a group of neglected enzymes. *Protein Science*, **4**: 1666 – 1669.
- KUHN-NENTWIG, L. 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **60(12)**: 2651 – 2668.
- KUHN-NENTWIG, L., SCHALLER, J., NENTWIG, W. 1994. Purification of toxic peptides and the aminoacid sequence of CSTX-1 from the multicomponent venom of *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Toxicon*, **32**: 287 – 302.
- KUHN-NENTWIG, L., SCHALLER, J., NENTWIG, W. 2004. Biochemistry, toxicology and ecology of the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Toxicon*, **43(5)**: 543 – 553.
- KUHN-NENTWIG, L., MULLER, J., SCHALLER, J., WALZ, A., DATHE, M., NENTWIG, W. 2002. Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *The Journal of Biological Chemistry*, **277(13)**: 11208 – 11216.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680 – 685.
- LAMPE, R. A., DEFEO, P. A., DAVISON, M. D., YOUNG, J., FERMAN, J. L., SPREEN, R. C., HORN, M. B., MANGONO, T. J., KEIT, R. A. 1993. Isolation and pharmacological characterization of ω-gammatoxin SIA, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium channels responses. *Molecular Pharmacology*, **44**: 451 – 460.

- LAURENT, T. C. 1989. *The Biology of Hyaluronan*. Wiley, New York.
- LAURENT, T. C. and FRASER, J. R. E. 1986. The properties and turnover of hyaluronan. In: Evered, D., Whelan, J. (Eds.), *Functions of the Proteoglycans*. Wiley, London.
- LAURENT, T. C. and FRASER, J. R. E. 1992. Hyaluronan. *The FASEB Journal*, **6**: 2397 – 2404.
- LEWIS, R. J. and GARCIA, M. L. 2003. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**: 790 – 802.
- LIU, M., NAKAZAWA, K., INOUE, K., OHNO, Y. 1997. Potent and voltage-dependent block by philanthotoxin-343 of neuronal nicotinic receptor/channels in PC12 cells. *British Journal of Pharmacology*, **122**: 379 – 385.
- LIU, Z., DAI, J., DENG, M., HU, Z., HU, W., LIANG, S. J. 2006. Function and solution structure of huwentoxin-X, a specific blocker of N-type calcium channels, from the chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**: 8628 – 8635.
- LONGENECKER, H. E., HURLBUT, W. P., MAURO, A., CLARK, A. W. 1970. Effects of black widow spider venom on the frog neuromuscular junction. Effects on end-plate potential, miniature end-plate potential and nerve terminal spike. *Nature*, **225**: 701 – 703.
- LUCAS, S. 1983. Descrição de gênero e espécie novos da subfamília Theraphosinae (Araneae, Orthogathata, Theraphosidae). *Memórias do Instituto Butantan*, **44/45**: 157 – 160.
- LUCIANO, M. N., SILVA, P. H., CHAIM, O. M., SANTOS, V. P., FRANCO, C. R. C., SOARES, M. F. S., ZANATA, S. M., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., VEIGA, S. S. 2004. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on renal tissue. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **52**: 455 – 467.
- MACHADO, L. F., LAUGESEN, S., BOTELHO, E. D., RICART, C. A., FONTES, W., BARBARO, K. C., ROEPSTORFF, P., SOUSA, M. V. 2005. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics*, **5**: 2167 – 2176.
- MARTIN, W., LEWIS, R. J., PALANT, E., BRUST, A., COLLESS, B., SCHMIDT, P., DRINKWATER, R., STEAMS, L. J., COUSINS, M., GOUGE, R., HUGHES, D., RAUCK, R., DAY, D., NIELSON, C., SMITH, M. T. 2009. Development of XEN2174 and an escalating safety and tolerability study of intrathecal use in oncology patients. In: LEBL, Michal. Proceedings of the twenty-first American peptide symposium. *Michal Lebl Peptides Breaking Away*, **301**: 7 – 12.
- MARTIN-MOUTOT, N., MANSUELLE, P., ALCARAZ, G., DOS SANTOS, R. G., CORDEIRO, M. N., DE LIMA, M. E., SEAGAR, M., VAN RENTERGHEM, V. 2006. *Phoneutria nigriventer* toxin 1: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with μ -conotoxin binding sites. *Molecular Pharmacology*, **69**: 1931 – 1937.
- MARUYAMA, M., SUGIKI, M., YOSHIDA, E., SHIMAYA, K., MIHARA, H. 1992. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in hemorrhage. *Toxicon*, **30**: 1387 – 1397.
- MARVIN, L., DE, E., COSETTE, P., GAGNON, J., MOLLE, G., LANDE, C. 1999. Isolation, amino acid sequence and functional assays of SGTx1: the first toxin purified from the venom of the spider *Scodra griseipes*. *European Journal of Biochemistry*, **265**: 572 – 579.
- MCCORMICK, K. D. and MEINWALD, J. 1993. Neurotoxic acylpoliamines from spider venoms. *Journal of Chemical Ecology*, **19(10)**: 2411 – 2451.

- MENZEL, E. J. and FARR, C. 1998. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Letters*, **131**: 3 – 11.
- MEYER, K. 1971. Hyaluronidases. *In*: In the Enzymes, 3rd ed. Boyer, P.D. (Ed.). **vol. V**. Academic press, New York, 307 – 320.
- MINTZ, I. M., VENEMA, V. J., SWIDEREK, K. M., LEE, T. D., BEAN, B. P., ADAMS, M. E. 1992. P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-aga IVA. *Nature*, **355**: 827 – 829.
- MIURA, R. O., YAMAGATA, S., MIURA, Y., HARADA, T., YAMAGATA, T. 1995. Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). *Analytical Biochemistry*, **225**: 333 – 340.
- MORTON, C. O., DOS SANTOS, S. C., COOTE, P. 2007. Na amphibian-derived, cationic, alpha-helical antimicrobial peptide kills yeast by caspase-independent but AIF-dependent programmed cell death. *Molecular Microbiology*, **65**: 494 – 507.
- MOUHAT, S., JOUIROU, B., MOSBAH, A., DE WAARD, M., SABATIER, J. M. 2004. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochemical Journal*, **378**: 717 – 726.
- NAGARAJU, S., DEVARAJA, S., KEMPARAJU, K. 2007. Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. *Toxicon*, **50**: 383 – 393.
- NAGARAJU, S., MAHADESHWARA, Y. H., GIRISH, K. S., KEMPARAJU, K. 2006. Venom from spiders of the genus *Hippasa*: biochemical and pharmacological studies. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **144**: 1 – 9.
- NASCIMENTO, A. C. C., FONTES, W., SEBEN, A., CASTRO, M. S. 2003. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein & Peptide Letters*, **10**: 227 – 238.
- NASCIMENTO, A., CHAPEAUROUGE, A., PERALES, J., SEBEN, A., SOUSA, M. V., FONTES, W., CASTRO, M. S. 2007. Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus ocellatus*. *Toxicon*, **50**: 1095 – 1104.
- NEWCOMB, R., PALMA, A., FOX, J., GAUR, S., LAU, K., CHUNG, D., CONG, R., BELL, J. R., HORNE, B., NADASDI, L., RAMACHANDRAN, J. 1995. SNX-325, A novel calcium antagonist from the spider *Segestria frorentina*. *Biochemistry*, **34**: 8341 – 8347.
- NEWCOMB, R., SZOKE, B., PALMA, A., WANG, G., CHEN, X. H., HPKINS, W., CONG, R., MILLER, J., URGE, L., TARCZY-HORNOCH, K., LOO, J. A., DOOLEY, D. J., NADASDI, L., TSIEN, R. W., LEMOS, J., MILJANICH, G. 1998. Selective peptide antagonist of the class e calcium channel from the venom of the tarantula *Hysteroocrates gigas*. *Biochemistry*, **37**: 15353 – 15362.
- NICHOLSON, G. M. 2006. Spider venoms peptides. *In*: Kastin, A. J. (Ed.), Handbook of Biologically Active Peptides. Academic Press, San Diego CA, pp. 389 – 399.
- NOMURA, K. and CORZO, G. 2006. The effect of binding of spider-derived antimicrobial peptides, oxyopinins, on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**: 1475 – 1482.
- OREN, Z. and SHAI, Y. 1998. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, **47**: 451 – 463.

- OSWALD, R. E., SUCHYNA, T. M., MCFEETERS, R., GOTTLIEB, P., SACHS, F. 2002. Solution Structure of Peptide Toxins That Block Mechanosensitive Ion Channels. *The Journal of Biological Chemistry*, **37**: 34443 – 34450.
- PARK, S. P., KIM, B. M., KOO, J. Y., CHO, H., LEE, C. H., KIM, M., NA, H. S., OH, U. 2008. A tarantula spider toxin, GsMTx-4, reduces mechanical and neuropathic pain. *Journal of the International Association for the Study of Pain*, **137(1)**: 208 – 217.
- PENG, K., CHEN, X. D., LIANG, S. P. 2001. The effect of Huwentoxin-I on Ca⁺⁺ channels in differentiated NG108-15 cells, a patch-clamp study. *Toxicon*, **39**: 491 – 498.
- PENG, K., SHU, Q., LIU, Z., LIANG, S. 2002. Function and solution structure of huwentoxin-IV, a potent neuronal tetrodotoxin (TTX)-sensitive sodium channel antagonist from chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *Journal of Biology Chemistry*, **277**: 47564 – 47571.
- PEREZ-MILES, F. 2000. *Iracema cabocla* – new genus and species of a Theraphosid spider from Amazonic Brazil (Araneae, Theraphosinae). *Journal of Arachnology*, **28(2)**: 141 – 148.
- PERRET, B. A. 1977. Proteolytic activity of tarantula venoms due to contamination with saliva. *Toxicon*, **15**: 505 – 510.
- PIMENTA, A. M. C., STOCKLIN, R., FAVREAU, P., BOUGIS, P. E., MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. 2001. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones Buthidae). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **15**: 1562 – 1572.
- PLATNICK, N. I. 2010. *The World Spider Catalog, Version 10.0*, American Museum of Natural History, New York, 2009, online em <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html> - em 20/05/2010.
- POUNY, Y., RAPAPORT, D., MOR, A., NICOLAS, P., SHAI, Y. 1992. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, **31(49)**: 12416 – 12423.
- QUISTAD, G. B., REUTER, C. C., SKINNER, W. S., DENNIS, P. A., SUWANRUMPHA, S., FU, E. W. 1991. Paralytic and insecticidal toxins from the funnel web spider, *Hololena curta*. *Toxicon*, **29**: 329 – 336.
- RASH, L. D. and HODGSON, W. C. 2002. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, **40**: 225 – 254.
- RASH, L. D., KING, R. G., HODGSON, W. C. 1998. Evidence that histamine is the principal pharmacological component of venom from an Australian wolf spider (*Lycosa godeffroyi*). *Toxicon*, **36**: 367 – 375.
- RAVEN, R. J. 1985. The spider infraorder Mygalomorphae (Araneae). Cladistics and systematics. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **182**: 1 – 180.
- RICHARDSON, M., PIMENTA, A. M. C., BEMQUERER, M. P., SANTORO, M. M., BEIRAO, P. S. L., LIMA, M. E., FIGUEIREDO, S. G., BLOCH Jr, C., VASCONCELOS, E. A. R., CAMPOS, F. A. P., GOMES, P. C., CORDEIRO, M. N. 2006. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **142**: 173 – 187.
- ROCHA e SILVA, T. A. A., SUTTI, R., HYSLOP, S. 2009. Milking and partial characterization of venom from the Brazilian sider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon*, **53**: 153 – 161.

- SAVEL-NEIMANN, A. 1989. Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multicomponent system. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **370**: 485 – 498.
- SCHMIDT, G. 1998. *Brazilopelma coloratovillosum* gen. et sp. n. (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae), eine lange verkannte Vogelspinne. [*Brazilopelma coloratovillosum* gen. et sp. n. (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae), a long unrecognized tarantula.] *Arachnology Magazine*, **6(4)**: 1 – 6.
- SCOTT, R. H., THATCHER, N. M., AYAR, A., MITHELL, S. J., POLLOCK, J., GIBSON, M. T., DUCE, I. R., MOYA, E., BLAGBROUCH, I. S. 1998. Extracellular or intracellular application of argiotoxin-636 has inhibitory actions on membrane excitability and voltage-activated current in cultured rat sensory neurons. *Neuropharmacology*, **37**: 1563 – 1578.
- SHAI, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1462**: 55 – 70.
- SHEUMACK, D. D., BALDO, B. A., CARROLL, P. R., HAMPSON, F., HOEDEN, M. E. H., SKORULIS, A. 1984. A comparative study of properties and toxic constituents of funnel web spider (*Atrax*) venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **78C**: 55 – 68.
- SHEUMACK, D. D., CLAASSENS, R., WHITELEY, N. M., HOWDEN, M. E. H. 1985. Complete amino acid sequence of a new type of lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax robustus*. *FEBS Letters*, **181**: 154 – 156.
- SILVA JR., P., DAFFRE, S., BULET, P. 2000. Isolation and Characterization of gomesin, an 18 residue cysteine rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horsehoe crab antimicrobial peptides of the Tachyplesin family. *The Journal of Biological Chemistry*, **43**: 33464 – 33470.
- SKINNER, W. S., ADAMS, M. E., QUISTAD, G. B., KATAOKA, H., CESARIN, B. J., ENDERLIN, F. E., SCHOOLEY, D. A. 1989. Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider *Agelenopsis aperta*. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**: 2150 – 2155.
- SKINNER, W. S., DENNIS, P. A., LUI, A., CARNEY, R. L., QUISTAD, G. B. 1990. Chemical characterization of acylpolyamine toxins from venom of a trap-door spider and two tarantulas. *Toxicon*, **28**: 541 – 546.
- SMITH, K. J., SKELTON, H. G., TURIANSKY, G., WAGER, K. F. 1997. Hyaluronidase enhances the therapeutic effect of vinblastine in intralesional treatment of Kaposi's sarcoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **36**: 239 – 242.
- STAPLETON, A., BLANKENSHIP, D. T., ACKERMANN, B. L., CHEN, T. M., GORDER, G. W., MANLEY, G. D., PALFREYMAN, M. G., COUTANT, J. E., CARDIN, A. D. 1989. Curtatoxins: neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from the funnel-web spider *Hololena curta*. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**: 2150 – 2059.
- STROMGAARD, K., ANDERSEN, K., KROGSGAARD-LARSEN, P., JAROSZEWSKI, J. W. 2001. Recent Advances in the Medicinal Chemistry of Polyamine toxins. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **1**: 317 – 338.
- STRONG, P. N., SMITH, J. T., KEANA, J. F. W., 1973. A convenient bioassay for detecting nanomolar concentrations of tetrodotoxin. *Toxicon*, **11**: 433 – 438.

- SUTTON, K. G., SIOK, C., STEA, A., ZAMPONI, G. W., HECK, S. D., VOLKMANN, R. A., ANLIJANIAN, M. K., SNUTCH, T. P. 1998. Inhibition of neuronal calcium channels by a novel peptide spider toxin, DW13.3. *Molecular Pharmacology*, **54**: 407 – 418.
- SWANSON, D. L. and VETTER, R. S. 2006. Loxoscelism. *Clinics in Dermatology*, **24**: 213 – 221.
- SWARTZ, K. J. and MACKINNON, R. 1995. An inhibitor of the K_v 2.1 Potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron*, **15**: 941 – 949.
- TAKAHASHI, H., KIM, J. I., MIN, H. J., SATO, K., SWARTZ, J. K., SHIMADA, I. 2000. Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels: common surface features of gating modifier toxins. *Journal of Molecular Biology*, **297(3)**: 771 – 780.
- TAN, N. and PONNUNDARAI, H. 1992. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **103C**: 299 – 302.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673 – 4680.
- UCHITEL, O. D. 1997. Toxins affecting calcium channels in neurons. *Toxicon*, **35(8)**: 1161 – 1191.
- USHERWOOD, P. N. R., DUCE, I. R., BODEN, P. 1984. Slowly-reversible block of glutamate receptor channels by venoms of the spiders *Argiope trifasciata* and *Araneus gemma*. *The Journal of Physiology*, **79**: 241 – 245.
- USMANOV, P. B., KALIKULOV, D., SHADYEVA, N. G., TASHMUKHAMEDOV, B. A. 1983. Effects of *Argiope lobata* spider venom on the glutamatergic and cholinergic synapses. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, **273**: 1017.
- VASSILEVSKI, A. A., KOZLOV, S. A., GRISHIN, E. V. 2009. Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry*, **74 (13)**: 1505 – 1534.
- VASSILEVSKI, A. A., KOZLOV, S. A., SAMSONOVA, O. V., EGOROVA, N. S., KARPUNIN, D. V., PLUZHNIKOV, K. A., FEOFANOV, A. V., GRISHIN, E. V. 2008. Cyto-insectotoxins, a novel class of cytolytic and insecticidal peptides from spider venom. *Biochemical Journal*, **411(3)**: 687 – 696.
- VASSILEVSKI, A. A., KOZLOV, S. A., ZHMAK, M. N., KUDELINA, I. A., DUBOVSKY, P. V., SHATURSKY, O. Y., ARSENIYEV, A. S., GRISHIN, E. V. 2007. Synthetic analogues of antimicrobial peptides from the venom of the Central Asian spider *Lachesana tarabaei*. *Bioorganicheskaya Khimiya*, **33**: 405 – 412.
- VEIGA, S. S., DA SLIVEIRA, R. R., DREYFUSS, J. L., HAOACH, J., PEREIRA, A. M., MANGILI, O. C., GREMSKI, W. 2000b. Identification of high molecular weight serine proteases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. *Toxicon*, **38**: 825 – 839.
- VEIGA, S. S., FEITOSA, L., SANTOS, V. L. P., De SOUZA, G. A., RIBEIRO, A. S., MANGILI, O. C., PORCIONATTO, M. A., NADER, H. B., DIETRICH, C. P., GRENTANI, R. R., GREMSKI, W. 2000a. Effect of *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom on basement membrane structures. *Histochemical Journal*, **32**: 397 – 408.
- VEIGA, S. S., GREMSKI, W., SANTOS, V. L. P., FEITOSA, L., MANGILI, O. C., NADER, G. B., DIETRICH, C. P., BRENTANI, R. R. 1999. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon*, **37**: 587 – 607.

- VETTER, R. S. and ISBISTER, G. K. 2008. Medical aspects of spider bites. *Annual Review of Entomology*, **53**: 409 – 429.
- VIEIRA, A. L., MOURA, M. B., BABA, E. H., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., KALAPOTHAKIS, E., CASTRO, I. M. 2004. Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiadora* sp. *Toxicon*, **44**: 949 – 952
- VILLEGAS, E. and CORZO, G. 2005. Pore forming peptides from Spiders. *Toxin Reviews*, **24**: 347 – 359.
- VIZZOTTO, C. S. 2009. Isolamento e caracterização de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira *Lasiadora* sp. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília.
- WANG, X. H., CONNOR, M., WILSON, D., WILSON, H. I., NICHOLSON, G. M., SMITH, R., SHAW, D., MACKAY, J. P., ALEWOOD, P. F., CHRISTIE, M. J., KING, G. F. 2001. Discovery and structure of a potent and highly specific blocker of insect calcium channels. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 40306 – 40312.
- XU, K., JI, Y., QU, X. 1989. Purification and characterisation of an antibacterial peptide from venom of *Lycosa singoriensis*. *Acta Zoologica Sinica*, **35**: 300 – 305.
- XU, X., WANG, X., XI, X., LIU, J., HUANG, J., LU, Z. 1982. Purification and partial characterization of hyaluronidase from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon*, **20**: 973 – 981.
- YAN, L. and ADAMS, M. E. 1998. Lycotoxins, antimicrobial peptides from the venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *The Journal of Biological Chemistry*, **273(4)**: 2059 – 2066.
- YEAMAN, M. R. and YOUNT, N. Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptides action and resistance. *Pharmacological Reviews*, **55**: 27 – 55.
- YOUNG, A. R. and PINCUS, S. J. 2001. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotizing arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon*, **39**: 391 – 400.
- ZANETTI, V. C., Da SILVERIA, R. B., DREYFUSS, J. L., HAOACH, J., MANGILI, O. C., VEIGA, S. S., GREMSKI, W. 2002. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, **13**: 135 – 148.
- ZASLOFF, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**: 389–395.
- 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*, **35(1)**: 39 – 45.