



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



Isolamento e caracterização de compostos
bioativos da peçonha da aranha caranguejeira
Lasiadora sp.

Carla Simone Vizzotto

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação
em Biologia Animal como
requisito parcial para a
obtenção do título de mestre
em Biologia Animal

Orientador: Osmino Rodrigues Pires Jr.

Brasília, 2009

“Um diamante é um pedaço de carvão que se saiu bem sob pressão”

(Autor desconhecido)

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

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por todas as coisas, por ter concedido a mim a graça da Fé e Perseverança.

À minha mãe, que sempre foi meu porto seguro.

À minha família, que sempre esteve comigo nesta caminhada apoiando, incentivando, compreendendo as ausências, confortando, cobrando, rindo, chorando... enfim, mesmo quando longe, se faziam presentes. A minha irmã pelas longas conversas que nos deixavam aliviadas.

Ao meu orientador e amigo Osmino R. Pires Jr. pelos conselhos, incentivo e puxões de orelhas.

À Tatá, amiga desde a graduação, anos de paciência comigo, lanches e conversas produtivas, improdutivas, fofocas, trabalho, namorados, mestrados, doutorados, obrigado pela presença sempre.

Ao Rafa Melani, Polly e Luisa, sem vocês não haveria veneno de aranha, tubos secos, multirão de cromatografias, obrigada!

À Fernanda, minha querida estagiária, que muitas vezes deixei desorientada.

À Janaína Emanuelle pelas conversas nos horários mais estranhos no laboratório.

À Carol Barbosa, Andréa, Natiela e Prof. Carlos Schwartz pelas várias ajudas e conversas.

À Sol e Sheiloka pelo companheirismo nas mais doidas disciplinas.

Ao Leandro, Pedro Ivo, Núbia Estér, Rafael Felix pelas companhias para almoço, risadas e conversas.

Ao professor Marcelo Valle, por ter aberto o Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas-UnB para a realização de grande parte do nosso trabalho.

À professora Mariana Castro, pelo apoio e co-orientação, ensinamentos sobre espectrometria de massa e ensaios antimicrobianos e hemolítico e dicas de trabalho.

À todo o pessoal do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas - UnB. Ao Nuno pela paciência e dedicação nas análises de espectrometria de massa. Ao Jimmy que me ensinou os primeiros passos no MALDI. À Elaine

pela ajuda com os ensaios antimicrobianos e hemolíticos. Ao Rayner pela paciência e atenção todas as milhões de vezes que precisei da sua ajuda.

À Aline pela atenção, ensinamentos e compartilhamento de informações sobre aranhas e seus venenos problemáticos. A Carla Tatiana, pelas conversas, apoio e desesperos nos inúmeros ensaios de MIC e disciplinas.

Ao Dr. Lourival Possani, por ceder o seu laboratório na UNAM (Cuernavaca, México) para a realização dos ensaios eletrofisiológicos.

À Dra. Rita Restano, pelo auxílio na realização de ensaios em *pach clamp*.

Ao Dr. Fernando Zamudio, pelo auxílio na obtenção das seqüências peptídicas por degradação de Edman.

Ao professor Paulo César Motta, pelo apoio e manutenção das aranhas no laboratório de aracnídeos.

À minha segunda família em Brasília, tio Nills, tia Ceny, tio Mica e Évelin, muito mais que abrigo, agradeço ao carinho.

Ao Licurgo, que chegou em meio a essa turbulenta caminhada mas que sempre me incentivou e apoiou, pelo carinho e bons momentos vividos.

À Évelin, Letícia e Simone, pela amizade sincera, pelo apoio, compreensão e carinho.

À Belinha, amiga desde sempre, e ao Sílvio, inestimável tudo que já fizeram por mim.

À Gigi, que me ensinou que a vida é uma só e tem que ser bem vivida.

Às amigas de Formosa, Liane, pelas conversas sobre tudo. Cris, Helen, Marina, pelas mensagens.

Ao meu grupo de dança, foram muitas boas experiências com vocês ao longo desse período. Paulo e Zé Maria, amigos de muitas histórias e risadas.

Aos amigos do colégio Marista, muitos ensinamentos na vida profissional e muitas risadas também na divertida “hora dedicada aos amigos”.

Aos novos amigos da UnB-FCE (Ceilândia) e CED2 (Brazlândia).

Agradeço a todos, afinal, a melhor parte de todas as conquistas é ter com quem dividí-las.

Resumo

A peçonha de aranhas constitui-se como um conjunto diverso de moléculas bioativas, usado para subjugar a presa e eventualmente para defesa. Essas moléculas atuam de formas variadas em muitos sistemas biológicos e despertam interesse pelo seu potencial para a prospecção de produtos naturais. Pouco se sabe sobre as peçonhas de aranhas caranguejeiras do Brasil. Este estudo apresenta a caracterização de componentes da peçonha de *Lasiadora* sp. bem como sua atividade biológica.

Foram detectados 191 componentes na peçonha de *Lasiadora* sp. com predominância de componentes com massa molecular menor que 1000 Da e entre 4000 e 8500 Da. A atividade cardiotoxica foi atribuída aos componentes de baixo peso molecular da peçonha. Quatro peptídeos tiveram sua estrutura primária parcialmente elucidada. A análise de similaridade desses peptídeos isolados e caracterizados sugeriu a atividade em canais iônicos, que não foi detectada nos ensaios eletrofisiológicos. A peçonha bruta de *Lasiadora* sp. inibiu de maneira significativa o crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A atividade antibacteriana foi identificada em oito frações cromatográficas e em um grupo de frações com baixa massa molecular (JL1), sendo que não foi possível a determinação de MIC.

Este estudo contribui para a compreensão da diversidade e complexidade da peçonha da aranha *Lasiadora* sp., bem como preenche lacunas até então não esclarecidas para essa espécie.

Abstract

The spider venom is a diverse set of bioactive molecules, used to subdue the prey and possibly for defense. These molecules act in various forms in many biological systems and arouse interest in its potential for the exploration of natural products. Little is known about the Tarantula venoms from Brazil. This study presents the characterization of components from the venom of *Lasiadora* sp. and its biological activity.

We identified 191 molecular mass components in the *Lasiadora* sp. venom, with prevalence of components smaller than 1000 Da and between 4000 and 8500 Da. The cardiotoxic activity was attributed to low molecular weight components. Four peptides had their primary structure partially elucidated. The analysis of similarity of these isolated and characterized peptides suggest activity on ion channels, which was not detected in the electrophysiological testing. The *Lasiadora* sp. crude venom significantly inhibited the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth. The antibacterial activity was identified in eight chromatographic fractions, and in a group of low molecular weight fractions (JL1), which was not possible to determine MIC.

This study contributes to understanding the diversity and complexity of the venom of the spider *Lasiadora* sp. and then fills gaps unclear for this species.

ÍNDICE GERAL

1. Introdução.....	1
1.1. Peçonhas de Aranhas Caranguejeiras.....	1
1.2. Canais iônicos.....	2
1.2.1. Poliaminas atuando em canais iônicos.....	2
1.2.2. Peptídeos atuando em canais iônicos.....	4
1.3. Peptídeos antimicrobianos de origem animal.....	9
1.4. Revisão de toxinas para do gênero <i>Lasiadora</i>	16
2. Justificativa.....	18
3. Objetivos.....	20
4. Material e Métodos.....	21
4.1. Animais.....	21
4.2. Obtenção da peçonha da <i>Lasiadora</i> sp.....	21
4.3. Fracionamento da Peçonha da Peçonha Bruta.....	22
4.4. Ensaio Antimicrobiano.....	22
4.5. Ensaio Hemolítico.....	23
4.6. Eletrofisiologia.....	23
4.7. Ensaio Cardiotóxico.....	23
4.8. Espectrometria de Massa e Sequenciamento <i>De Novo</i>	24
4.9. Sequenciamento N-terminal.....	24
5. Resultados.....	26
5.1. Cromatografia e identificação dos componentes da peçonha de <i>Lasiadora</i> sp.....	26
5.2. Ensaio antimicrobiano e hemolítico.....	31
5.3. Purificação e caracterização química.....	32
5.3.1. Recromatografias e espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF.....	32
5.3.2. Sequenciamento, alinhamentos e similaridades.....	38
5.4. Ensaio eletrofisiológicos.....	39
5.5. Determinação da concentração inibitória mínima.....	45
5.6. Ensaio preliminares com JL1.....	45
6. Discussão.....	49
6.1. Purificação e caracterização dos componentes da peçonha.....	49
6.2. Fragmentação e Sequenciamento.....	51
6.3. Ensaio farmacológicos.....	52
6.4. Ensaio preliminares com JL1.....	56
7. Conclusões.....	59
8. Referências.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Exemplos de estruturas de acilpoliaminas.....	3
Figura 2.	Modelo de atuação dos peptídeos na membrana plasmática.....	11
Figura 3.	Estrutura da PcFK1, PcFK2 e da GsMTx-4.....	12
Figura 4.	<i>Lasiadora</i> sp.....	21
Figura 5.	Cromatograma da peçonha bruta de <i>Lasiadora</i> sp.....	26
Figura 6.	Espectrograma de massa da peçonha bruta de <i>Lasiadora</i> sp. modo refletido.....	27
Figura 7.	Espectrograma de massa da peçonha bruta de <i>Lasiadora</i> sp. modo linear.....	27
Figura 8.	Freqüência dos componentes de massas das frações cromatográficas da peçonha de <i>Lasiadora</i> sp..	30
Figura 9.	Distribuição dos componentes de massas em relação à hidrofobicidade.....	30
Figura 10.	Inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> causada pela peçonha bruta de <i>Lasiadora</i> sp.....	31
Figura 11.	Reromatografia e espectrograma de massa para a fração 25.....	33
Figura 12.	Reromatografia e espectrogramas de massa para a fração 27.....	34
Figura 13.	Reromatografia e espectrogramas de massa para a fração 32.....	35
Figura 14.	Reromatografia e espectrograma de massa para a fração 43.....	36
Figura 15.	Reromatografia e espectrograma de massa para a fração 48.....	37
Figura 16.	Alinhamento da toxina F27.1 com o peptídeo maduro da toxina LTx4.....	38
Figura 17.	Alinhamento da toxina F27.2 com os peptídeos maduros das LTx1-3.....	38
Figura 18.	Sequências das toxinas F43.3 e LTx5 e o alinhamento entre elas.....	39
Figura 19.	Ensaio eletrofisiológico em setup canal de Na ⁺ , Patch Clamp, F25.....	40
Figura 20.	Ensaio eletrofisiológico em setup canal de Na ⁺ , Patch Clamp, F27.1.....	40
Figura 21.	Ensaio eletrofisiológico em setup canal de Na ⁺ , Patch Clamp, F27.2.....	41
Figura 22.	Ensaio eletrofisiológico em setup canal de Na ⁺ , Patch Clamp, F43.3.....	41
Figura 23.	Ensaio eletrofisiológico em setup receptores nicotínicos, Patch Clamp, Beta-tubocurarina.....	42
Figura 24.	Ensaio eletrofisiológico em setup receptores nicotínicos, Patch Clamp, F25.....	43
Figura 25.	Ensaio eletrofisiológico em setup receptores nicotínicos, Patch Clamp, F27.1.....	43
Figura 26.	Ensaio eletrofisiológico em setup receptores nicotínicos, Patch Clamp, F27.2.....	44
Figura 27.	Ensaio eletrofisiológico em setup receptores nicotínicos, Patch Clamp, F43.3.....	44
Figura 28.	Espectrograma da fragmentação do componente de massa 601,34 m/z.....	46
Figura 29.	Espectrograma da fragmentação do componente de massa 729,31 m/z.....	46
Figura 30.	Miocardiograma da fatia isolada de <i>L. catesbeianus</i> , aplicação de peçonha bruta.....	47
Figura 31.	Miocardiograma da fatia isolada de <i>L. catesbeianus</i> , aplicação de JL1.....	47
Figura 32.	Recromatografia do grupo de frações JL1.....	48
Figura 33.	Estrutura proposta e parcialmente elucidada para as acilpoliaminas APC600 (A) e APC728 (B).....	57
Figura 34	Estrutura da migalina, N1, N8-bis (2,5-dihidroxibenzoil) espermidina.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos de aranhas migalomorfas que apresentam atividade em canais iônicos.....	7
Tabela 2. Peptídeos antimicrobianos de aranhas	14
Tabela 3. Sequência de aminoácidos de peptídeos presentes na peçonha de aranhas do gênero <i>Lasiadora</i> ...	17
Tabela 4. Massas obtidas nas frações cromatográficas de <i>Lasiadora</i> sp.	29
Tabela 5. Porcentagem de inibição do crescimento microbiano de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> e atividade hemolítica...	31
Tabela 6. Sequência peptídica parcial de peptídeos identificados na peçonha de <i>Lasiadora</i> sp.....	38

LISTA DE ABREVIÇÕES

Ach - acetilcolina

MIC - Concentração Inibitória Mínima

Da - Dalton

FCS - Fethal Calf Serum

g - grama

kHz - Quilohertz

L - litro

LpTx - Toxina isolada de *Lasiadora parahybana*

LTx - Toxina isolada de *Lasiadora* sp.

LTx1-3 - LTx1, LTx2, LTx3

LTx1-5 - LTx1, LTx2, LTx3, LTx4, LTx5

m/Z - massa/carga

MS - Mass spectrometry

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

μL - Microlitro

μM - micromolar

μs - Microsegundos

μV - microvolt

mAbs - miliabsorbância

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mV - milivolt

min - Minuto

nm - Nanômetro

RP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa.

rpm - Rotação Por Minuto

s - segundo

TFA - Ácido Trifluoroacético

TTX - Tetrodotoxina

v - Volume

1. Introdução

1.1. Peçonhas de Aranhas Caranguejeiras

As aranhas caranguejeiras, também chamadas de tarântulas, são popularmente conhecidas devido ao seu grande porte, como a *Theraphosa blondi*, aranha que pode chegar a 25 cm de comprimento (Haupt, 2005). Assim como os demais aracnídeos da ordem Opisthothelae (Classe Araneae), as caranguejeiras apresentam, como uma de suas apomorfias, glândulas produtoras de peçonha e despertam grande interesse para os estudos toxinológicos e farmacológicos. As tarântulas pertencem à subordem das Migalomorfas (subordem mais basal dentro de Opisthothelae), que são caracterizadas por um par de quelíceras paralelas ao sentido do corpo (orthognathous) e um par de pulmões “folhaves” e compreendem as famílias Theraphosidae, Dipluridae e Hexatelidae.

As aranhas caranguejeiras não são consideradas espécies perigosas, com exceção do gênero *Atrax* cujos acidentes provocaram graves sintomas de envenenamento (Lucas et al., 1994; Estrada et al., 2007). Testes laboratoriais com venenos das Migalomorfas das espécies *Pterinochilus* sp. e *Trechona venosa* mostraram considerável toxicidade em vertebrados (Freyvogel, 1972; Brazil & Vellard, 1925 In: Lucas, 1994), porém não há relatos de acidentes graves provocados por essas espécies em humanos. Aranhas caranguejeiras do novo mundo apresentam o comportamento de esfregarem as patas ao opistoma quando em situação de perigo, liberando uma nuvem de pêlos urticantes que ficam aderidos a mucosas podendo desencadear reações de hipersensibilidade. Casos de picadas reportados na literatura apontam como sintomas dor local, edema, eritema e inchaço que geralmente podem ser tratados com analgésicos locais ou de administração oral e antihistamínicos (Lucas et al., 1994).

A secreção das glândulas de peçonha apresenta-se como um conjunto de toxinas que possuem variadas ações em sistemas biológicos. Os estudos descritivos sobre toxinas têm início com a observação dos comportamentos dos animais e a forma de utilização de sua peçonha. Aranhas são predadoras e utilizam sua peçonha para paralisar e matar sua presa ou para defender-se. Peçonhas de aracnídeos já foram caracterizadas como uma mistura complexa de sais inorgânicos, acilpoliaminas, pequenos polipeptídeos e proteínas que podem apresentar ações

farmacológicas como bloqueadores e moduladores de canais iônicos, formadores de poros em membranas plasmáticas, entre outras (Escoubas et al., 2000; Estrada et al., 2007).

1.2. Canais iônicos

Proteínas celulares transmembrana que funcionam como canais iônicos são essenciais para disparo do potencial de ação em células excitáveis. Alterações no potencial de membrana provocam a abertura de canais para Na^+ , K^+ e Ca^{+2} dependentes de voltagem resultando em um fluxo de corrente através das células e a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Na membrana pós-sináptica canais iônicos dependentes de ligantes atuam na alteração do potencial de membrana (Eckert et al., 2002). Neurotransmissores podem ser excitatórios quando provocam a despolarização ou inibitórios quando provocam a hiperpolarização da membrana celular. Nenhuma molécula é inerentemente excitatória ou inibitória, um transmissor pode exercer uma função ou outra se os gradientes iônicos forem alterados (Eckert et al., 2002). A complexidade de funcionamento do sistema nervoso dos animais através da transmissão de informações por células excitáveis acabou sendo selecionada evolutivamente como um alvo para a atuação de compostos da peçonha de aranhas. Existem vários pontos em que toxinas podem atuar resultando no bloqueio da transmissão nervosa.

1.2.1. Acilpoliaminas de aranhas atuando em canais iônicos

Acilpoliaminas (Figura 1) são compostos de baixo peso molecular (< 1 kDa) de caráter hidrofílico que atuam fortemente na junção neuromuscular de insetos e geram a paralisia rápida da presa (Adams et al., 1989). Foram encontradas pela primeira vez em aranhas da família Theraphosidae e seu efeito neurotóxico foi reportado primeiramente para moléculas obtidas da peçonha de *Nephila clavata* (Araneomorphae) (Stromgaard et al., 2001). As acilpoliaminas têm como alvo principal os receptores ionotrópicos, por exemplo, os canais ligante-dependentes de glutamato na membrana pós-sináptica. A ação destas moléculas nos canais altera o fluxo de Na^+ e Ca^{+2} através da membrana e resulta na perturbação da sinapse excitatória (Stromgaard et al., 2001). A JSTX-3 (Figura 1A), uma acilpoliamina isolada de *Nephila clavata*, foi descrita como antagonista dos receptores de glutamato (Stromgaard et al., 2001). Análogos sintéticos da JSTX-3 estão sendo

estudados para o desenvolvimento de drogas que possam atuar como antiepiléticos e analgésicos no tratamento de distúrbios do sistema nervoso e na proteção contra doenças cardíacas (Kawai, 2005; Salamoni, 2005).

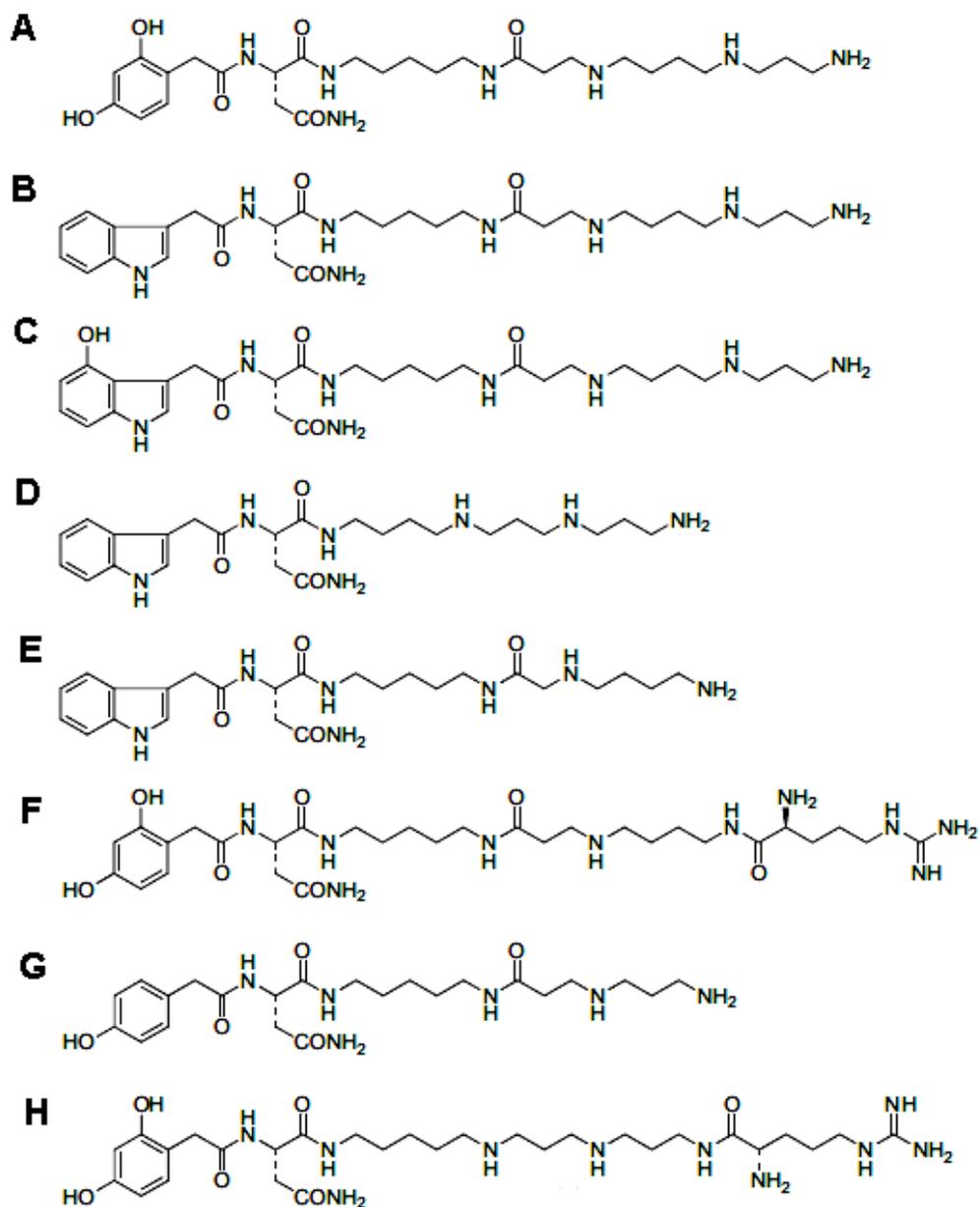


Figura 1. Exemplos de estruturas de acilpoliaminas identificadas em aranhas. (A) JSTX3, (B) NPTX-8, (C) NPTX-1, (D) NPTX-473, (E) NPTX-501 e (G) Joramine, isoladas de *Nephila clavata*, (F) NSTX-3, isolada de *Nephila maculata*, (H) Arg-636, encontrada em *Argiope trifasciata* e *Araneus gemma*. Modificado de Nihei et al., 2002.

1.2.2. Peptídeos de aranhas atuando em canais iônicos

Aproximadamente 50 peptídeos já foram descritos para peçonhas de aranhas caranguejeiras (Migalomorfas), uma porcentagem pequena se considerado o universo de mais de 200 peptídeos isolados de aranhas. A maioria dos peptídeos da peçonha de Theraphosidae apresenta entre 31 e 41 aminoácidos, massa molecular de 3500 e 4500 Da, com três pontes dissulfeto e caráter básico. Como exceções a este padrão citam-se os peptídeos LpTx 1 e LpTx 2 isolados de *Lasiadora parahybana* com 49 aminoácidos, quatro pontes dissulfeto e massa molecular maior que 5500Da e os peptídeos SNX-482 de *Hysteroocrates gigas* e HmTx2 de *Heteroscodra maculata* ambos com pH abaixo de 5,0 (Escoubas & Rash, 2004).

Vários trabalhos descrevem a ação neurotóxica de peptídeos de aranhas devido a sua interação com canais iônicos (Tabela 1). Os canais de K^+ representam o mais diverso subgrupo de canais iônicos, têm papel na manutenção do potencial de membrana, repolarização da célula e controle da excitabilidade celular (Eckert et al., 2002). Diferentemente dos peptídeos da peçonha de cobras, abelhas, anêmonas-do-mar e escorpiões, que bloqueiam canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) subtipos Kv1 e Kv3, os peptídeos de aranha tem como alvo os subtipos Kv2 e Kv4, que são expressos no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular (Diochot, 2005). Os primeiros peptídeos de aranhas descritos com ação em canais Kv foram as Hanatoxinas 1 e 2, isoladas de *Grammostola spatulata*, que bloqueiam canais do tipo Kv2.1 (Swartz & MacKinnom, 1995). As Heteropodatoxinas 1 e 3, isoladas de *Heteropoda venatoria*, prolongaram o potencial de ação em miócitos de rato bloqueando canais do tipo Kv4.2 e impedindo a corrente de K^+ que repolariza a célula (Sanguinetti et al., 1997; Kassiri et al., 2002). Phrixotoxinas, isoladas de *Phrixotrichus auratus* apresentaram atividade como bloqueadores específicos dos canais Kv4.3 e Kv4.2 bloqueando a corrente de K^+ em preparações com o coração isolado de camundongos (Diochot, 1999). A peçonha de *Stromopelma calceata*, *Heteroscodra maculata* e *Theraphosa blondii* também apresentaram peptídeos que bloqueiam canais de K^+ subtipos Kv2.2, Kv2.1, Kv4.2 e Kv4.3 (Escoubas et al., 2002; Ebbinghaus et al., 2004). Moléculas que bloqueiam subtipos específicos de canais de K^+ têm grande interesse farmacológico para o desenvolvimento de drogas antiarrítmicas e doenças cardíacas.

O fluxo de Ca^{+2} para dentro da célula é importante para a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (Eckert et al., 2002). Peptídeos de origem animal podem atuar como antagonistas de canais de Ca^{+2} sensíveis à voltagem do tipo “não-L” e servir de modelo para drogas moduladoras que atuam como neuroprotetores e analgésicos (Striessing et al., 1998). O peptídeo GsTxSIA, isolado da peçonha de *Grammostola spatulata*, bloqueia canais de Ca^{+2} sensíveis à voltagem dos tipos N, P e Q, além de bloquear canais voltagem dependentes de Ca^{+2} e ter baixa afinidade com canais de K^{+} (Lampe et al., 1993; Takeuchi et al., 2002).

Os canais de Na^{+} dependentes de voltagem tem papel essencial na formação e na propagação do impulso nervoso, seu funcionamento coordenado com os canais de K^{+} representam a base fisiológica da transmissão nervosa (Estrada et al., 2007). Existem cerca de dez tipos de genes que codificam os diferentes tipos de canais de Na^{+} em vertebrados e um ou dois em invertebrados (Eckert et al., 2002). Farmacologicamente, em vertebrados os canais para Na^{+} podem ser divididos em dois grupos, os sensíveis à TTX, encontrados no cérebro e musculatura esquelética, e os não-sensíveis à TTX, encontrados no coração, nervos sensoriais e gânglios nervosos (Eckert et al., 2002). Acidentes com *Atrax robustus* provocam falha respiratória em humanos devido à ação do peptídeo atracotoxina em canais de Na^{+} (Sheumack et al., 1985). A toxina de sódio mais potente descrita para a família Theraphosidae é a PaurTx3, isolada de *Phrixotrichus auratus*, que atua sobre canais do tipo Nav1.2 (Bosmans et al., 2006). *Selenocosmia huwena* e *Ceratogyrus cornuatus*, aranhas Theraphosidae, também apresentam em sua peçonha peptídeos com ação sob canais de sódio dependentes de voltagem. Todas as toxinas em canais para Na^{+} até agora descritas para aranhas Theraphosidae atuam sobre canais voltagem-dependentes sensíveis a TTX (Estrada et al., 2007). Apesar da homologia de mais de 70% entre os diferentes canais e suas ações, a resposta às toxinas de aranhas é diferente. A atuação das toxinas de forma seletivas nos canais constitui um valor potencial para o desenvolvimento de novos terapêuticos.

Assim como as acilpoliaminas peptídeos da peçonha de aranha também podem atuar nos receptores ionotrópicos de glutamato e alterar a transmissão da informação entre células nervosas e musculares. Em *Phoneutria nigriventer* já foram encontrados peptídeos que atuam sobre os receptores de glutamato. Ainda não há nenhum peptídeo de Theraphosidae descrito com esta ação (Estrada et al., 2007).

Existem peptídeos atuando em mais diversos tipos de canais iônicos. Bode & Sachst (2001) descrevem a ação do peptídeo GsMTx, isolado de *Grammostola spatulata*, bloqueando canais ativados por estiramento. As formas como ocorre o bloqueio desses canais ainda não estão elucidadas, mas certamente esse peptídeo será uma ferramenta para o tratamento ou prevenção de arritmias cardíacas e outras desordens que estão relacionadas com a ativação dos canais ativados por estiramento. Canais mecanossensíveis e sensíveis a variações de pH estão associados com a nocicepção e podem também ser alvos de toxinas de aranha. *Psalmopoeus cambridgei* apresenta em sua peçonha o peptídeo PcTx1 que bloqueia canais sensíveis à variação de pH, que são expressos no sistema nervoso central e neurônios sensoriais de vertebrados. Pouco se conhece sobre a estrutura destes canais, a descoberta dessas toxinas é uma importante ferramenta para desvendar o funcionamento dos canais sensíveis a variações no pH e mecanossensíveis (Estrada et al., 2007).

Canais iônicos dependentes de voltagem apresentam uma surpreendente homologia entre vários tipos de canais de cátions diferentes e mesmo entre espécies diferentes (Eckert et al., 2002). Existem peptídeos da peçonha de aranha que atuam de forma promíscua, tendo afinidade com mais de um tipo de canal iônico. Exemplo disto é o ProTx-1 e ProTx-2, isolados de *Thrixopelma pruriens* (Theraphosidae), que atuam sobre Canais de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ (Bourinet & Zamponi, 2005).

Tabela 1. Alguns peptídeos de aranhas migalomorfas que apresentam atividade em canais iônicos.

<i>Espécie</i>	<i>Toxina</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Massa (Da)</i>	<i>Alvo</i>	<i>Referência</i>
Toxinas com ação em canais de Potássio					
<i>Chilobrachys jingzhao</i>	JzTx-III	DGECGGFWWKCGRGKPPCCKGYACSKTWGCAVEAP	3919,4	Kv2.1	Liao et al., 2007
<i>Chilobrachys jingzhao</i>	JzTx-V	YCQKWMWTCDSKRACCEGLRCKLWCRKII	3605,73	Kv4.2	Zeng et al., 2006
<i>Chilobrachys jingzhao</i>	JzTx-XI	ECRKMFGGCSVSDCCAHLGCKPTLKYCAWDGTF	3726,38	Kv2.1, Kv4.1, Kv4.2	Liao et al., 2006
<i>Chilobrachys jingzhao</i>	JzTx-XII	YCQKWMWTCDSERKCCCEGYVCELWCKYNL	3665,4	Kv4.1	Yuan et al., 2007
<i>Grammostola rosea</i>	VSTX2	YCQKWMWTCDEERKCCCEGLVCRWLWCKKIEEG	3986	KvAP	Ruta, et al.2004
<i>Grammostola spatulata</i>	HaTx1	ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	4114,73	Kv2.1	Swartz and MacKinnon, 1995
<i>Grammostola spatulata</i>	HaTx2	ECRYLFGGCKTTADCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	4098,73	Kv2.1	Swartz and MacKinnon, 1995
<i>Grammostola spatulata</i>	VSTx1	ECGKFMWKCKNSNDCCDLVCSRWKWCVLASPF	3997,73	KvAP	Bemporad et al., 2006
<i>Heteroscodra maculata</i>	HmTx1	ECRYLFGGCSSTSDCCKHLSCRSDWKYCAWDGTF	3994,57	Kv2.1, Kv2.2, Kv 4.2, Kv 4.3	Escoubas et al., 2002
<i>Heteroscodra maculata</i>	HmTx2	ECRYFWGECNDEMVCCEHLVCKEKWPITYKICVWDRTF	4757,55	Kv2.1, Kv2.2	Escoubas et al., 2002
<i>Phrixotrichus auratus</i>	PaTx1	YCQKWMWTCDSARKCCCEGLVCRWLWCKKII	3547,6	Kv4.2, Kv4.3	Diocot et al., 1999
<i>Phrixotrichus auratus</i>	PaTx2	YCQKWMWTCDEERKCCCEGLVCRWLWCKRIINM	3921,77	Kv4.2, Kv4.3	Diocot et al., 1999
<i>Psalmopoeus cambridgei</i>	VaTx1	SECRWFMGGCDSTLDCCCKHLSCKMGLYYCAWDGTF	4008,5	Kv2.1	Siemens et al., 2006
<i>Psalmopoeus cambridgei</i>	VaTx2	GACRWFLGGCKSTSDCCEHLVCKMGLDYCAWDGTF	3842	Kv2.1	Siemens et al., 2006
<i>Psalmopoeus cambridgei</i>	VaTx3	ECRWYLGCKEDSECCHEHLQCHSYWEWCLWDGFSF	4179	Kv2.1	Siemens et al., 2006
<i>Stromatopelma calceata</i>	ScTx1	DCTRMFGACRRSDCCPHLGCKPTSKYCAWDGTI	3788,56	Kv2.1, Kv2.2	Escoubas et al., 2002
<i>Scodra griseipes</i>	SGTx1	TCRYLFGGCKTTADCCKHLACRSYGKYCAWDGTF	3776,32	Kv2.1	Lee et al., 2003
<i>Theraphosa blondi</i>	TLTx1	AACLGMFESCDPNNDKCCPNRECNRKHKWCKYKWL	4186,33	Kv4.2	Legros et al., 2004
<i>Theraphosa blondi</i>	TITx2	DDCLGMFSSCDPNNDKCCPNRVCRSRDQWCKYKWL	4195,56	Kv4.2	Legros et al., 2004
<i>Theraphosa blondi</i>	TITx3	DDCLGMFSSCDPNNDKCCPNRVCRRVDQWCKYKWL	4208,78	Kv4.2	Legros et al., 2004
Toxinas com ação em canais de Sódio					
<i>Ceratogyrus cornuatus</i>	CcoTx1	DCLGWFKSCDPKNDKCKNYTCSRRDRWCKYDL	4041,79	Nav1.1, Nav1.2, Nav1.4	Bosmans et al., 2005
<i>Ceratogyrus cornuatus</i>	CcoTx2	DCLGWFKSCDPKNDKCKNYTCSRRDRWCKYYL	4089,61	Nav1.2	Bosmans et al., 2005
<i>Ceratogyrus cornuatus</i>	CcoTx3	GVDKEGCRKLLGGCTIDDDCCPHLGCNKKYWHCGWDGTF	4321,84	Nav1.5	Bosmans et al., 2005

Cont.

Cont. tabela 1. Alguns peptídeos de aranhas migalomorfas que apresentam atividade em canais iônicos.

Espécie	Toxina	Seqüência	Massa (Da)	Alvo	Referência
<i>Grammostola rosea</i>	GrTx1	YCQKWMWTCDSKRKCCEDMVCQLWCKKRL	3697	Nav	Clement et al., 2007
<i>Selenocosmia hainana</i>	HnTx-I	ECKGFGKSCVPGKNECCSGYACNSRDWCKVLL	3608,02	rNav1.2/, para/tipE	Li et al., 2003
<i>Selenocosmia hainana</i>	HNTX-IV	ECLGFGKGCNPSNDQCCKSSNLVCSRKHRWCKYEI	3988,58	NaV-TTx-s	Liu et al., 2003
<i>Selenocosmia hainana</i>	HnTx-V	ECLGFGKGCNPSNDQCCKSANLVCSRKHRWCKYEI	3972	NaV-TTx-s	Xiao et al., 2003
<i>Selenocosmia huwena</i>	HwTx-IV	ECL EIFKACNPSNDQCCKSSKLVCSRKTRWCKYQI	4104,7	NaV-TTx-s	Diochot et al., 1999
<i>Chilobrachys jingzhao</i>	JZTX-I	ACGQFVWKCGEGKPPCCANFACKIGLYLCIWSP		NaV-TTx-s	Xiao et al., 2005
<i>Chilobrachys jingzhao</i>	JZTX-III	DGECGGFVWKCGRGKPPCCKGYACSKTWGWCAVEAP	3919,4	NaV-TTx-r	Xiao et al., 2004
<i>Phrixotrichus auratus</i>	PaurTx3	DCLGFLWKCNPNDKCCRPNLVCSRKDKWCKYQI	4055,88	Nav1.2	Bosmans et al., 2005
<i>Thrixopelma pruriens</i>	ProTx-I	ECRYWLGGSAGQTCKHLVCSRHRHGWCVWDGTFS	3988,3	hNav 1.5	Middleton et al., 2002
<i>Thrixopelma pruriens</i>	ProTx-II	YCQKWMWTCDSERKCCGEMVCRWLWCKKKLW	3827	hNav 1.5	Middleton et al., 2002
<i>Brachypelma smithii</i>	Bs1	CIGESVPCDKDDPRCCREYECLKPTGYGWWYASYCYRKKS	4916,57	Nav Para/tipE	Corzo et al., 2008
Toxinas com ação em canais de Cálcio					
<i>Grammostola spatulata</i>	GSTxSIA	DCVRFVWGKCSQTSDCPPHLACKSKWPRNICVWDGVS	4110,74	P-type Ca ⁺⁺ , N-type Ca ⁺⁺	McDonough et al., 1997
<i>Hysteroocrates gigas</i>	SNX-482	GVDKAGCRYMFGGCSVNDCCPRLGCHSLFSYCAWDLTFS	4495,06	E-Ca ⁺⁺ , R-type Ca ⁺⁺	Newcomb et al., 1998
<i>Lasiodora parahybana</i>	LTx2	FFECTLECDIKKEGKPKGCKCNDKDNKDHKKCSGGWRCKLKLCLKF	5674	L-type Ca ⁺⁺	Dutra et al., 2008
<i>Selenocosmia huwena</i>	HwTx-I	ACKGVFDACTPGKNECCPNRVCSDKHKWCKWKL	3740,41	N-type Ca ⁺⁺ , N-type Ca ⁺⁺	Peng et al., 2000
<i>Selenocosmia huwena</i>	HwTx-X	KCLPPGKPCYGATQKIPCCGVCSHNKCT	2931,34	N-type Ca ⁺⁺	Liu et al., 2006
<i>Thrixopelma pruriens</i>	ProTx-I	ECRYWLGGSAGQTCKHLVCSRHRHGWCVWDGTFS	3827	T-type Ca ⁺⁺ 3.1	Middleton et al., 2002

1.3. Peptídeos antimicrobianos de origem animal

Alguns peptídeos possuem a capacidade de se associar à bicamada lipídica das células e formar poros na membrana que podem resultar num desequilíbrio de cargas ou na lise celular (Villegas & Corzo, 2005). A atividade citolítica de componentes do veneno de aranhas age em esforço simultâneo com os componentes neurotóxicos para facilitar a captura da presa (Corzo et al., 2002). A aptidão dos peptídeos de danificarem membranas celulares e provocarem lise está associada ao seu potencial antimicrobiano.

Os peptídeos antimicrobianos possuem em comum a característica de serem catiônicos e anfifílicos (Zaslov, 2002). A capacidade de associação dos peptídeos catiônicos anfifílicos com a membrana fosfolipídica, podendo provocar a morte celular, é regulada pelas interações eletrostáticas e hidrofóbicas estabelecidas (Bechinger, 1999). A membrana plasmática de procariotos e eucariotos possui uma composição distinta de fosfolipídios. Os fosfolipídios de eucariotos são basicamente a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomiéline enquanto que em procariotos encontra-se basicamente o fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilserina. A composição diferente resulta em cargas e hidrofobicidades diferenciadas para as membranas. Assim, é possível que a membrana dos organismos procariotos seja mais susceptível à ação dos peptídeos antimicrobianos devido à alta densidade de cargas negativas (Yeman & Yount, 2003). Segundo Bechinger (1999), a atividade dos peptídeos antimicrobianos depende de uma sequência de eventos: solubilização do peptídeo no meio aquoso, acesso à superfície negativamente carregada da membrana, interação eletrostática com a membrana e a formação dos poros. Portanto apresenta vários pontos de regulação.

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). Portanto, é comum a diferença de atividade dos peptídeos antimicrobianos em Gram-positivas e Gram-negativas, haja visto 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 (Yeman & Yount, 2003; Bechinger, 1999). São três os principais modos de ação dos peptídeos nas membranas: formação de poros e poros toroidais, formação

de carpetes e a atuação como detergentes (*Barrel-stave*, *Toroid Pore*, *carpet-like*, *Detergent-like*) (Shai, 1999; Bechinger & Lohner, 2006) (Figura 2). A formação do poro tem início com a porção hidrofóbica dos peptídeos interagindo com a membrana e se ligando de forma paralela a ela. Após o acúmulo dos monômeros em uma concentração limiar ocorre a inserção transversal dos peptídeos na membrana e a formação do poro, que tem seu diâmetro ampliado pela agregação de mais monômeros. Modelos estruturais indicam que os peptídeos que formam poros geralmente são estruturados na forma de alfa-hélice e se inserem na membrana pelo seu domínio N-terminal que contém resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, porém nem todos os peptídeos formadores de poros seguem este modelo (Bechinger, 1999; Yeman & Yount, 2003). Os poros formados nas células, além de poder levar à lise, podem funcionar de maneira similar a um canal iônico, alterando a permeabilidade da membrana (Corzo, 2002). No poro toroidal os lipídios auxiliam na estabilização do poro, uma vez que reduzem a repulsão eletrostática existente entre os peptídeos positivamente carregados (Shai, 1999). Outro modelo de associação de peptídeos antimicrobianos com a membrana é a formação de carpetes (Pouny et al., 1992).

Os peptídeos catiônicos se associam paralelamente à membrana, como um tapete, e não chegam a formar a estrutura quaternária de um poro. Ao atingirem uma concentração limiar sujeitam a membrana a um balanço de cargas desfavorável, prejudicando a integridade e provocando a ruptura da membrana (Yeman & Yount, 2003). O modelo 'detergent-like' 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 & Lohner, 2006).

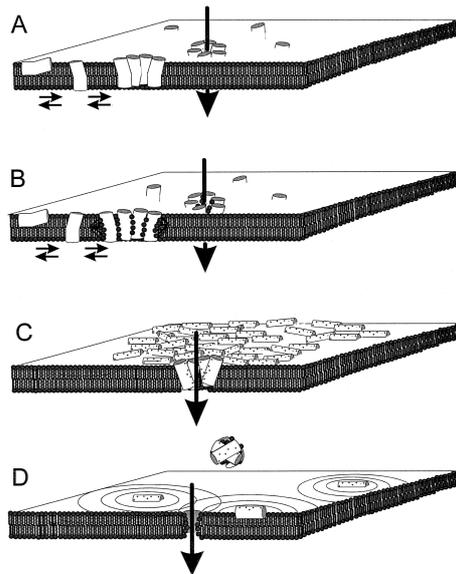


Figura 2. Modelo de atuação dos peptídeos na membrana plasmática. (A) *Barrel-stave*, (B) *Toroid Pore*, (C) *carpet-like* e (D) *Detergent-like*. Adaptado de Bechinger, 1999.

A membrana plasmática é muito importante nos processos de manutenção do gradiente osmótico e eletrostático da celular, fosforilação oxidativa, transporte de substâncias, síntese de endotoxinas e respiração celular de procaríotos, entre outros processos. Portanto, uma perturbação no equilíbrio da membrana pode levar rapidamente a morte celular, o que justifica a participação dos peptídeos antimicrobianos na primeira linha de defesa imunitária de vertebrados e invertebrados. Nem sempre a morte celular ocorre devido a lise, também podem ocorrer interferências nos processos de regulação do metabolismo celular (Yeman & Yount, 2003; Zasloff, 2002).

Em revisão, Daffre et al. (2001) indicam que os peptídeos antimicrobianos encontrados em animais podem ser agrupados de acordo com suas propriedades químicas e estruturais em duas classes: lineares e cíclicos. Os lineares, não apresentam o aminoácido cisteína em sua composição, e podem ser subdivididos nos que formam uma α -hélice anfipática após contato com a membrana celular e os ricos em um determinado tipo de aminoácido, tais como prolina, histidina e triptofano. Os cíclicos são peptídeos que apresentam resíduos de cisteína em sua estrutura, podendo ter as extremidades amino-terminal abertas ou fechadas.

Vários peptídeos antimicrobianos já foram isolados das peçonhas de aranhas, a maioria deles de aranhas Araneomorphae (Tabela 2). Dentre os peptídeos

antimicrobianos isolados de migalomorfos a SGTx1, isolada de *Scodra griseipes*, possui seis pontes dissulfeto em sua estrutura e apresentam algumas folha-*beta* (Laure et al., 1999). A PcFK1 e a PcFK2 possuem três pontes dissulfeto, sendo que para a primeira sugere-se uma amidacão C-terminal (Figura 3A e 3B) (Choi et al., 2005). Estudos com a GsMTx-4, isolada de *Grammostola spatulata*, mostram a distribuição de aminoácidos hidrofílicos orientados para o solvente e os hidrofóbicos na extremidade oposta, comprovando a característica anfifílica dos peptídeos antimicrobianos (Figura 3C) (Jung et al, 2006). As laticinas, isoladas de *Lachesana tarabaevi*, possuem alto PI (>10) (Koslov et al., 2006).

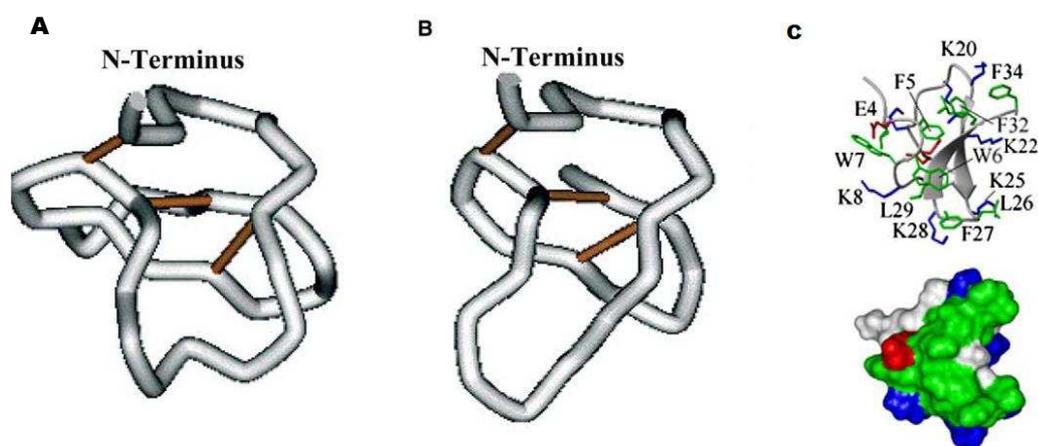


Figura 3. Estrutura da PcFK1 (A), PcFK2 (B) e da GsMTx-4 (C). Em A e B destacam-se as pontes dissulfeto. Em C, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, básicos e ácidos estão mostrados em verde, azul e vermelho respectivamente. Adaptado de Choi et al. (2005) e Jung et al. (2006).

Em *Acanthoscurria gomesiana* já foram isolados alguns peptídeos antimicrobianos provenientes da hemolinfa. As acanthoscurrinas 1 e 2 são peptídeos ricos em glicina com alto peso molecular (>10 kDa) e que possuem atividade contra bactérias gram-negativas e alguns parasitas eucariotos (Lorenzini et al., 2003). A gomesina é um peptídeo que possui massa molecular 2270,4 Da e duas pontes dissulfeto em sua estrutura e extremidade C-terminal amidada (Silva, Jr., 2000) também apresenta atividade contra organismos procariotos e eucariotos. Experimentos de redução e alquilação com essa molécula indicam que as pontes dissulfeto são de extrema importância para a atividade contra os microrganismos (Silva, jr., 2000). Ferreira et al. (2007) realizaram uma purificação parcial de peptídeos da hemolinfa de *Lasiodora* sp. e identificaram a atividade de inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Candida tropicalis*.

A atividade dos peptídeos é baseada na interação física com a membrana, fator que pode dificultar a ocorrência de resistência bacteriana. Os peptídeos antimicrobianos são abundantemente encontrados em anfíbios, que assim como outros vertebrados, utilizam estas moléculas como uma primeira linha de defesa contra microrganismos (Nicolas & Mor, 1995). Em aranhas existem estudos mostrando a presença de peptídeos e outros componentes antimicrobianos, provavelmente com a mesma função de defesa que em vertebrados (Lorenzini et al., 2003). Para componentes de peçonha existem muitos peptídeos descritos com ação citolítica, mas estes possuem uma interação e especificidade maior com células eucarióticas, que seriam as células presentes em suas presas (Corzo et al., 2002). A descoberta de novas moléculas com propriedades antimicrobianas é bastante valiosa no cenário sanitário atual onde a resistência de microrganismos aos antibióticos é relevante. Já existem drogas baseadas em peptídeos de origem animal, como o LOCILEX, modelado a partir da magainina, um peptídeo antimicrobiano isolado de *Xenopus laevis*.

Tabela 2. Peptídeos de aranhas que apresentaram inibição do crescimento dos microrganismos indicados.

Animal	Peptídeo	Sequência	Massa (Da)	Microrganismo
<i>S. griseipes</i>	SGTx1	TCRYLFGGCKTTADCCKHLACRSDGKYCAWDGTF	3775	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
<i>C. salei</i>	Cupienina 1a	GFGALFKFLAKKVAKTVAKQAAKQGAKYVVNKQME	3798,59	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i>
	Cupienina 1d	GFGSLFKFLAKKVAKTVAKQAAKQGAKYVANKHME	3795,55	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i>
<i>O. kitabensis</i>	Oxiopinina 1	FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKVLPKAAKAGKALAKSMADENAIRQQNQ	5221,2	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
	Oxiopinina 2a	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDLKDNQ	4127,1	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
<i>G. spatulata</i>	GsMTx-4	GCLEFWWKCNPNDDKCCRPKPKCSKLFKLCNFSSA	4093,9	<i>B. subtilis</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i>
<i>L. tarabaei</i>	Latarcina 1	SMWSGMWRRLKLLRNALKKKLKG	3071,5	<i>E. coli DH5a</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. globiformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>Pichia pastoris</i> <i>S. cerevisiae</i>
	Latarcina 2a	GLFGKLIKFKGRKAISYAVKKARGKH	2901	<i>E. coli DH5a</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. globiformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>P. pastoris</i> <i>S. cerevisiae</i>
	Latarcina 3a	SWKSMAKKLKEYMEKQRA	2481,7	<i>E. coli DH5a</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. globiformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>P. pastoris</i> <i>S. cerevisiae</i>
	Latarcina 3b	SWASMAKKLKEYMEKQRA	2424,6	<i>E. coli DH5a</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. globiformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>P. pastoris</i>

Cont.

Cont. Tabela 2. Peptídeos de aranhas que apresentaram inibição do crescimento dos microrganismos indicados.

Animal	Peptídeo	Sequência	Massa (Da)	Microrganismo
	Latarcina 4a	GLKDKFKSMGEKLGKQYIQTWKAKF	2900,9	<i>S. cerevisiae</i> <i>E. coli DH5a</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. globiformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>P. pastoris</i> <i>S. cerevisiae</i>
	Latarcina 4b	SLKDKVKSMGEKLGKQYIQTWKAKF	2882,3	<i>E. coli DH5a</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. globiformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>Pichia pastoris</i> <i>S. cerevisiae</i>
	Latarcina 5	GFFGKMKEYFKKFGASFRRFANLKKRL	3428,1	<i>E. coli DH5a</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. globiformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>P. pastoris</i> <i>S. cerevisiae</i>
<i>L. carolinensis</i>	Licotoxina 1	IWLTALKFLGKHAAKHLAKQQLSKL	2843,4	<i>E. coli D31</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. albicans</i>
	Licotoxina 2	KIKWFKTMKSIKFIKAEQMKKHLGGE	3206	<i>E. coli D31</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. albicans</i>
<i>L. singoriensis</i>	Licocitina 1	GKLQAFLAKMKEIAAQL	1960,49	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i>
	Licocitina 2	GRLQAFLAKMKEIAAQL	1988,86	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>B. subtilis</i>
<i>P. cambridgei</i>	Psalmopeotoxina I	ACGILHDNCVYVPAQNPCRGLQCRYGKCLVQV	3615,6	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>P. falciparum</i>
	Psalmopeotoxina II	RCLPAGKTCVRGPMRVPCCGSCSQNKCT	2948,3	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>P. falciparum</i>

Referências: Yan et al. (1998), Laure et al. (1999), Haeberli et al. (2000), Corzo et al. (2002), Kuhn-Nentwig et al. (2002), Budnik (2004), Choi et al. (2004), Jung et al. (2006), Kozlov et al. (2006), Pimentel et al. (2006).

1.4. Revisão de toxinas para do gênero *Lasiadora*

Escoubas et al. (1997) testaram o efeito da peçonha bruta de *Lasiadora parahybana* em mamíferos e insetos. A injeção intracerebroventricular em camundongos induziu o aumento da atividade motora e agitação, seguida de paralisia e morte depois de 40 minutos. Em insetos o efeito tóxico foi rápido, provocando paralisia seguida de morte. Neste mesmo trabalho processou-se a separação da peçonha em sistema RP-HPLC e a espectrometria de massa das frações em sistema MALDI-TOF. Os ensaios biológicos com as frações mostraram que aquelas que tinham atividade em insetos apresentavam componentes de baixa massa molecular e aquelas que eram tóxicas para vertebrados apresentavam massas na faixa de 3700 Da a 7300. Dois peptídeos, LpTx1 e LpTx2 (Tabela 3), tiveram suas sequências determinadas por degradação de Edman após redução e alquilação, porém não tiveram sua atividade farmacológica analisada.

Kushmerick et al. (2001) demonstra que a peçonha bruta da caranguejeira *Lasiadora* sp. contém componentes que inibem os canais de Ca^{+2} tipo-L dependentes de voltagem e retardam a inativação de canais de Na^{+} voltagem dependentes.

Kalapothakis et al. (2003), utilizando preparação de coração isolado mostrou que a peçonha bruta de *Lasiadora* sp. causa bradicardia dose-dependente e arritmias, sugerindo que a peçonha promove a liberação de vesículas de acetilcolina nos terminais nervosos parassimpáticos ativando canais de Na^{+} resistentes à tetrodotoxina.

De Deus (2003), em dissertação de mestrado, usando filtração em gel sephadex(G-50), filtração em superose (FPLC) e RP-HPLC identificou algumas frações com ação inseticida na peçonha de *Lasiadora* sp.

Vieira et al. (2004) prediz em banco de cDNA da glândula de peçonha de *Lasiadora* sp. três toxinas denominadas de LTx1, LTx2 e LTx3 (Tabela 3); todas com alta homologia a Huwentoxina2 (Shu & Liang,1999), que atuam em receptores nicotínicos de acetilcolina. Vieira et al. (2004) considera que a toxina denominada Lptx1 descrita primeiramente por Escoubas et al. (1997) em *Lasiadora parahybana* é a mesma encontrada em *Lasiadora* sp. (LTx1).

Guete et al. (2006) apresentou o perfil de peptídeos da peçonha de *Lasiadora parahybana*. Usando espectrometria de massas do tipo LC/ESI-QqTOFMS, MALDI-TOF e nanoESI-QqTOFMS foram detectados 81 componentes de massa. Evidenciaram-se ainda diferenças de componentes na peçonha de indivíduos jovens e adultos e entre os tecidos mais basais e mais distais da glândula de veneno.

Dutra (2006), em dissertação de mestrado, conseguiu a expressão da LTx2, de *Lasiadora* sp., e indicou uma atividade antimicrobiana desse peptídeo na concentração de 400mg/mL.

Castro et al. (2007) depositou as seqüências de mais duas toxinas preditas a partir de cDNA de *Lasiadora* sp., denominadas de LTx4 e LTx5 (Tabela 3), sendo que a primeira apresenta alta similaridade com peptídeos da família Magi-1, de bloqueadores de canais para Sódio e para LTx5 não tem ação farmacológica sugerida.

Dutra et al. (2008), após conseguir a expressão da LTx2, realizaram ensaios eletrofisiológicos e indicaram que essa toxina modifica as oscilações do íon Cálcio através da membrana, atuando nos canais para Ca^{+2} do tipo-L dependentes de voltagem.

Ferreira et al. (2007), em trabalho de iniciação científica, indicam a presença de peptídeos inibidores de proteases e antimicrobianos na hemolinfa de *Lasiadora* sp.

Tabela 3. Sequência de aminoácidos das toxinas peptídicas presentes na peçonha de aranhas do gênero *Lasiadora*.

Toxina	Seqüência	Massa Monosotópica	Massa média
LTX1	FFECTFECEDIKKEGKPKCKPKGCKCKDKDNKDHKKCSGGWRCKLKLCLKF	5727,82*	5731,86*
LTX2	LFECTFECEDIKKEGKPKCKPKGCKCDDKDNKDHKKCSGGWRCKLKLCLKI	5646,78*	5650,74*
LTX3	FFECTFECEDIKKEGKPKCKPKGCKCDDKDNKDHKKCSGGWRCKLKLCLKF	5714,75*	5718,77*
LTX4	CGGVDAPCDK DRPDCCSYAECLRPSGYGWWHGTYCYRKRE	4922,1*	4925,47*
LTX5	MKLSTFIIMISLAVALATWPSEHIEGSDSETKLNVELGPYALADRAEKGDSDLNKGE PCQFHCECRGASVLCVAVYGTSPMYKCMIKRPLPISVLDIMYQAERALEKLASSFRCE	12900,39*	12908,88*
LpTx1	FFECTFECEDIKKEGKPKCKPKGCKCKDKDNKDHKKCSGGWRCKLKLCLKF	5722	-
LpTx2	FFECTLECDIKKEGKPKCKPKGCKCNDKDNKDHKKCSGGWRCKLKLCLKF	5674	-

* - As massa moleculares (Da) foram calculadas com o programa “Molecular Weight Calculator for Windows, versão 6.45” utilizando como base as seqüências obtidas de Vieira et al. (2004) e Castro et al. (2007).

2. Justificativa

No Brasil não existem muitos estudos sobre a peçonha de aranhas da família Theraphosidae. Destacamos o estudo da ação da peçonha bruta da aranha *Theraphosa blondii* com ação bloqueadora de receptores nicotínicos de acetilcolina em preparação de nervo frênico e músculo diafragmático de camundongo (Fontana et al., 2002). Recentemente um estudo com a espécie do sudeste *Vitalius dubius* descreve a caracterização parcial da peçonha utilizando sistema de FPLC e GEL SDS-Page, mostrando a ação enzimática do veneno (Rocha & Silva et al, 2009).

Dentre as caranguejeiras brasileiras o gênero *Lasiadora*, família Theraphosidae, é o mais estudado, como observado na seção anterior. Porém, os trabalhos que enfocam a ação farmacológica não avançaram na busca dos componentes da peçonha bruta responsáveis pela toxicidade. No caso de *Lasiadora parahybana*, dentre os componentes identificados por espectrometria de massa ou seqüenciados por degradação n-terminal de Edman, nenhum teve sua atividade farmacológica testada. Para *Lasiadora* sp. houve um avanço maior, porém ainda não satisfatório. Foram identificadas frações da peçonha que apresentaram toxicidade, porém os componentes responsáveis pela atividade não foram caracterizados. Componentes foram caracterizados por cDNA e tiveram sua atividade predita por similaridade com outros peptídeos tóxicos. A única toxina de *Lasiadora* sp. que foi testada foi a LTx2. Essa toxina apresenta similaridade com toxinas que atuam em receptores para acetilcolina e os ensaios mostraram sua atividade em canais para Ca^{+2} dependentes de voltagem e atividade antimicrobiana.

Diante desse cenário, percebe-se uma série de lacunas que devem ser preenchidas com relação ao estudo das aranhas caranguejeiras brasileiras. Ensaios preliminares realizados no Laboratório de Toxinologia mostraram que a peçonha bruta de *Lasiadora* sp. apresentou atividade antimicrobiana, sendo que a mesma ainda não havia sido descrita para a peçonha bruta.

O conhecimento sobre os componentes da peçonha de aracnídeos é extremamente importante para o desenvolvimento de novos fármacos, além de constituírem ferramentas para a compreensão de mecanismos fisiológicos, como o funcionamento de canais iônicos. A complexidade do veneno também pode ser usada como caractere taxonômico para a organização do grupo Araneae. Escoubas et al.

(1997) apresenta a taxonomia para aranhas do gênero *Brachypelma* baseada nas características químicas da peçonha.

3. Objetivos

- 1- Caracterizar componentes da peçonha da aranha caranguejeira *Lasiadora* sp.
- 2- Verificar a atividade farmacológica da peçonha de *Lasiadora* sp.
 - 2.1- Identificar e isolar peptídeos com atividade antimicrobiana;
 - 2.2- Identificar e isolar peptídeos com atividade hemolítica.
 - 2.3- Identificar componentes com atividade neurotóxica e cardiotoxica.
3. Caracterizar estes peptídeos purificados quanto à sua estrutura primária.

4. Material e Métodos

4.1. Animais: *Lasiadora* sp. é uma nova espécie do gênero *Lasiadora* que ocorre no Cerrado do Brasil Central abrangendo os estados de Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal (Figura 4). Atualmente esta espécie está sendo descrita pelo grupo do professor Rogério Bertani do Instituto Butantan (comunicação pessoal Rogério Bertani). Os espécimes de *Lasiadora* sp. utilizados neste trabalho foram coletados sob licença do IBAMA e mantidos em cativeiro no Laboratório de Aracnologia, sob coordenação do professor Paulo César Motta. Os animais são alimentados regularmente, aproximadamente uma vez ao mês, com camundongos neonatos (*Mus musculus*) e insetos.



Figura 4. *Lasiadora* sp. Foto: Osmino Jr.

4.2. Obtenção da peçonha da *Lasiadora* sp.: A peçonha foi obtida aproximadamente duas semanas após as aranhas terem sido alimentadas. A extração ocorreu com estimulação elétrica da região basal das quelíceras e a peçonha coletada individualmente com o auxílio de tubos de polietileno tipo eppendorf (Estrada et al., 2007). Estas amostras foram imediatamente congeladas e secadas a vácuo. Para quantificação das amostras foi medido a absorvância do material em 280nm com o auxílio de espectrofotômetro, assumindo que uma unidade de absorvância em uma cubeta de 1cm equivale a 1mg/ml de concentração protéica (Caliskan et al., 2006).

4.3. Fracionamento da Peçonha da Peçonha Bruta: As amostras secas a vácuo foram resuspendidas em solução de 0,1% de ácido trifluoracético (1 mg de peçonha bruta/100 µL), centrifugadas a 14.000 rpm e o sobrenadante 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 e coluna analítica C18 Vydac 218TP54 (0,46 x 250 mm).

A eluição foi feita 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 por minuto (Chen et al., 2004). O gradiente teve início com 0% de B por 10 minutos; 0 a 60% de B em 60 minutos; 60 a 100% de B em 10 minutos; 100% de B por 10 minutos, 100 a 0% de B em 5 minutos; com monitoramento em 216 e 280 nm.

As frações coletadas passaram por processo de recromatografia em sistema de RP-HPLC, utilizando gradientes otimizados de acetonitrila ou metanol e monitoradas em comprimentos de onda (216 e 280 nm), as frações manualmente coletadas foram secadas a vácuo. As cromatografias e recromatografias foram realizadas com a mesma coluna analítica C18 Vydac 218TP54 (0,46 x 250 mm).

4.4. Ensaio Antimicrobiano: Para verificar quais frações peptídicas são ativas contra microorganismos, foi realizado ensaio antimicrobiano inicial em placa multi-poços (Nunc F96, Denmark) contra as bactérias patogênicas Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e as Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), baseado no protocolo proposto por Nascimento et al. (2007). Primeiramente estas bactérias foram crescidas em 7 mL de meio Mueller-Hinton a 37°C sob agitação até a densidade óptica igual a 1 a 490 nm. As bactérias, em fase logarítmica de crescimento, foram diluídas em meio Mueller-Hinton (com cloreto de cálcio) nas proporções 1:50 para as Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas. 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 peptídica ressuspendida em água Deionizada. Os controles de crescimento e ausência de crescimento foram 50 µL de água Deionizada e 50 µL de formaldeído 0,4%, respectivamente. O crescimento e inibição bacteriana foram determinados pela leitura da densidade óptica a 495 nm com uma leitora de placa BioRad (Modelo3550-UV, Hercules, CA, USA). Para alguns peptídeos que apresentaram atividade antimicrobiana foi realizado o ensaio para a determinação da concentração inibitória

mínima (MIC), ou seja, a menor concentração de peptídeo onde nenhum crescimento é detectado. O ensaio de MIC foi realizado com a incubação das culturas de bactérias juntamente com os peptídeos diluídos seriadamente.

4.5. Ensaio Hemolítico: Este ensaio hemolítico foi realizado de com o protocolo utilizado por Castro et al. (2005). As células foram separadas do plasma por sedimentação e preparado 1% (v/v) da suspensão de eritrócitos de sangue humano (lavado três vezes com NaCl 0,15 M, Tris-HCL 0.01 M, pH 7,4). As frações foram ressuspendidas em 50 µL do tampão salino e adicionadas a tubos de polietileno com 50 µL da solução de hemáceas. Após 60 min de incubação à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 2 min. Uma porção de 100 µL de cada sobrenadante foi transferida para uma placa multi-poços (*Nunc, Denmark*) e realizada a leitura em 405 nm (BioRad 3550-UV). As amostras de referência foram empregadas utilizando-se 1% (v/v) da suspensão de eritrócitos incubada 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%.

4.6. Ensaio cardiotoxíco: Um macho adulto de *Lithobates catesbeianus* foi espinhalado, dissecado, teve seu coração isolado e o átrio removido. Uma fina fatia foi cortada do ventrículo e imersa em solução de Ringer (NaCl: 135 mM; KCl: 5 mM; CaCl₂: 2 mM; MgCl₂: 1 mM; NaH₂PO₄: 1 mM; NaHCO₃: 15 mM e dextrose: 11 mM), sendo constantemente aerada. A tensão no coração foi constantemente gravada em um transdutor (modelo N-5) conectado a um polígrafo (NARCO Bio systems). A atividade cardíaca foi gravada e analisada no momento em que a preparação recebia cada uma das amostras testadas. As condições do estimulador/polígrafo eram de 100 V (voltagem), 3,0 ms (duração do estímulo), 0,25 mm/s (velocidade do papel) e 0,4 Hz (frequência).

4.7. Eletrofisiologia: Foram usadas pipetas de vidro conectando a célula ao sistema eletrônico de *Patch-Clamp*. Todas as leituras registradas foram realizadas em amplificadores Axopatch-200 and Axopatch-200A conectados a computadores utilizando canais de aquisição Axon Instruments Digitada 1200. As correntes foram amostradas a 500µs por ponto e filtradas *in-line* a 1 kHz. Para aquisição de dados e análises, foi utilizado o *software* pClamp7 (*Axon Instruments, Foster City, CA, USA*). Os registros em *patch-clamp* foram obtidos à temperatura ambiente, a resistência da pipeta (1-2µV), a capacitância da célula e resistência em série foram devidamente

compensados antes da execução dos protocolos. **Ensaio em canais de Sódio voltagem dependentes:** Células do clone F-11 (neuroblastoma de camundongo N18TG-2) foram mantidas em meios de cultura apropriados e incubadas a 37°C em uma atmosfera úmida com 5% CO². **Ensaio em receptores de acetilcolina do tipo nicotínicos:** A linhagem TE671 de rhabdomiosarcoma humano foi cultivado em DMEM contendo 4,5g/L de glicose e 10% de FCS. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO². A resistência da pipeta ficou entre 1-2 MΩ e a resistência de acesso à célula foi menor que 3 MΩ. O menor sinal de corrente filtrado foi 10 kHz e adquirido em linha até 20 kHz. A voltagem aplicada à célula foi de -60mV e as correntes foram obtidas pela aplicação do agonista de acetilcolina a 10 μM por 4-6 s. Durante o experimento, ACh foi aplicada pelo menos três vezes em intervalos de 90 s, para a confirmação da estabilidade da corrente e a exclusão de artefatos devido a degradação do canal. O efeito da aplicação de cada toxina (1μM) foi avaliado por 1 min, seguido imediatamente pela aplicação de ACh.

4.8. Espectrometria de Massa e Sequenciamento *De Novo*: Espectrometria de massa em sistema MALDI TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha) foi realizado para a inspeção de massas moleculares (MS) e para fragmentação das amostras de interesse (MS/MS). Para MALDI TOF as frações foram diluídas em uma matriz saturada de ácido α-ciano 4-hidroxi-cinâmico dissolvidas em acetonitrila/água/3% ácido trifluoroacético (2,5/2/0,5). Para componentes de massa com maior massa molecular foi utilizado como matriz o ácido sinapínico, com o intuito de obter espectrogramas de massa de melhor resolução (Lambert et al., 1998). As análises foram realizadas operando no modo refletido ou linear positivo. A calibração do instrumento foi realizada externamente com ions [M+H]⁺ angiotensina I, angiotensina II, substância P, bombesina, cadeia B insulina e hormônio adrenocorticotropico.

4.9. Sequenciamento N-terminal: A obtenção da estrutura primária dos peptídeos ou a confirmação do sequenciamento *de novo* foi determinada por degradação automática de Edman, por meio do sequenciador Applied Biosystem 477 A. 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 sequências e comparação das substituições de aminoácidos.

5. Resultados

5.1. Cromatografia e identificação dos componentes da peçonha de *Lasiadora* sp.

A peçonha de *Lasiadora* sp. foi fracionada por cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC). As cromatografias apresentaram perfis cromatográficos com reprodutividade satisfatória. Foram obtidas 51 frações cromatográficas, numeradas de acordo com a ordem de eluição da coluna (Figura 5). Um grupo de frações pouco hidrofóbicas e de difícil separação recebeu a nomeação de JL1 (Junção 1 de *Lasiadora* sp.). As frações em destaque na figura um referem-se às frações testadas em ensaios biológicos, como será detalhado nas seções seguintes.

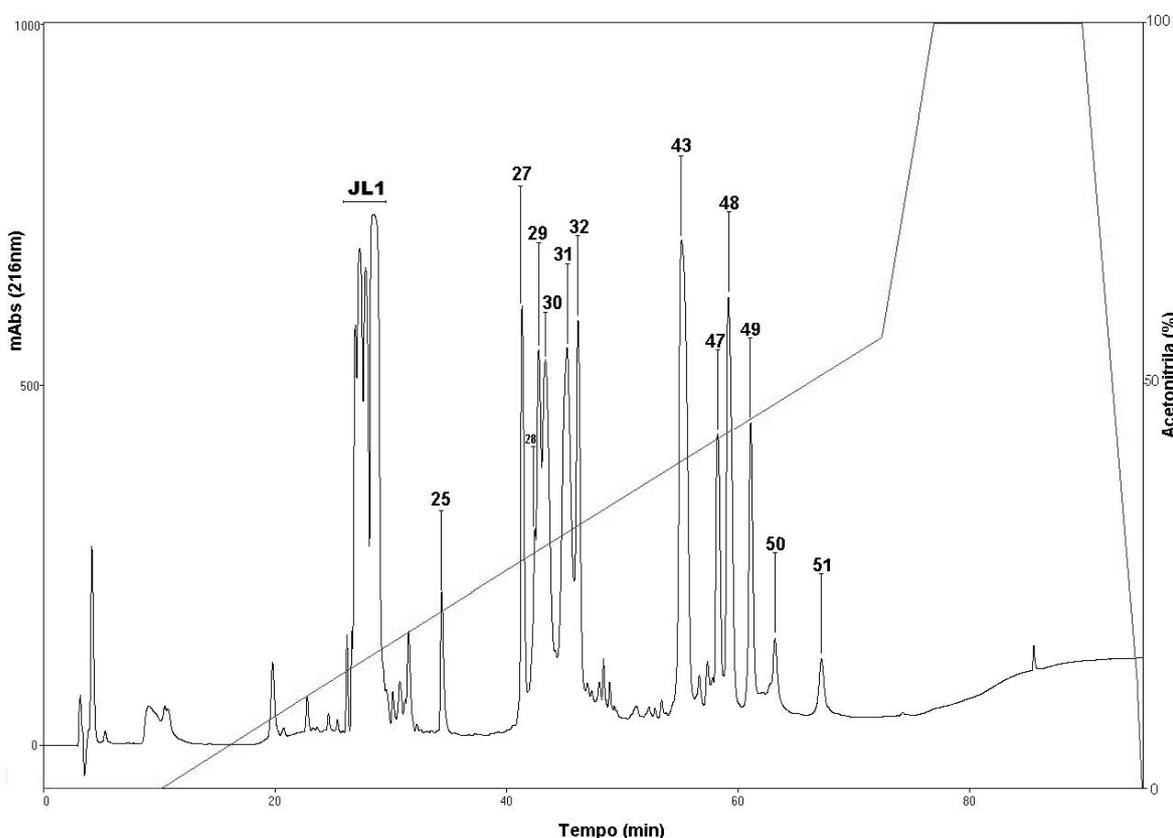


Figura 5. Cromatograma da peçonha bruta de *Lasiadora* sp.; sistema RP-HPLC coluna analítica C18 Vydac 218TP54 (0,46 x 250 mm).

Os espectrogramas de massa da peçonha bruta de *Lasiadora* sp. em sistema MALDI-TOF modo refletido e linear podem ser observados nas figuras 6 e 7, respectivamente. No modo refletido foi possível a identificação de componentes de massa 601,39 e 729,56 (m/z), e não sendo possível a visualização de nenhum outro componente, nas condições analisadas. O módulo linear mostra alguns peptídeos na

faixa de 4500 - 8500 Da e suas respectivas cargas duplamente protonadas na faixa de 2000 - 4000 Da.

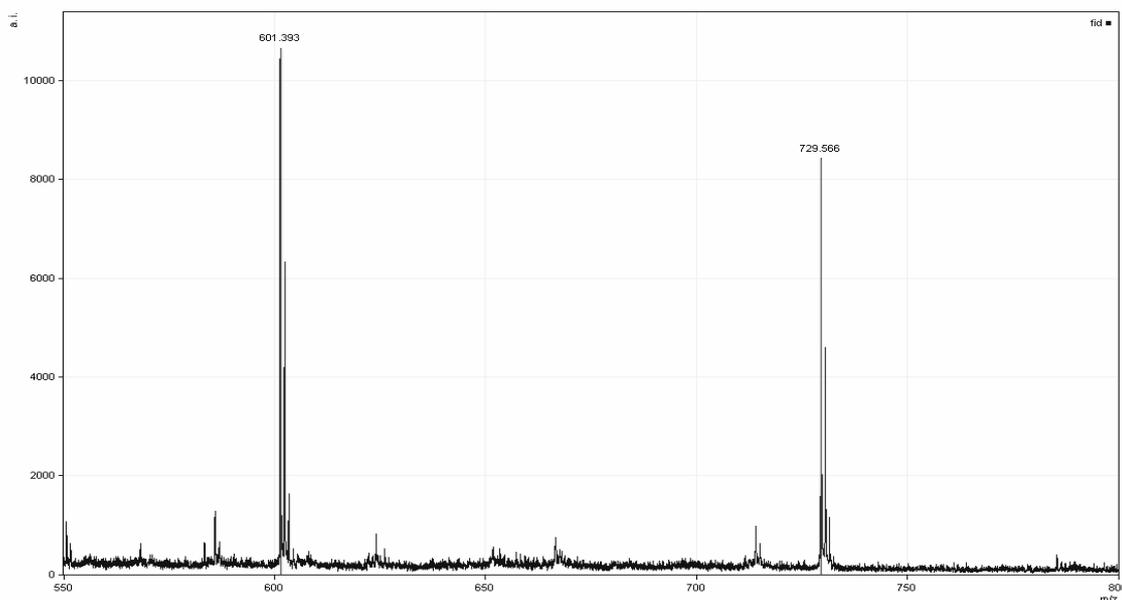


Figura 6. Espectrograma de massa da peçonha bruta de *Lasiodora* sp. em sistema MALDI-TOF modo refletido, faixa de 550 a 800 m/z. (Zoom da aquisição realizada na faixa de 550 a 3500 m/z).

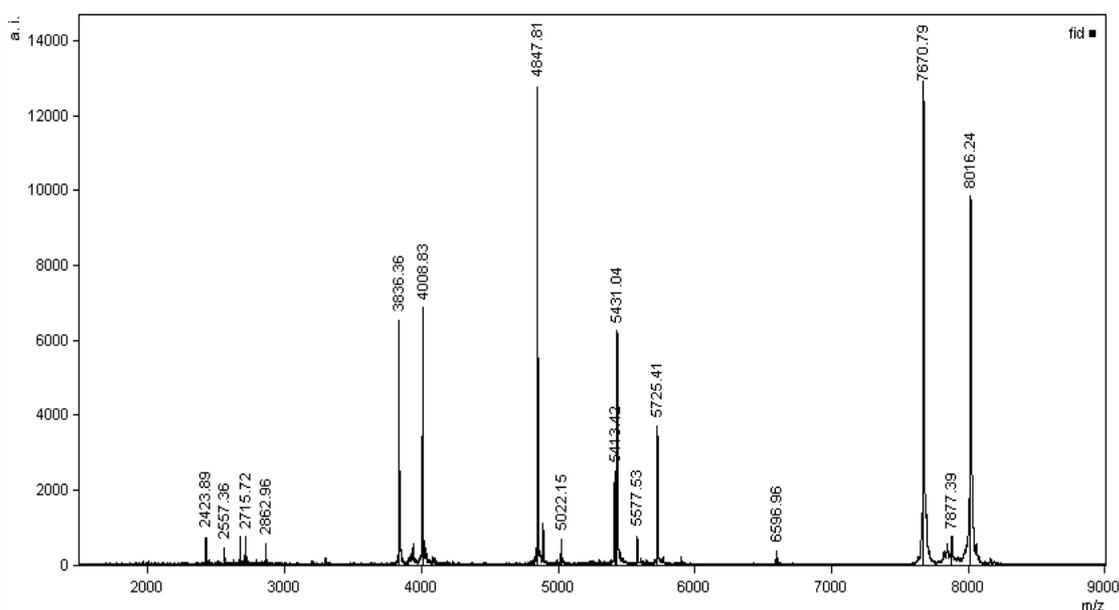


Figura 7. Espectrograma de massa da peçonha bruta de *Lasiodora* sp. em sistema MALDI-TOF modo linear, faixa de 1000 a 9000 m/z.

O perfil de massas moleculares característico da peçonha de *Lasiodora* sp. foi obtido através das 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 191 componentes detectados, separados por faixas de massa

(m/Z). Destaca-se a abundância na faixa 500-1000 Da, um total de 32 componentes, que representam 16,8% do total de massas observadas. As faixas entre 4000 e 6000 Da e entre 6500 e 8500 agrupam o maior número de componentes encontrados 58 (30,3%) e 46 (24,1%), respectivamente (figura 8).

Tabela 4. Massas obtidas nas frações cromatográficas do primeiro fracionamento em HPLC da peçonha bruta de *Lasiodora* sp., as frações foram analisadas em equipamento MALDI-TOF/TOF em modo refletido e linear utilizando como matriz o ácido sinápico ou ácido α -ciano 4-hidroxi-cinâmico. Destacados em cinza componentes de massa aproximada as encontradas em *L. parahybana*, Guete et al., 2006.

M/Z (Da)																		
500 - 1000	1000 - 1500	1500 - 2000	2000 - 2500	2500 - 3000	3000 - 3500	3500 - 4000	4000 - 4500	4500 - 5000	5000 - 5500	5500 - 6000	6000 - 6500	6500 - 7000	7000 - 7500	7500 - 8000	8000 - 8500	8500 - 9000	9000 - 9500	
512,00	1003,77	1500,94	2004,14	2541,38	3298,83	3656,25	4008,86	4594,86	5012,76	5531,86	6038,44	6559,10	7005,75	7541,14	8015,14	8572,96	9041,65	
540,12	1035,68	1515,33	2057,74	2555,07		3705,80	4092,91	4622,01	5032,74	5542,71	6087,13	6573,04	7023,93	7565,01	8040,17			
560,82	1066,20	1552,76	2240,69	2569,21		3739,29	4113,73	4648,13	5050,62	5564,35	6297,28	6582,57	7042,06	7578,06	8058,91			
586,31	1082,13	1640,36	2364,15	2672,63		3836,99	4146,02	4662,38	5129,31	5579,86	6400,71	6597,12	7083,52	7677,86	8090,97			
591,17	1088,79	1797,11	2424,45	2790,39		3893,32	4198,98	4676,64	5144,70	5645,96	6434,03	6618,81	7102,76	7693,10	8101,81			
596,65	1104,11	1967,92	2476,68	2863,50		3920,20	4222,30	4691,93	5187,65	5661,86		6748,07	7169,95	7764,61	8166,11			
601,34	1116,43					3936,75	4353,62	4720,70	5218,59	5679,56		6764,37	7185,67	7820,00	8225,30			
614,96	1123,14					3953,29	4411,39	4749,32	5238,24	5697,07		6784,69	7213,20	7842,87	8240,63			
623,63	1131,94					3993,66	4439,89	4764,48	5285,10	5701,27		6792,99	7316,13	7877,13	8350,75			
635,42	1157,77						4471,76	4777,11	5297,87	5714,82		6813,07	7350,38	7886,20	8381,87			
636,93	1176,50							4781,40	5430,95	5725,11		6830,90		7906,71				
652,86	1254,54							4827,61	5442,57	5762,42		6936,29		7933,86				
658,25	1277,31							4847,34	5487,89	5798,05		6941,72		7980,74				
667,57	1292,02							4869,67		5895,03								
701,70	1309,08							4901,94		5940,37								
714,50	1349,16							4912,19										
729,31	1364,16							4940,57										
743,29	1420,17							4955,35										
748,84	1477,94							4969,40										
763,57								4999,36										
773,88																		
785,00																		
808,68																		
823,67																		
854,92																		
870,70																		
877,13																		
890,96																		
927,70																		
949,74																		
965,65																		
986,75																		

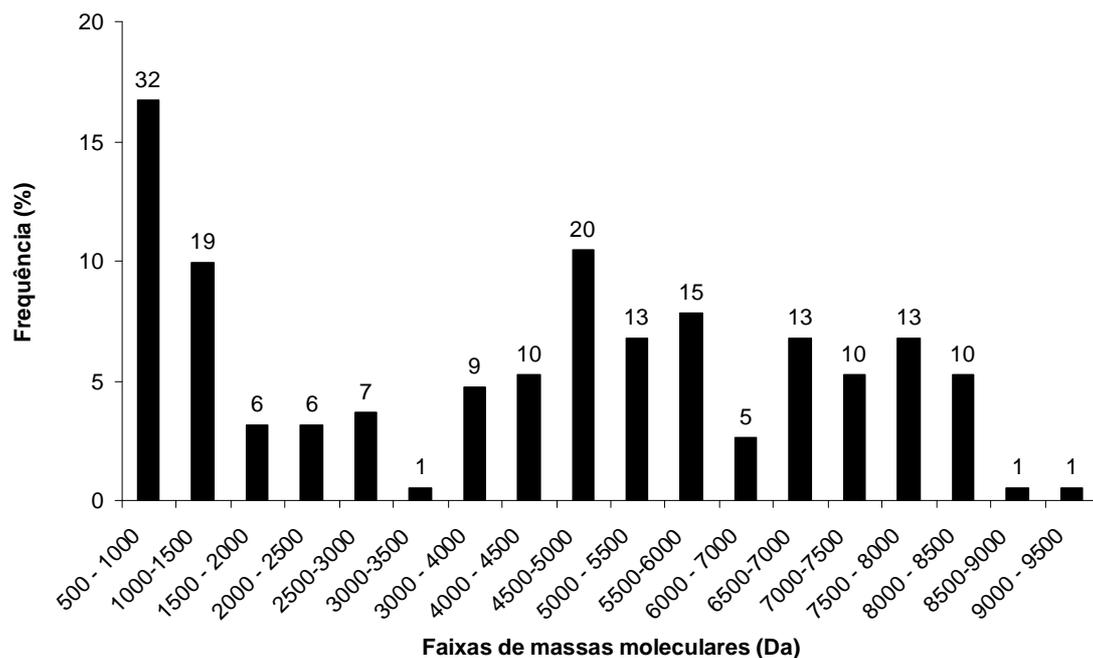


Figura 8. Frequência dos componentes de massas obtidas das frações cromatográficas da peçonha de *Lasiadora* sp., os números apontados em cima de cada série de dados indica o número de componentes identificados.

A figura 9 apresenta a distribuição de massas com relação ao tempo de retenção e porcentagem de acetonitrila necessária para a eluição em sistema RP-HPLC.

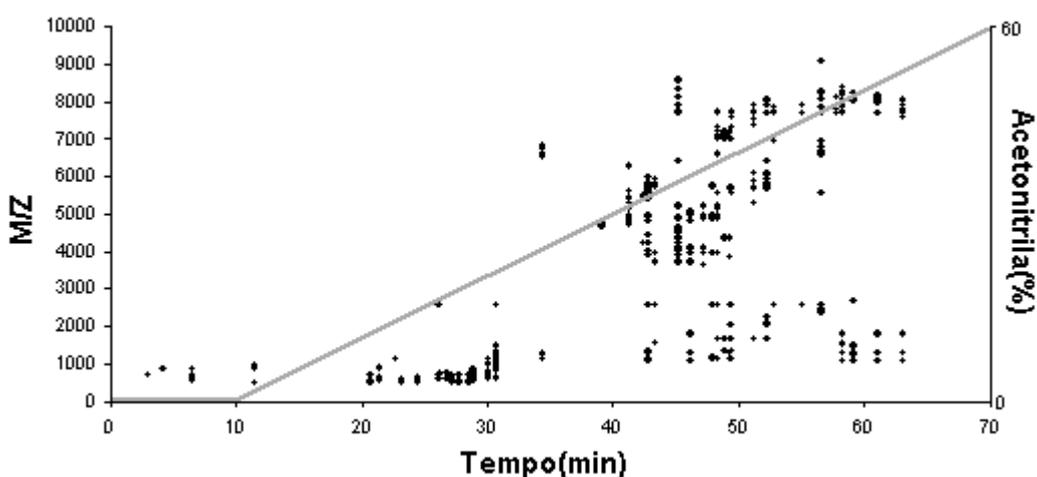


Figura 9. Distribuição dos componentes de massas em relação à hidrofobicidade. A linha cinza indica o gradiente de acetonitrila.

5.2. Ensaio antimicrobiano e hemolítico

A peçonha bruta de *Lasiodora* sp. foi testada em diluição seriada, concentração inicial de 1024µg/mL, para a inibição do crescimento de *S. aureus* e *E. coli*. Em uma concentração de 128µg/mL a peçonha bruta inibiu 76% o crescimento de *S. aureus*. O resultado para *E. coli* foi a inibição de 40% do crescimento nas concentrações de 64µg/mL e 32µg/mL, sendo que não houve inibição de 100% do crescimento para essas bactérias. A figura 10 (A e B) detalha os resultados obtidos com a diluição seriada da peçonha.

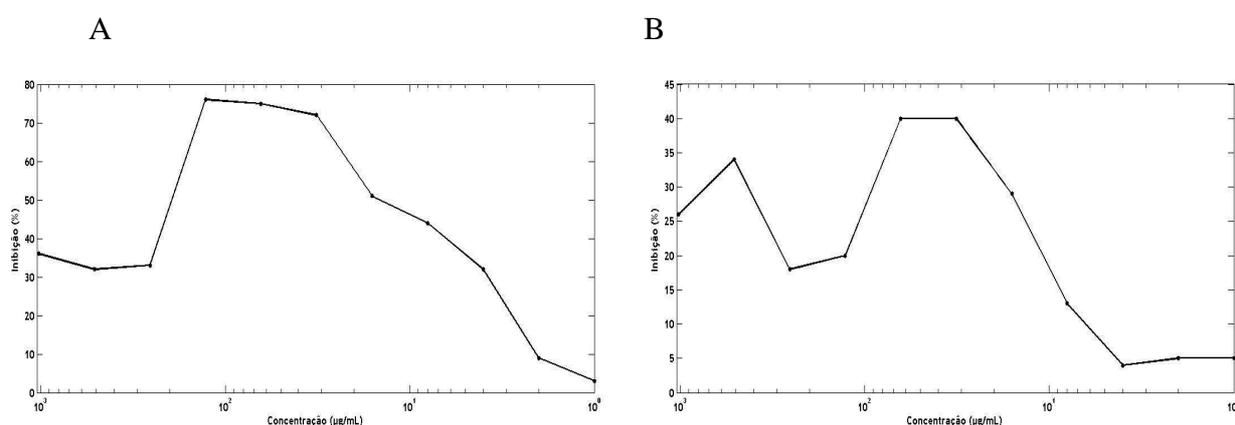


Figura 10. Gráficos mostrando a inibição do crescimento de *S. aureus* (A) e *E. coli* (B) causada pela peçonha bruta de *Lasiodora* sp.

As frações cromatográficas com maior absorvância e com o tempo de retenção superior a 30 minutos foram testadas em ensaios antimicrobiano e hemolítico de caráter qualitativo.

As frações 25, 28, 32 e 47 apresentaram inibição do crescimento para *E. coli*. As frações 43, 49, 50 e 51 apresentaram inibição do crescimento para *S. aureus*. Nenhuma das frações testadas apresentou atividade hemolítica (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de inibição do crescimento microbiano de *E. coli* e *S. aureus* e atividade hemolítica. (-) se atividade

Frações	25	27	28	29	30	31	32	43	47	48	49	50	51
<i>E. coli</i>	15%	-	22%	-	-	-	25%	-	14%	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	24%	-	45%	40%	42%	-
Hemolítico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5.3. Purificação e caracterização química

5.3.1. Recromatografias e espectrometria de massa MALDI-TOF

Após realização dos ensaios hemolíticos e de inibição de crescimento bacteriano, algumas frações com atividade foram submetidas a recromatografia para a purificação dos componentes responsáveis pela atividade biológica apresentada. Mesmo não apresentando atividade antibacteriana e hemolítica, a fração cromatográfica 27 foi recromatografada devido a sua relativa abundância e boa separação na cromatografia. Todas essas frações foram submetidas à análise de espectrometria de massa em sistema MALDI-TOF para a confirmação do grau de pureza.

A fração cromatográfica 25 foi recromatografada para a obtenção do seu componente principal F25 (figura 11).

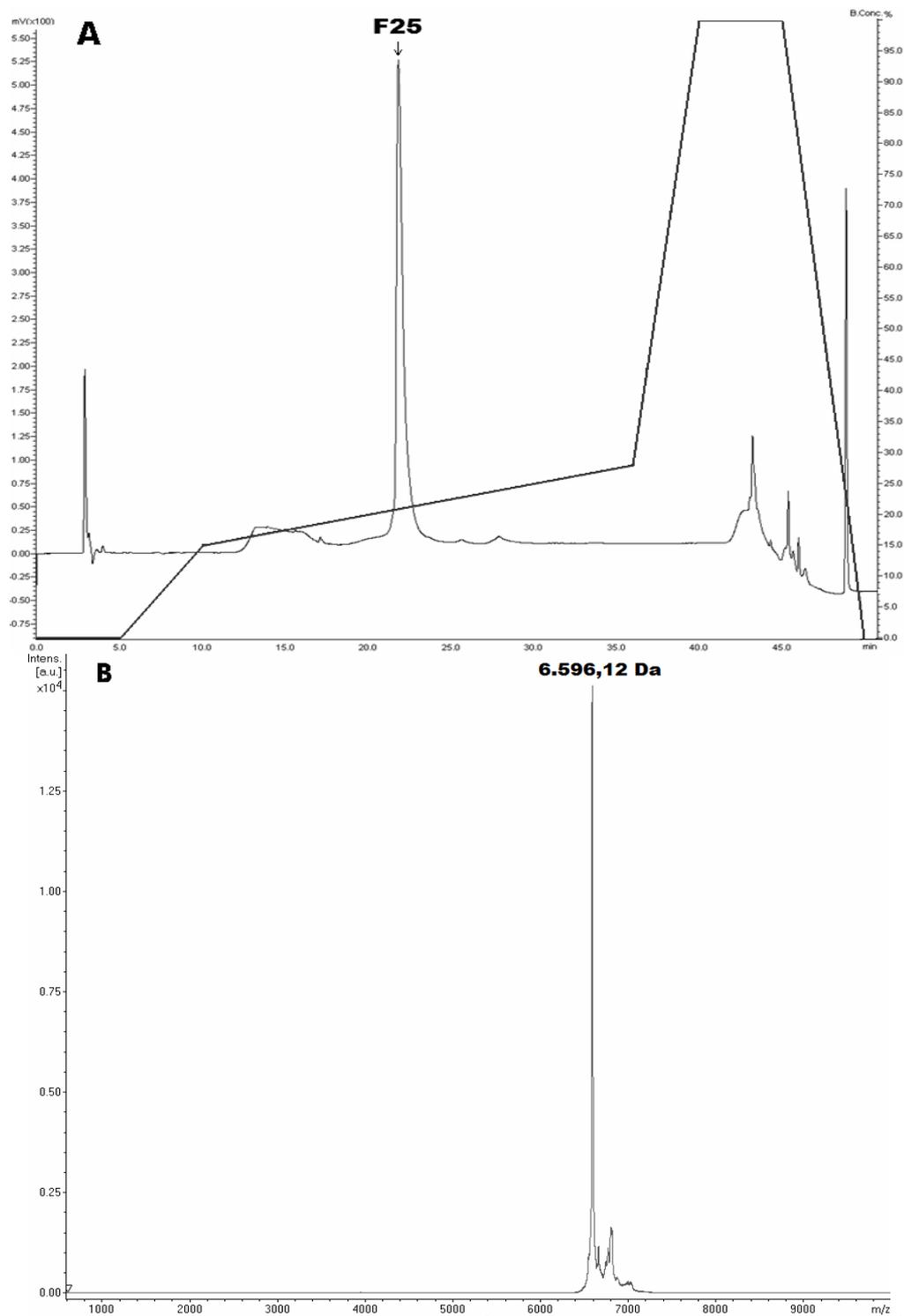


Figura 11. A - Recromatografia da fração cromatográfica 25 sistema RP-HPLC, coluna analítica C18 Vydac 218TP54 (0,46 x 250 mm), gradiente de acetonitrila otimizado. B - Espectrograma de massa sistema MALDI-TOF, matriz ácido sinapínico, modo linear.

A recromatografia da fração 27 está apresentada na figura 12, juntamente com os espectrogramas de massa dos componentes F27.1 e F27.2.

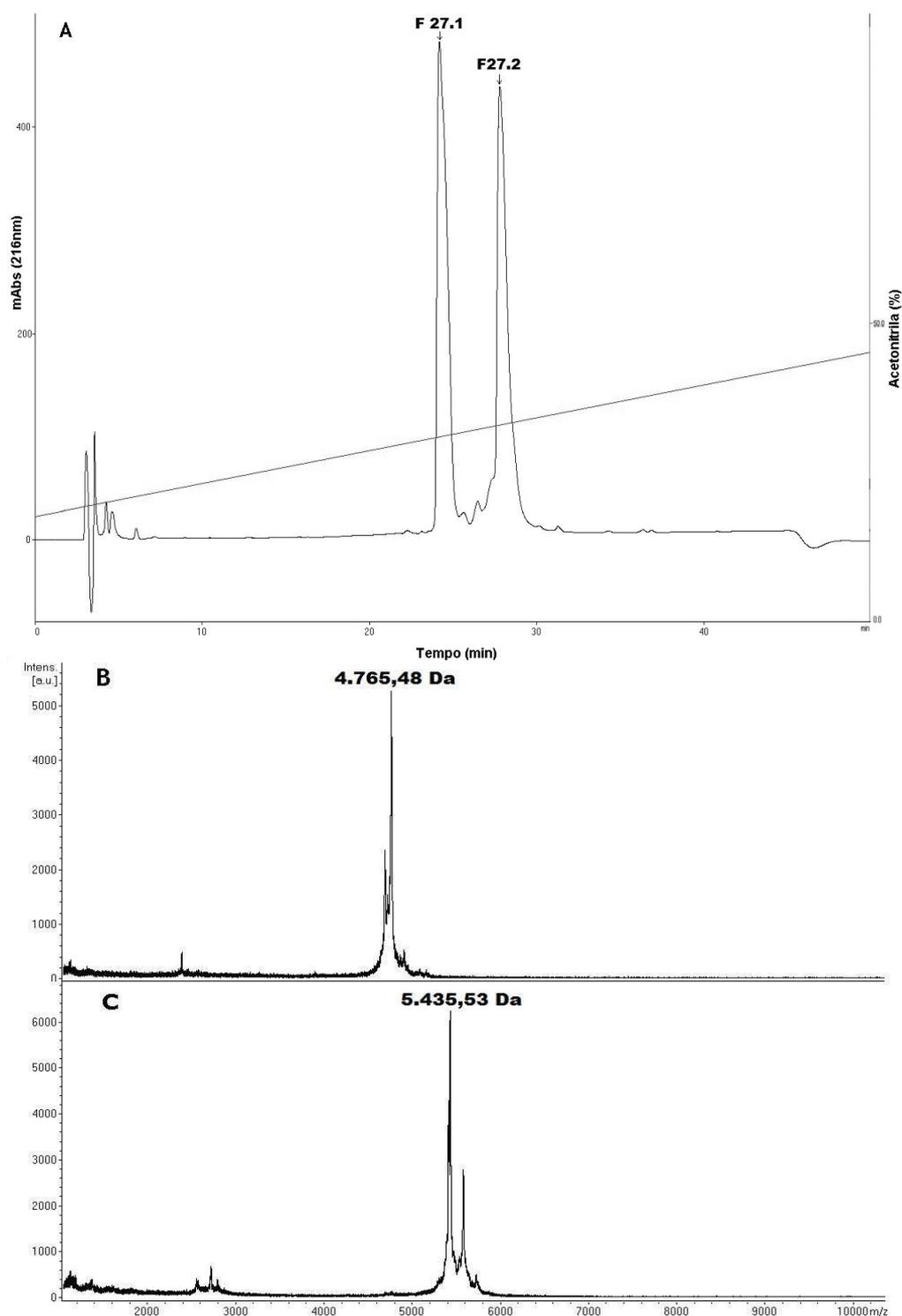


Figura 12. A - Recromatografia da fração cromatográfica 27 sistema RP-HPLC, coluna analítica C18 Vydac 218TP54 (0,46 x 250 mm), gradiente de acetonitrila otimizado. B - Espectrogramas de massa dos componentes F27.1(B) e F27.2 (C), MALDI-TOF, matriz ácido sinapínico, modo linear.

A figura 13 mostra a recromatografia da fração cromatográfica 32 e o espectrograma de massa do componente F32.

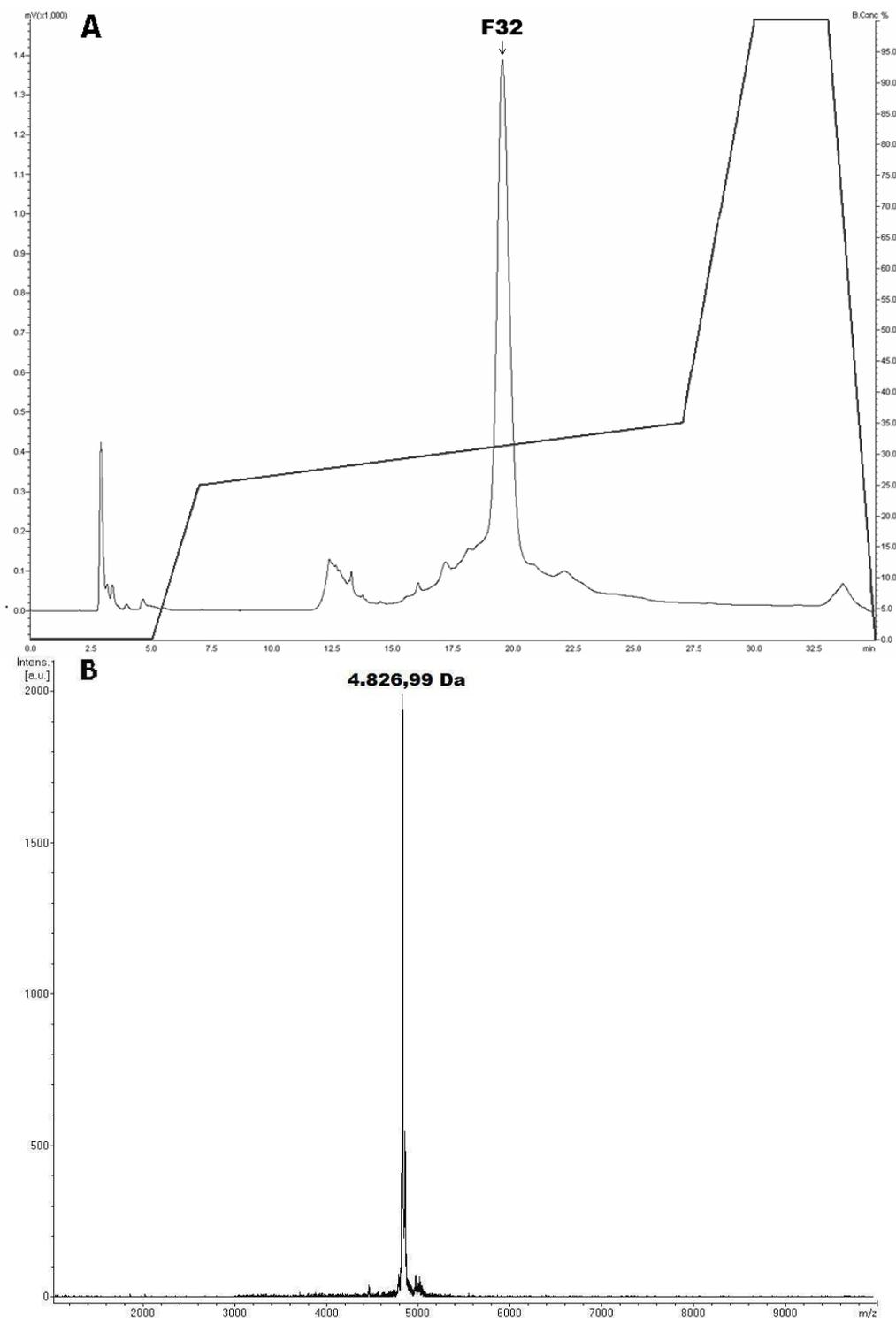


Figura 13. A - Recromatografia da fração cromatográfica 32 sistema RP-HPLC, coluna analítica C18 Vydac 218TP54 (0,46 x 250 mm), gradiente de acetonitrila otimizado. B - Espectrograma de massa sistema MALDI-TOF, matriz ácido sinápico, modo linear.

A figura 14A apresenta a recromatografia da fração cromatográfica 43, mostrando que a mesma é composta de 4 componentes denominados de F43.1, F43.2, F43.3 e F43.4. A figura 14B apresenta o espectrograma de massa do componente mais

abundante, F43.3. Os peptídeos P43.1 e F43.2 apresentam massa molecular 7606,18 Da e 7652,91 Da, respectivamente.

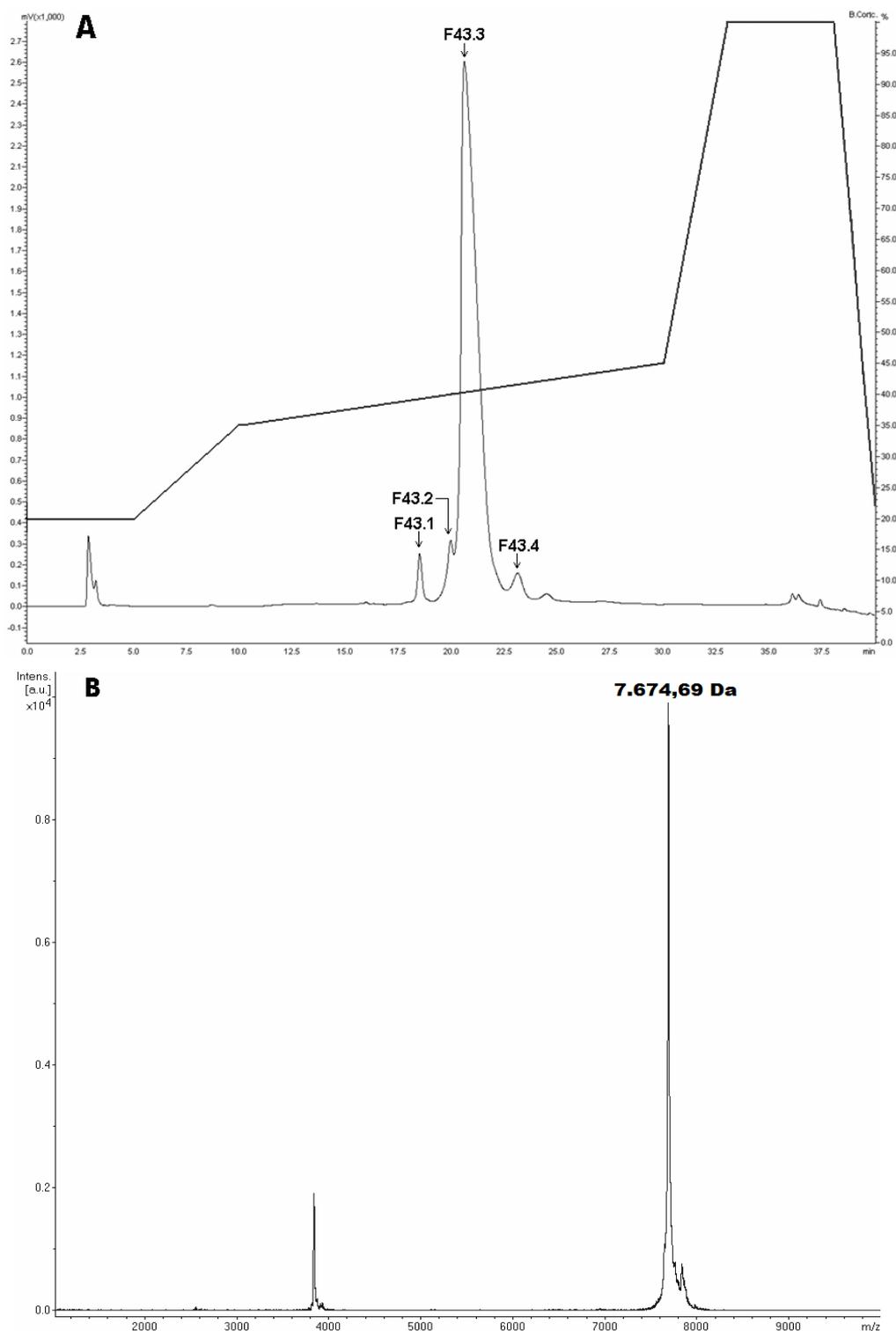


Figura 14. A - Recromatografia da fração cromatográfica 43 sistema RP-HPLC, coluna analítica C18 Vydac 218TP54 (0,46 x 250 mm), gradiente de acetonitrila otimizado; B - Espectrograma de massa da componente 43.3, sistema MALDI-TOF, matriz ácido sinapínico, modo linear.

A recromatografia da fração cromatográfica 48 é apresentada na figura 15A, juntamente com o espectrograma de massa do componente F48 (figura 15B).

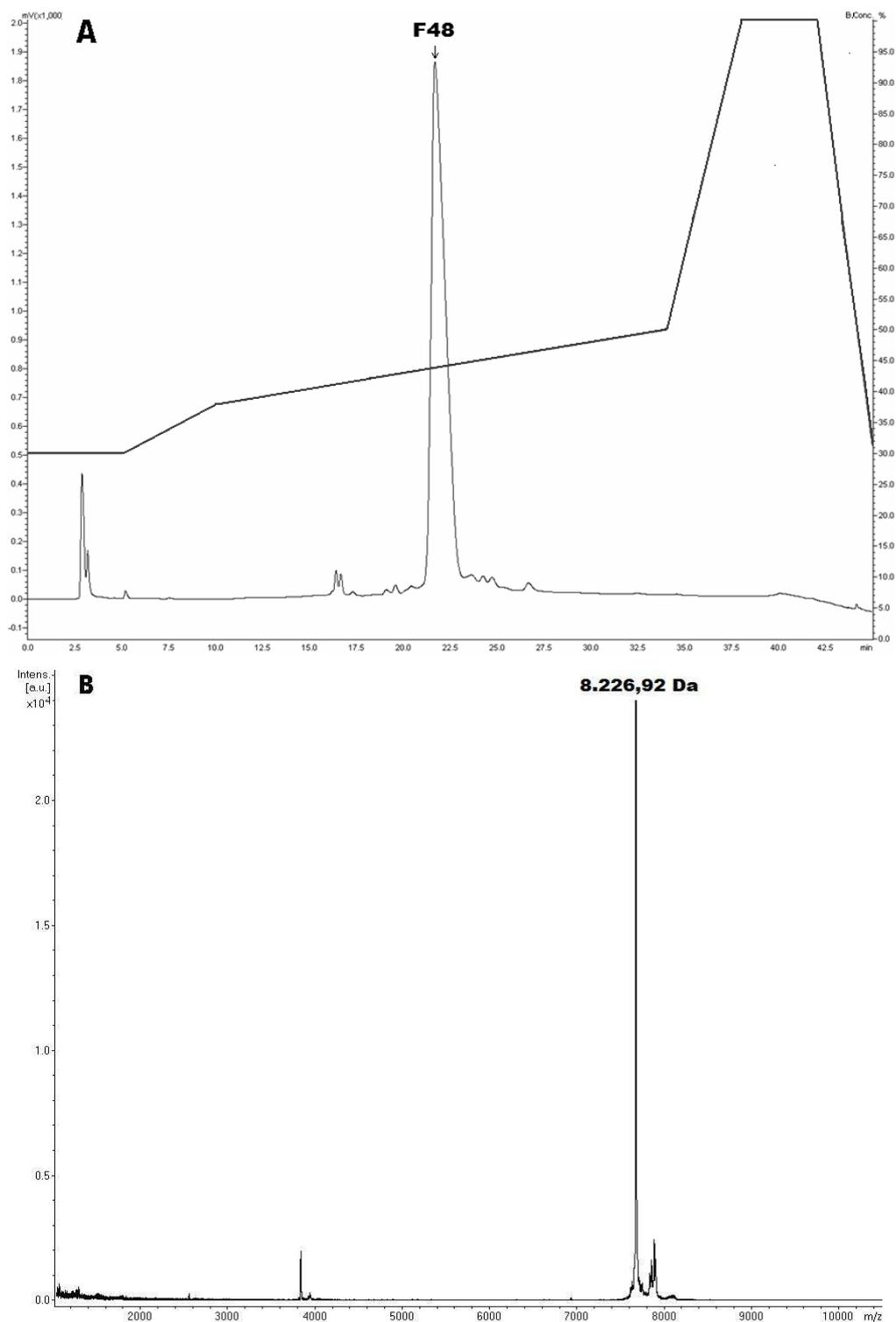


Figura 15. A - Recromatografia da fração cromatográfica 48 sistema RP-HPLC, coluna analítica C18 Vydac 218TP54 (0,46 x 250 mm), gradiente de acetonitrila otimizado. **B** - Espectrograma de massa sistema MALDI-TOF, matriz ácido sinápico, modo linear.

5.3.2. Sequenciamento, alinhamentos e similaridades.

As sequências obtidas por sequenciamento do n-terminal por degradação de EDMAN são mostrados na tabela 6.

Tabela 6. Sequência peptídica parcial do componente principal de algumas frações cromatográficas da peçonha de *Lasiodora* sp., mostrando massa média obtida em sistema de MALDI TOF e tempo de retenção no cromatograma.

Peptídeo	Sequência parcial	Massa média (Da)	RT (min)
F25	CSSQGEKNAGYCCAGGGSYRXT...	6.596,12	34,34
F27.1	CGGVDAPCDKDRPDCCSYAE...	4.765,48	41,29
F27.2	XECTFECDIKKEGKPCXPGG...	5.435,53	41,29
F43.3	GKKGKKSIDEGQPCQFHCE...	7.674,69	55,08

Todas as sequências peptídicas parciais obtidas foram comparadas com sequências previamente depositadas no banco *Swiss prot*. Nenhuma sequência de toxina descrita apresentou similaridade com a sequência parcial do peptídeo F25.

O peptídeo 27.1 apresentou similaridade com a toxina LTx4, identificada em *Lasiodora* sp. (Castro et al., 2007) (figura 16). A sequência da LTx4 já foi depositada no banco de dados *Swiss prot*, porém ainda não foi descrita na literatura.

F27.1 - 1	CGGVDAPCDKDRPDCCSYAE	20
LTx4 - 58	CGGVDAPCDKDRPDCCSYAECLRPSGYGWWHGTYCYRKRER	100

Figura 16. Alinhamento da toxina F27.1 com o peptídeo maduro da toxina LTx4; 100% de identidade para o fragmento analisado e expectância de 2×10^{-11} .

O peptídeo 27.2 apresentou similaridade com as toxinas LTx1, LTx2 e LTx3. Essas toxinas também foram identificadas na biblioteca de cDNA de *Lasiodora* sp. (Vieira et al., 2004) (figura 17).

F27.2 - 1	XECTFECDIKKEGKPCXPGG	21
LTx1 - 51	FFECTFECDIKKEGKPCPKPGCKCKDKDNKDHHKCSGGWRCKLKLCLKF	100
LTx2 - 51	LFECTFECDIKKEGKPCPKPGCKCDDKDNKDHHKCSGGWRCKLKLCLKI	100
LTx3 - 51	FFECTFECDIKKEGKPCPKPGCKCDDKDNKDHHKCSGGWRCKLKLCLKF	100

Figura 17. Alinhamento da toxina F27.2 com os peptídeos maduros das LTx1-3; 100% de identidade para o fragmento analisado e expectância de 2×10^{-9} .

O peptídeo F43.3 apresentou similaridade com toxina LTx5 (figura 18). Assim como a LTx4, a LTx5 já possui sequência depositada no banco de dados *Swiss prot*, porém ainda não foi descrita na literatura (Castro et al., 2005).

F43.3	-	1	GKKGKKDSIDEGQPCQFHCE	20
LTx5	-	1	MKLSTFIIMISLAVALATWPSEHIEGSDSETKLNVELGPYALADRAEKGKDDSLNKGE PCQFHCECRGASVLC EAVYGTRSPMYKCMIKRLPISVLDIMYQAERALEKCLASSFRCE	116
Alinhamento				
F43.3	2		KGK DS+++G+PCQFHCE	20
LTx5	48		KGKDDSLNKGEPCQFHCE	65

Figura 18. Sequências das toxinas F43.3 e LTx5 e o alinhamento entre elas. A identidade entre as moléculas é de 72%.

5.4. Ensaios eletrofisiológicos

A similaridade e o alinhamento entre as sequências parciais dos peptídeos F25, F27.1, F27.2 e F43.3 e as sequências de outras toxinas existentes em banco de dados, orientou os ensaios eletrofisiológicos. A toxina LTx4 pertence à família de peptídeos Magi-1, onde são encontrados peptídeos com atividade em canais para Sódio dependentes de voltagem. Esse fato determinou a escolha desse tipo de canal para o primeiro teste com o peptídeo F27.1. Os peptídeos F25, F27.2 e F43.3 também tiveram sua atividade testada em canais para Sódio voltagem dependentes.

A figura 19 apresenta a resposta à aplicação do peptídeo F25 em canal para Sódio voltagem dependente (Nav1.1). O peptídeo não apresentou atividade para o canal testado.

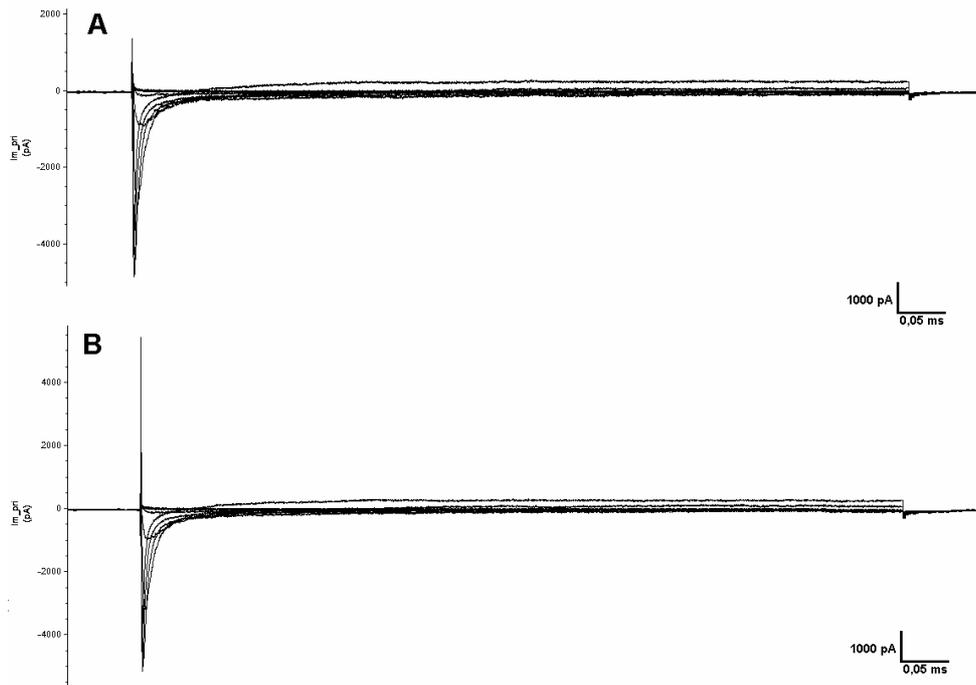


Figura 19. Ensaio eletrofisiológico em *Whole-cell Patch Clamp*, mostrando as correntes de sódio. A - Ensaio de estabilidade da preparação, B - após aplicação por 1 minuto de $1\mu\text{M}$ do peptídeo F25.

A figura 20 mostra a aplicação do peptídeo F27.1 em preparação de canal para Sódio dependente de voltagem. O peptídeo não alterou as correntes de Sódio.

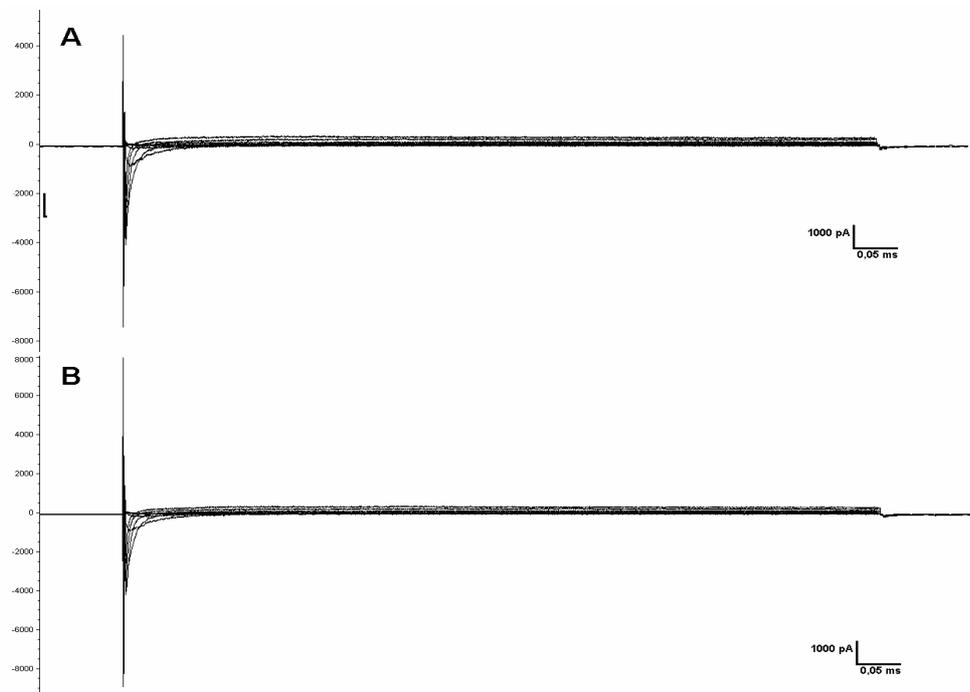


Figura 20. Ensaio eletrofisiológico em *Whole-cell Patch Clamp*, mostrando as correntes de sódio. A - Ensaio de estabilidade da preparação, B - após aplicação por 1 minuto de $1\mu\text{M}$ do peptídeo F27.1.

Os resultados da aplicação do peptídeo F27.2 indica que este canal não é um de seus alvos (figura 21).

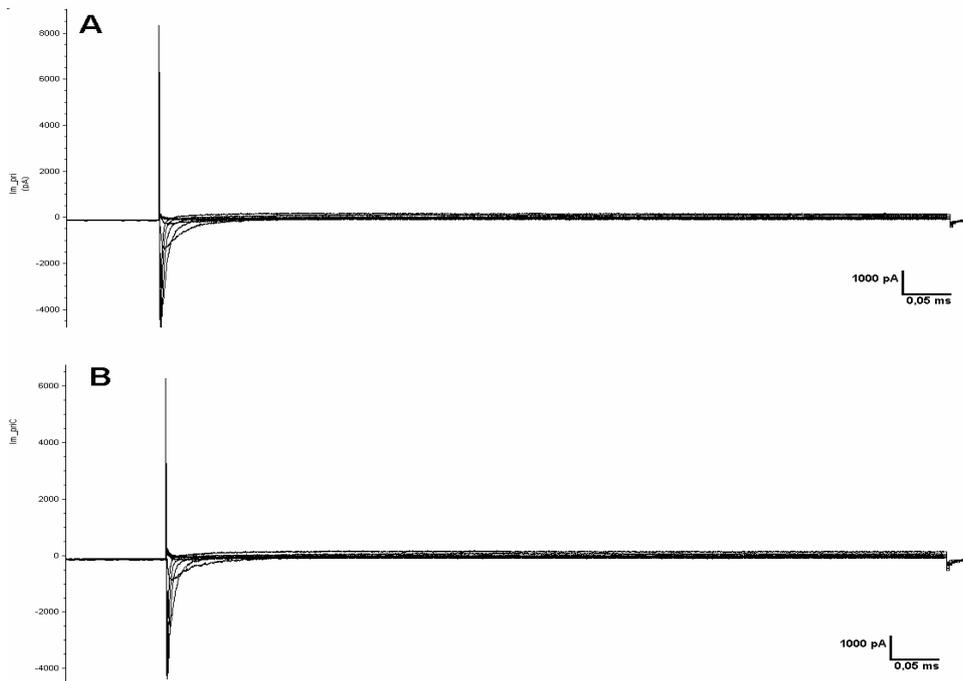


Figura 21. Ensaio eletrofisiológico em *Whole-cell Patch Clamp*, mostrando as correntes de sódio. A - Ensaio de estabilidade da preparação, B - após aplicação por 1 minuto de 1 μM do peptídeo F27.2.

As correntes foram mantidas após a aplicação do F43.3 (figura 22).

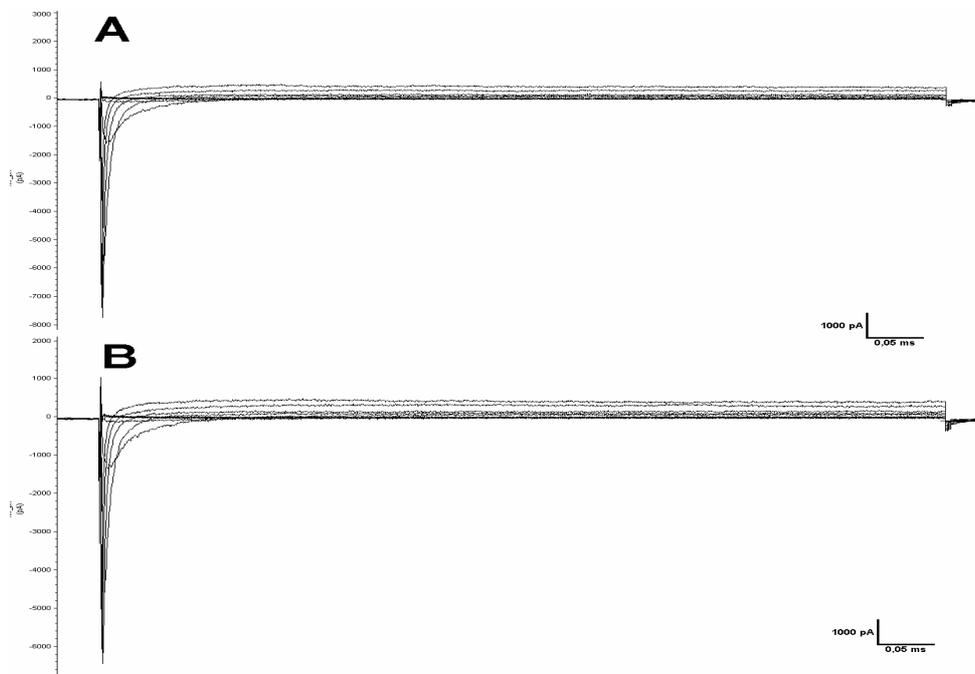


Figura 22. Ensaio eletrofisiológico em *Whole-cell Patch Clamp*, mostrando as correntes de sódio. A - Ensaio de estabilidade da preparação, B - após aplicação por 1 minuto de 1 μM do peptídeo F43.3.

A toxina F27.2 apresentou similaridade com as toxinas LTx1, LTx2 e LTx3, que pertencem à família de peptídeos das Hwentoxinas-2. Essa família apresenta toxinas descritas com atividade em receptores nicotínicos de acetilcolina. Baseada nessa similaridade, testou-se o efeito do peptídeo F27.2 sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina. Esse mesmo ensaio eletrofisiológico também foi realizado com os peptídeos F25, F27.1 e F43.3.

O controle positivo para esse experimento foi realizado com a aplicação de $10\mu\text{M}$ de Beta-tubocurarina (figura 23). Evidencia-se a estabilidade da preparação, o não rompimento da célula e a interrupção da corrente após a aplicação.

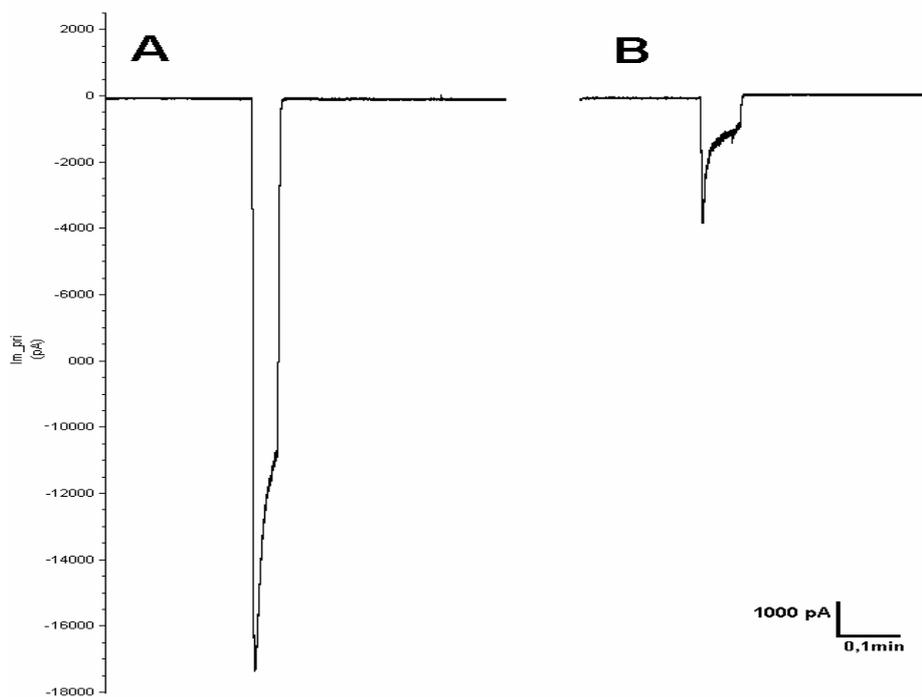


Figura 23. Ensaio eletrofisiológico em *Whole-cell Patch Clamp*, mostrando as correntes de Sódio e Potássio em receptores de acetilcolina tipo nicotínicos. A - Ensaio de estabilidade da preparação, estímulo com a aplicação de acetilcolina $10\mu\text{M}$ B - após aplicação por 1 minuto de $10\mu\text{M}$ de Beta-tubocurarina.

A figura 24 mostra que o F25 não atua nos receptores nicotínicos de acetilcolina.

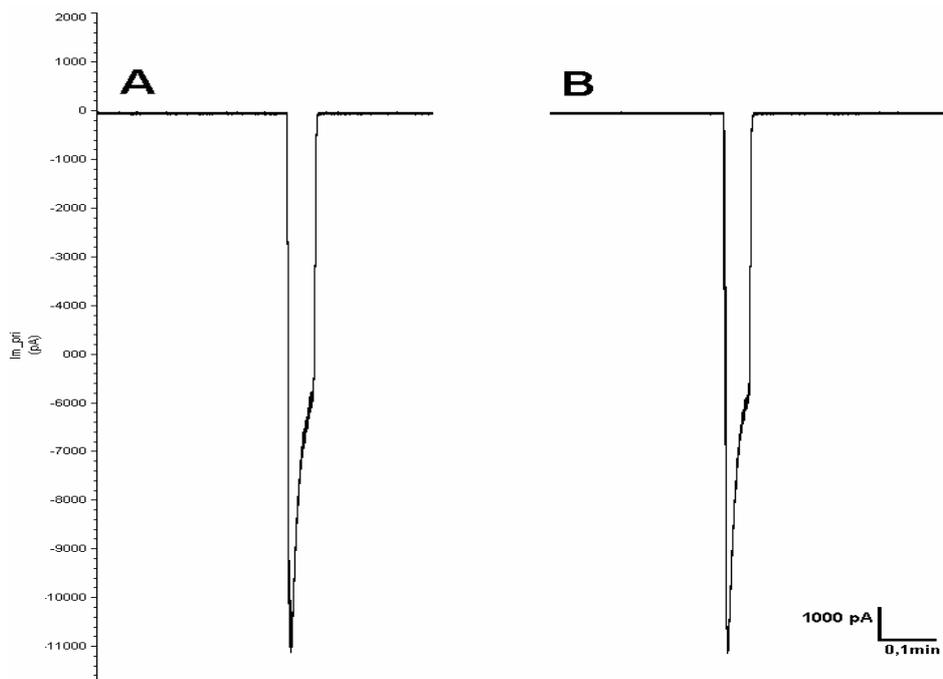


Figura 24. Ensaio eletrofisiológico em *Whole-cell Patch Clamp*, mostrando as correntes de Sódio e Potássio em receptores de acetilcolina do tipo nicotínicos. A - Ensaio de estabilidade da preparação, estímulo com a aplicação de acetilcolina 10 μM B - após aplicação por 1 minuto de 1 μM da fração 25.

O resultado da aplicação do F27.1 na preparação mostra que esse peptídeo não atua nos receptores nicotínicos de acetilcolina (figura 25).

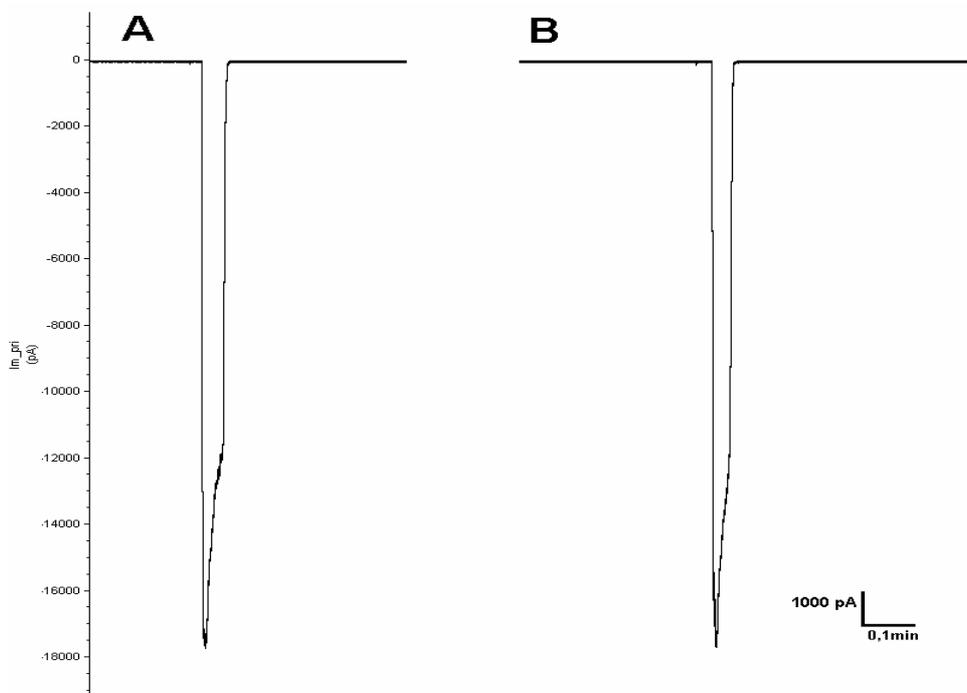


Figura 25. Ensaio eletrofisiológico em *Whole-cell Patch Clamp*, mostrando as correntes de Sódio e Potássio em receptores de acetilcolina tipo nicotínicos. A - Ensaio de estabilidade da preparação, estímulo com a aplicação de acetilcolina 10 μM B - após aplicação por 1 minuto de 1 μM da fração 27.1.

O F27.2 não alterou a corrente na célula, como mostra a figura 26.

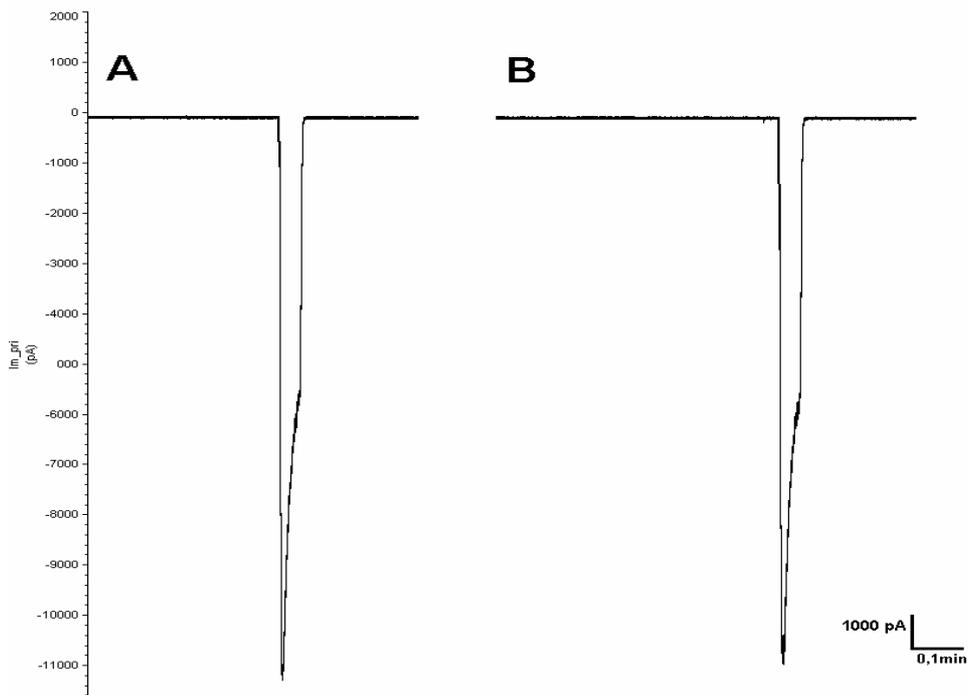


Figura 26. Ensaio eletrofisiológico em *Whole-cell Patch Clamp*, mostrando as correntes de Sódio e Potássio em receptores de acetilcolina tipo nicotínicos. A - Ensaio de estabilidade da preparação, estímulo com a aplicação de acetilcolina 10 μM B - após aplicação por 1 minuto de 1 μM da fração 27.2

O peptídeo F43.3 não mostrou atividade significativa no ensaio (figura 27).

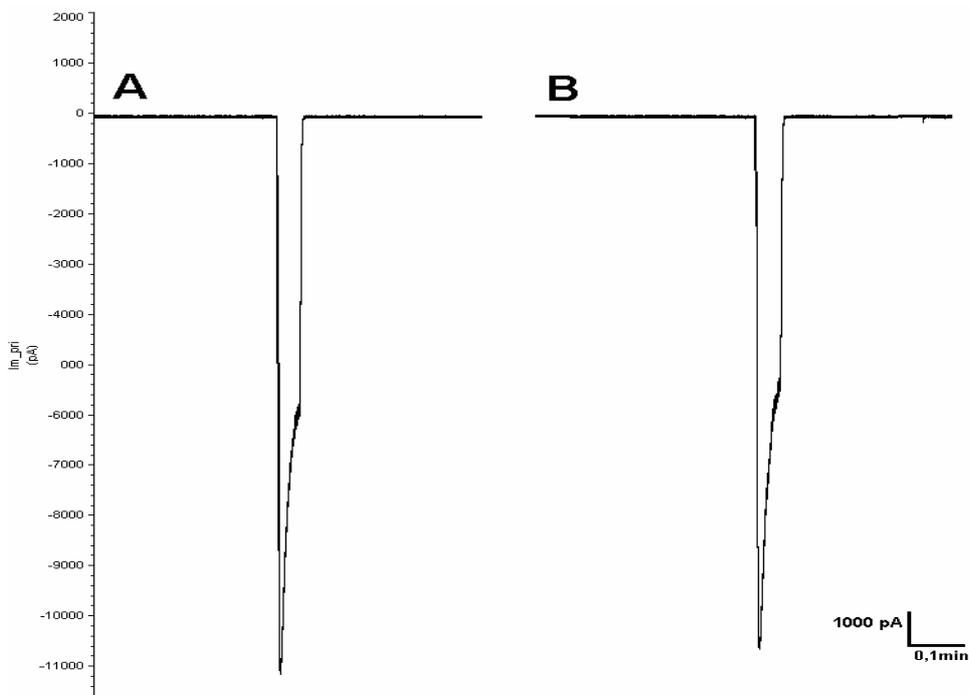


Figura 27. Ensaio eletrofisiológico em *Whole-cell Patch Clamp*, mostrando as correntes de Sódio e Potássio em receptores de acetilcolina tipo nicotínicos. A - Ensaio de estabilidade da preparação, estímulo com a aplicação de acetilcolina 10 μM B - após aplicação por 1 minuto de 1 μM do peptídeo F43-3.

5.5. Determinação da concentração inibitória mínima

O peptídeo F25, purificado da fração 25, foi testado em diluição seriada para a determinação do MIC em *E. coli*. A concentração inicial utilizada foi 64 μ M e não houve inibição do crescimento bacteriano.

O peptídeo F32, purificado da fração 32, foi testado na concentração inicial 32 μ M e não houve atividade inibitória do crescimento para *E. coli*, como indicava o ensaio qualitativo com a fração.

O peptídeo F43.3 foi purificado da fração 43 para a determinação do MIC. O ensaio foi realizado por meio de diluição seriada, tendo início com uma concentração de 128 μ M. O peptídeo F43.3 não inibiu completamente o crescimento bacteriano. Porém, em concentrações próximas de 1 μ M inibiu cerca de 50% o crescimento de *S. aureus*, contrastando com o fato que em concentrações maiores não houve inibição. Três componentes menos abundantes da fração 43 foram testados para *S. aureus*. O componente F43.1, na concentração 1 μ M, inibiu o crescimento em 40% e o componente F43.2, na mesma concentração, inibiu 60% do crescimento; o componente F43.3 não inibiu o crescimento da colônia.

Os demais peptídeos das frações que apresentaram atividade antimicrobiana não foram acumulados em quantidade ou pureza suficiente para a determinação do MIC.

5.6 Ensaio preliminares com Acilpoliaminas

O JL1 é um grupo de frações de caráter bastante hidrofílico e de difícil separação que eluem entre os 25 e 30 minutos da cromatografia. As análises dessas frações em sistema MALDI-TOF permitiram a identificação de 16 componentes de massa: 511 Da, 539,12 Da, 559,82 Da, 585,31 Da, 600,34 Da, 613,96 Da, 633,42 Da, 635,93 Da, 651,86 Da, 657,25 Da, 666,57 Da, 728,31 Da, 742,29 Da, 772,88 Da, 784 Da, 853,92 Da. Os componentes mais abundantes e freqüentes nos espectrogramas de massa foram o 600,34 e o 728,31. As fragmentações desses componentes estão mostradas nas figuras 28 e 29.

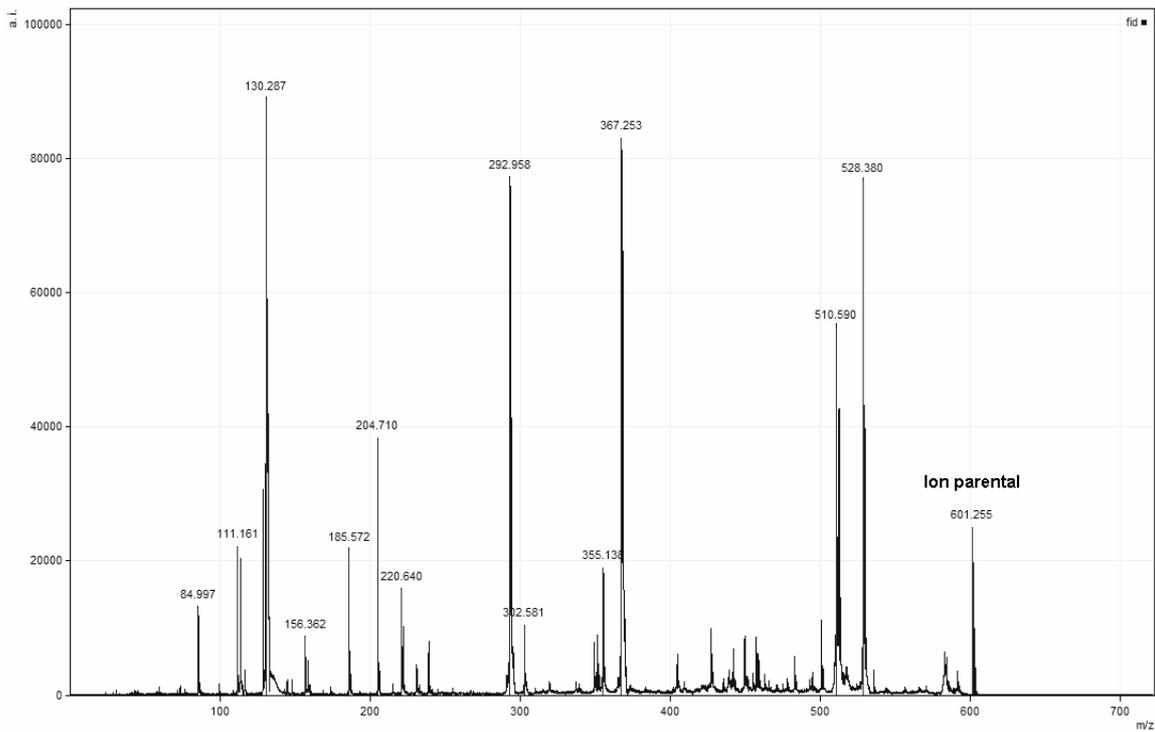


Figura 28. Espectrograma da fragmentação do componente de massa 600,34 Da em sistema MALDI-TOF, matriz α -ciano 4-hidroxi-cinâmico.

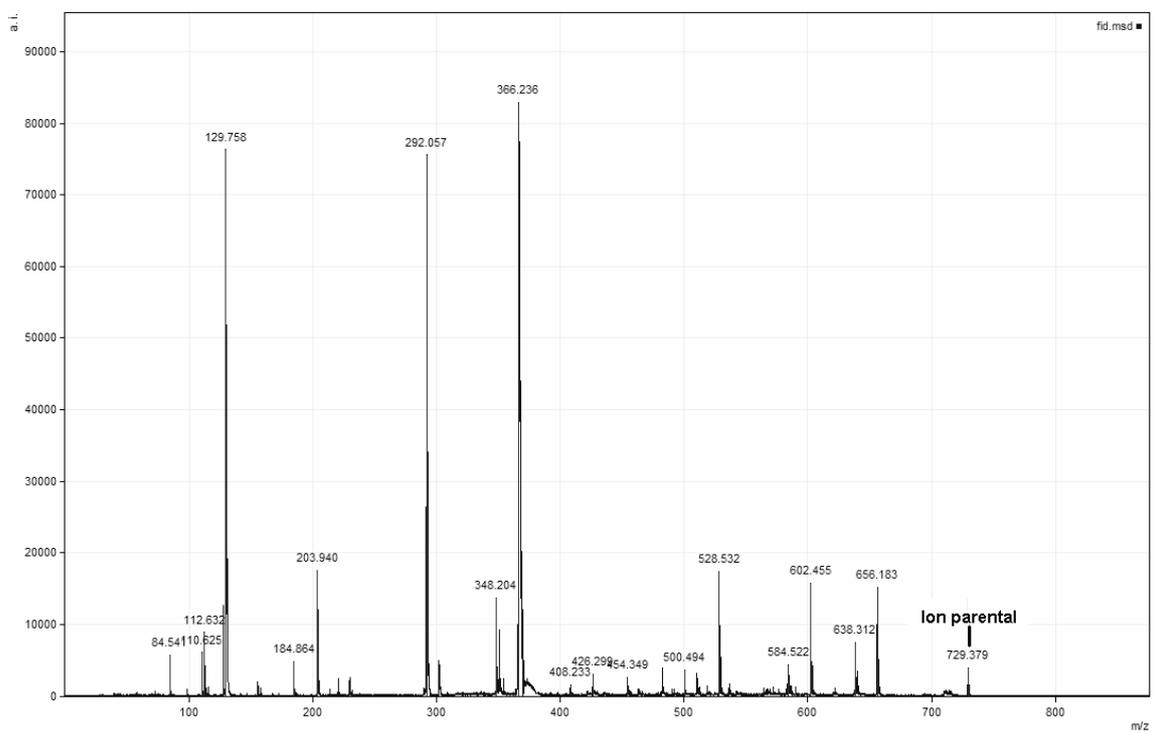


Figura 29. Espectrograma da fragmentação do componente de massa 728,31 Da em sistema MALDI-TOF, matriz α -ciano 4-hidroxi-cinâmico.

Foram realizados ensaios em fatia de coração de *L. catesbeianus* com a peçonha bruta e o grupo JL1. A peçonha bruta de *Lasiadora* sp., na concentração de 24 mg/mL, apresentou atividade cardiotoxica reduzindo drasticamente, de forma reversível, a amplitude da contração e a frequência do estímulo (atividades inotrópica e cronotrópica negativas) (Figura 30). O grupo JL1 causou um pequeno declínio reversível, cerca de 22%, na amplitude do estímulo e também uma diminuição reversível na frequência (Figura 31).

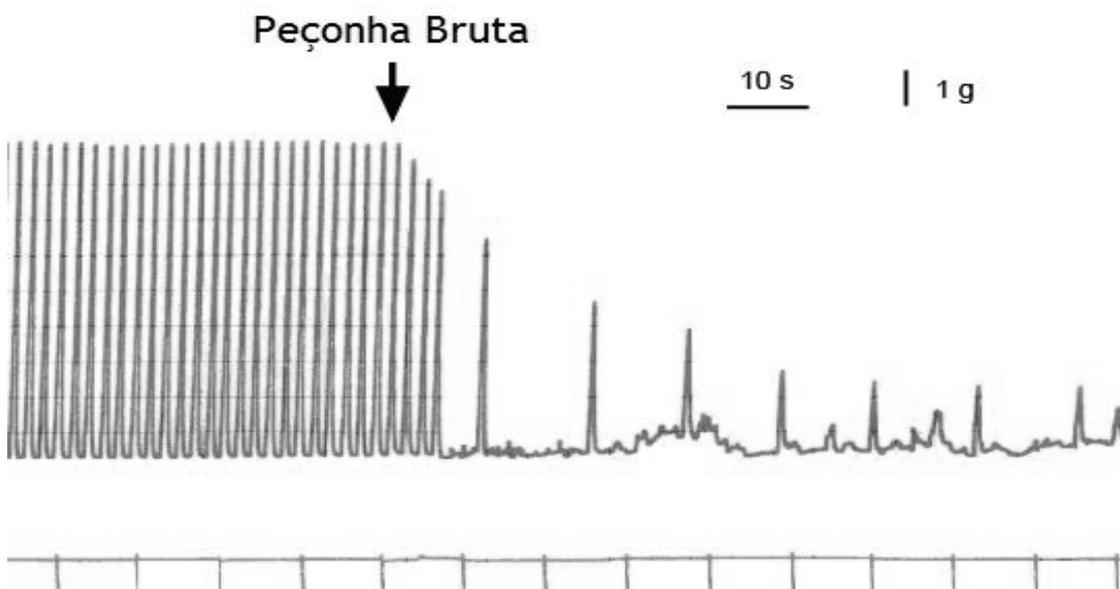


Figura 30. Miocardiograma da fatia isolada de *L. catesbeianus*, aplicação de peçonha bruta de *Lasiadora* sp. A barra horizontal representa um período de 10 segundos e a barra vertical representa uma força de contração equivalente a 1 grama.

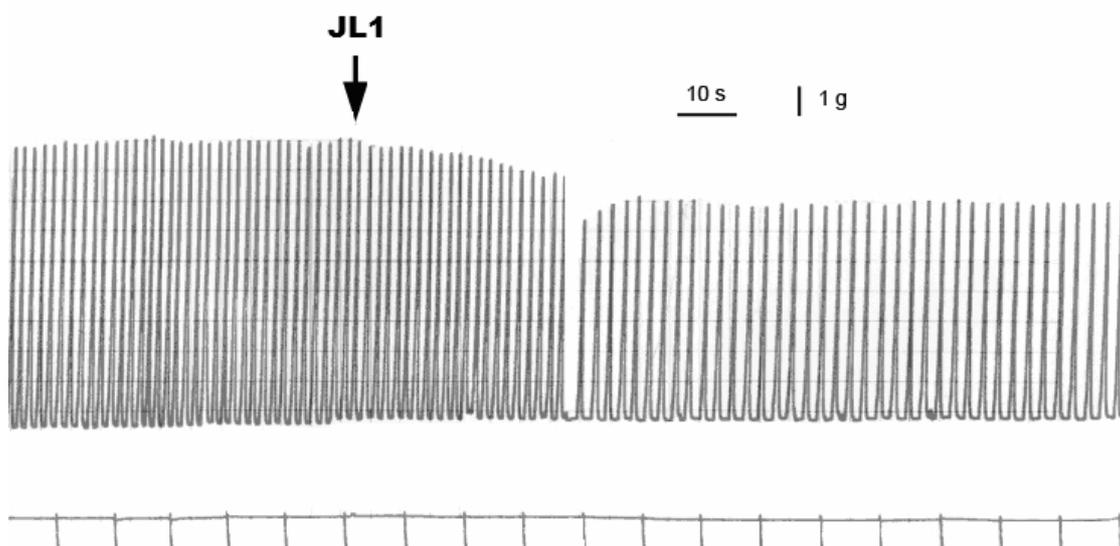


Figura 31. Miocardiograma da fatia isolada de *L. catesbeianus*, aplicação de JL1. A barra horizontal representa um período de 10 segundos e a barra vertical representa uma força de contração equivalente a 1 grama.

Ensaios antimicrobianos com o grupo JL1 revelaram sua atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Em uma concentração de 475 µg/mL o grupo JL1 inibiu aproximadamente 75% o crescimento de *S. aureus*. Para *E. coli* os testes mostraram uma inibição de 70% em uma concentração de 125 µg/mL.

O processo de isolamento e caracterização dos componentes responsáveis pelas atividades biológicas identificadas para o grupo JL1 ainda está em andamento. Já foram realizadas recromatografias com gradiente otimizado de água e metanol (Figura 32). A eficiência dessa metodologia para a obtenção de componentes purificados ainda não pôde ser comprovada, pois não foi realizada a espectrometria de massa para cada uma das frações obtidas na recromatografia.

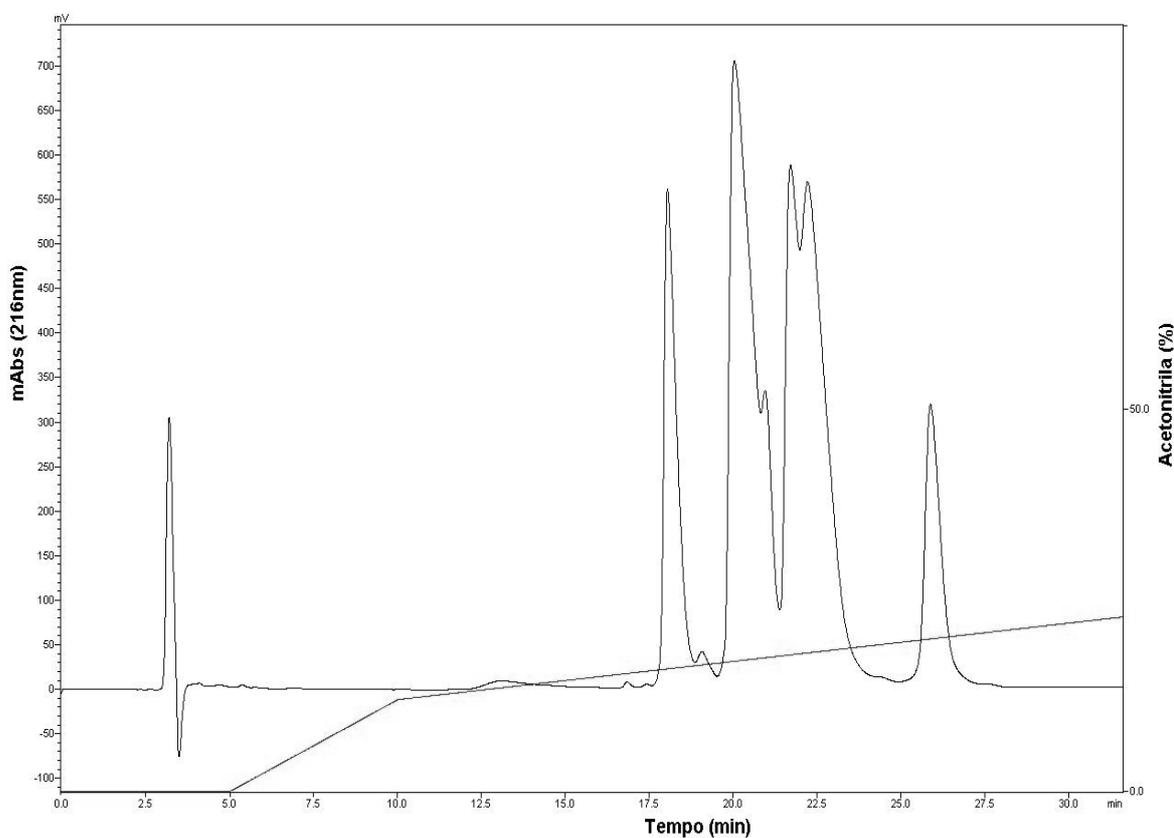


Figura 32. Recromatografia do grupo de frações JL1 sistema RP-HPLC, coluna analítica C18 Vydac 218TP54 (0,46 x 250 mm), gradiente de metanol otimizado.

6. Discussão

6.1. Purificação e caracterização dos componentes da peçonha

As cromatografias da peçonha bruta de *Lasiadora* sp. foram inicialmente realizadas separadamente por indivíduo extraído. A fim de obter uma melhor reprodutibilidade das cromatografias e uma vez que o foco desse trabalho não são as variações individuais na peçonha, resolveu-se fazer um “pool” de peçonha, minimizando as variações individuais já relatadas por Escoubas et al. (2002) e Guete et al. (2006). De maneira geral obteve-se uma boa separação dos componentes por RP-HPLC a exceção do JL1, um grupo de frações pouco hidrofóbicas que coeluiu entre 25 e 35 minutos.

Todos os componentes observados nos espectrogramas de massa da peçonha bruta foram encontrados nos espectrogramas de massa das frações cromatográficas eluídas. Todavia alguns componentes identificados nas frações cromatográficas não foram observados nos espectrogramas da peçonha bruta, indicando uma possível supressão do sinal de alguns íons devido a não dessalinização da peçonha bruta antes das análises. Porém, esse resultado também pode ser uma sugestão de pouca abundância de alguns componentes na peçonha bruta.

A peçonha de *Lasiadora* sp. apresenta diferenças nos componentes de massas entre os espectrogramas quando é analisada em diferentes matrizes, ácido sinapínico e α -ciano 4-hidroxi-cinâmico, o mesmo é relatado por Guete et al. (2006). Em *Lasiadora parahybana* identificou-se seis componentes na faixa entre 10.000 e 100.000 Da, que são considerados isoformas proteínicas não identificados no trabalho. O autor relata que este fato está relacionado com o uso de ácido sinapínico como matriz. Todavia, em *Lasiadora* sp., não foi possível identificar sinal satisfatório para esta faixa de massa, mesmo utilizando a mesma matriz.

Evidenciamos também diferenças significativas entre espectrogramas de massa da mesma fração cromatográfica quando considerado o modo de vôo da amostra ionizada, linear ou refletido, mesmo utilizando a mesma matriz. Esse fato é muito bem ilustrado pelos espectrogramas de massa da peçonha bruta (Figura 6 e Figura 7). Constatou-se que a maioria das massas, principalmente componentes >1.500 Da, só foram observadas em modo linear. Este módulo de análise trabalha com média de

massa, não sendo possível a caracterização do componente com massa monoisotópica, o que pode causar erros de aproximação da massa exata.

Em modo refletido, a maioria das massas observadas para *Lasiadora* sp. encontram-se abaixo de 1.000 Da. Destacamos dois componentes a 600 e a 728Da. Sugerimos que esses dois componentes de massa são acilpoliaminas. Skinner et al. (1990) caracteriza parcialmente duas acilpoliaminas da aranha caranguejeira *Aphonopelma chalcodes*, APC600 e APC728, neste trabalho os autores demonstram a massa molecular dos compostos 600 e 728 Da, a presença de espermina, 1,3-diaminopropano e a ausência de aminoácidos em suas estruturas. Acreditamos que os compostos observados em modo refletido sejam os mesmo relatados por Skinner et al., 1996.

Guete et al. (2006) realizou o estudo descritivo dos componentes de massa da peçonha bruta de *Lasiadora parahybana*. Devido à similaridade da natureza do trabalho e a proximidade filogenética dos organismos estudados, fizemos uma análise comparativa dos dados obtidos para *Lasiadora* sp.

O número de componentes de massa identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF é significativamente maior que o encontrado por Guete et al. (2006), quando observado a mesma metodologia. Em similaridade, sugerimos a presença de 20 componentes peptídicos comuns aos dois venenos. E como diferença, destacamos a faixa de massa entre 2000 e 3000 Da, na qual não foi caracterizado nenhum peptídeo para *Lasiadora parahybana* e 13 para *Lasiadora* sp.

O componente de 7.933Da, presente na fração 49 de *Lasiadora* sp., foi encontrado em *L. parahybana*, diferindo seu valor de massa apenas na segunda casa decimal, outros 19 componentes 1640,35; 3739,29; 3920,20; 3936,75; 4691,93; 4749,32; 4777,11; 4781,40; 4847,34; 4869,67; 4940,57; 5442,57; 5542,71; 5645,96; 5679,56; 5725,11; 6559,10; 6813,07; 7842,87 e 7933,86 apresentam uma diferença menor que 10 Da de massas identificadas por Guete et al. (2006).

A massa referente à LTx5 não foi identificada nem nos espectrogramas de massa da peçonha bruta e nem nas frações cromatográficas. Lembramos que essa toxina foi predita por cDNA da glândula de peçonha de *Lasiadora* sp., esse fato aponta a

possibilidade de existirem modificações pós-transcricionais ou pós-traducionais nesse peptídeo.

Compilando todos os espectrogramas de massa gerados em modo refletido e linear, utilizando-se matriz α -ciano 4-hidroxi-cinâmico e ácido sinapínico a figura 8 mostra uma prevalência de compostos com baixa massa molecular <1.000Da. E assim como para *L. parahybana*, para *Lasiodora* sp. os componentes de baixa massa molecular foram identificados em sua maioria nas frações que eluíram antes dos 25% de acetonitrila no gradiente.

Os componentes da matriz existentes nos espectrogramas de massa por sistema MALDI-TOF dificultam a identificação de componentes de baixo peso molecular (<1000 Da). Em nosso trabalho conseguimos, mesmo com alguma dificuldade, identificar componentes de massa entre 500 e 1000 Da. Haja vista que existem componentes menores que 500 Da na peçonha de aranhas, é necessário o uso de outras técnicas de espectrometria de massas ou o uso de diferentes matrizes, como ácido 2,5 Dihidrobenzóico (DHB), para o estudo detalhado dos componentes de baixo peso molecular (Lambert et al., 1998).

6.2. Fragmentação e Sequenciamento

A análise de similaridade entre peptídeos é importante, pois pode orientar estratégias para definir suas possíveis atividades biológicas. A sequência parcial do peptídeo F25 não apresentou similaridade nenhuma toxina descrita depositada em bancos de dados. Porém, foi possível identificar nesse peptídeo uma característica comumente presente nos peptídeos antimicrobianos e citolíticos: a presença de um resíduo hidrofóbico em pelo menos um dos três primeiros resíduos de aminoácidos da extremidade N-terminal (Villegas & Corzo, 2005). Esta característica pode ser determinante para a atividade do peptídeo nas células, visto que a formação do poro tem início pela inserção do seu domínio N-terminal na membrana (Villegas & Corzo, 2005).

A toxina F27.1 apresentou 100% de similaridade com a toxina LTx4 (Figura 16). A LTx4 foi predita por banco de cDNA de *Lasiodora* sp. e sua atividade farmacológica é sugerida por similaridade como toxina inseticida, por possuir grande similaridade com toxinas da família Magi-1. A família Magi-1 possui peptídeos com ação neurotóxica em

insetos e mamíferos, bloqueando canais de sódio voltagem dependentes. São toxinas dessa família a Bs1, isolada de *Brachypelma smithi*, a Magi 1, Magi 2 e Peptide toxin 6 isoladas de *Macrothele gigas* (Corzo et al., 2008; Corzo et al., 2003).

O peptídeo F27.2 apresenta similaridade de 100% com as LTx1, LTx2 e LTx3, predita por banco de cDNA de *Lasiadora* sp. e com a LpTX1 isolada de *Lasiadora parahybana* (Figura 17) (Vieira et al. 2004; Escoubas et al. 1996). Os peptídeos LTx1-3 pertencem à família das huwentoxin-2, e por similaridade têm a sua atividade atribuída ao bloqueio de receptores nicóticos de Acetilcolina; porém Dutra et al. (2008) expressaram a LTx2 em *E. coli* e os ensaios farmacológicos mostraram a atividade dessa molécula em canais de Ca^{+2} do tipo-L. A LTx2 também possui atividade antibacteriana na concentração de 400mg/mL contra *E. coli*, *Salmonella Agona* e *S. aureus* (Dutra, 2006).

O peptídeo F43.3 apresentou similaridade significativa com a LTx5, predita por cDNA de *Lasiadora* sp. (Figura 18). Não há nenhuma atividade farmacológica proposta para a LTx5.

6.3. Ensaios farmacológicos

A inibição do crescimento bacteriano pela peçonha bruta fundamenta a busca dos componentes responsáveis por essa atividade farmacológica. Mesmo sendo um ensaio preliminar e sem a possibilidade de determinação da molaridade responsável pela inibição do crescimento, esse passo é essencial para direcionar os ensaios seguintes. Em ensaios qualitativos, Liu et al. (2009), indicam que a peçonha bruta de *Lycosa singoriensis* inibiu fortemente o crescimento de bactérias Gram-positivas.

Em *Lasiadora* sp. identificamos que a maior inibição do crescimento bacteriano não ocorreu nas maiores concentrações testadas, como esperado. Houve uma maior inibição nas diluições intermediárias (Figura 10). Esse resultado pode ser associado a grande quantidade de moléculas existentes na peçonha bruta, dessa forma, é possível que as toxinas tenham mais interações entre si do que com a membrana das bactérias.

A escolha das frações para os testes antimicrobianos baseou-se nos trabalhos sobre peptídeos antimicrobianos já existentes, que mostram a eluição desses componentes (RP-HPLC) em uma concentração de acetonitrila maior que 20%. Esse fato

relaciona-se a uma das características dos peptídeos antimicrobianos, que são geralmente anfipáticos (Zasloff, 2002).

As paredes celulares de procariotos são barreiras a serem vencidas pelos peptídeos antimicrobianos para terem acesso a superfície negativamente carregada da membrana plasmática (Bechinger, 1999). Acredita-se que os resultados diferentes nos ensaios antimicrobianos para *S. aureus* e *E. coli*, tanto com a peçonha bruta quanto com as frações, esteja relacionado às diferenças na composição da parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas, respectivamente. A diferença na composição da membrana celular de procariotos e eucariotos é outro fator determinante para a atividade dos peptídeos antimicrobianos (Bechinger, 1999). Devido a alta densidade de cargas negativas, a membrana de bactérias é muito mais suscetível a interação com os peptídeos antimicrobianos, que são catiônicos (Yeman & Yount, 2003). A ausência de atividade hemolítica, mesmo para aquelas frações que apresentaram atividade antimicrobiana, pode estar relacionada com as diferenças entre as membranas celulares de eucariotos e procariotos (Bechinger, 1999; Yeman & Yount, 2003).

A fração 27 não apresentou atividade antibacteriana e hemolítica no ensaio qualitativo realizado com as frações. O peptídeo F27.2 apresentou similaridade com a LTx2, que possui atividade antimicrobiana. O primeiro fator que deve ser considerado para a comparação dos resultados é que as metodologias utilizadas foram diferentes, a LTx2 foi testada em meio sólido por meio da análise do halo de inibição do crescimento e a fração 27 foi testada em meio líquido em placa multipoços. A similaridade não determina que as duas toxinas sejam iguais, portanto, essa é uma possibilidade para a diferença de resultados antimicrobianos encontrados. Outra possibilidade é a diferença de concentração dos peptídeos testados. A LTx2 provocou inibição do crescimento bacteriano em uma concentração bastante alta (400mg/mL), seguramente uma concentração bem maior do que a testada para a fração 27 e conseqüentemente para o peptídeo F27.2.

Os peptídeos F25 e F32 foram testados para a determinação do MIC nas concentrações iniciais de 64 μ M e 32 μ M, respectivamente. Os ensaios não apresentaram resultados positivos. Como as recromatografias dessas frações não evidenciam frações cromatográficas representativas de outros componentes, sugerimos que as concentrações que determinam a inibição do crescimento bacteriano sejam maiores

que aquelas testadas. Para testar essa hipótese é necessário o acúmulo de mais material, fato que não foi possível até o final desta dissertação.

A fração 43, que apresentou inibição para o crescimento de *S. aureus*, tem como componente principal o peptídeo F43.3. Mesmo a sequência parcial do peptídeo não sendo similar a nenhuma sequência de peptídeos antimicrobianos, acreditou-se que este componente seria responsável pela atividade antibacteriana apresentada pela fração. Não foi possível determinar o MIC do peptídeo, que apresentou comportamento similar ao observado para a peçonha bruta. Nas concentrações de 64 μ M até 4 μ M da diluição seriada, não houve inibição do crescimento de *S. aureus*, enquanto que nas baixas concentrações de 2 μ M, 1 μ M e 0,5 μ M houve aproximadamente 50% de inibição do crescimento bacteriano.

A interação entre os peptídeos pode influenciar na atividade antimicrobiana. As cargas positivas necessárias para que os peptídeos interajam com a membrana negativamente carregada das bactérias também provoca a repulsão entre os mesmos, esse fato dificulta a sua associação para formar o poro na bicamada lipídica (Bechinger, 1999). Esse fato é parcialmente demonstrado pela modificação da magainina 2. A síntese de análogos com mais cargas positivas, MG+2, MG+4 e MG+6, permitiu identificar que o acréscimo de cargas aumenta a atração da membrana sob os peptídeos, porém dificulta a formação do poro ou diminui o seu tempo de vida quando formado, sendo que com o aumento de cargas positivas aumenta a instabilidade devido à repulsão. Matsuzaki et al. (1997) concluíram nesse experimento que a densidade de cargas influencia o tempo de vida do poro. Se a sequência ainda desconhecida do peptídeo F43.3, que possui alta massa molecular (7675, 69 Da), resultar em um alto PI para esta molécula é possível que em altas concentrações ocorra uma dificuldade de associação desse peptídeo para a formação do poro na bicamada lipídica bacteriana.

A hipótese alternativa para a não determinação do MIC do peptídeo F43.3 de que os outros componentes, menos abundantes que aparecem na recromatografia, sejam os responsáveis pela atividade farmacológica foi testada. Os peptídeos F43.1, F43.2 e F43.4 foram testados em diluição seriada, porém a concentração inicial foi de 1 μ M devido a pouca abundância desses componentes. Houve uma inibição de 40% e 63% para F43.1 e F43.2, respectivamente, em sua maior concentração de 1 μ M. O peptídeo F43.4 não apresentou atividade inibitória. Os MICs identificados para peptídeos de aranha são bastante variáveis por exemplo, a oxioipinina 1 (5221,2 Da) , isolada de

Oxyopes kitabensis, possui MIC de $0,18 \pm 0,45 \mu\text{M}$ para *Bacillus subtilis* e a GsMTx-4 (4093,9 Da), isolada de *Grammostola spatulata*, possui MIC de $32-64 \mu\text{M}$ para *Salmonella typhimurium*. Não foi possível identificar se em concentrações molares maiores o F43.1 e F43.2 apresentam inibição de 100% do crescimento bacteriano devido a falta de material para realizar o ensaio. Os peptídeos F43.1 e F43.2 apresentam massa molecular 7607,18 Da e 7653,91 Da, respectivamente, indicando que a fração 43 é formada por três componentes de massas moleculares muito parecidas porém com hidrofobicidades diferentes. Considerando que os espectrogramas de massa foram gerados em sistema MALDI-TOF modo linear, que implica em uma perda de resolução, não é possível afirmar se esses peptídeos são isoformas. Na espécie *Bombus pascuorum*, uma abelha, foram identificados e caracterizados três peptídeos antimicrobianos a *Apis* defensina (5518,3 Da), e a Roialisina (5526,3 Da) e a *Bombus* defensina (5529,5 Da) que apresentam estruturas primárias muito parecidas, com cisteínas em posições conservadas, diferenças em apenas alguns aminoácidos da sequência e amidação C-terminal em duas delas (Rees, et al., 1997; Fujiwara et al., 1994; Fujiwara et al., 1990). Para elucidar os questionamentos sobre os peptídeos da fração F43 é necessário realizar experimentos para identificar as sequências completas e possíveis modificações pós-traducionais nesses componentes.

A análise de similaridade das sequências parciais dos peptídeos isolados direcionaram os ensaios eletrofisiológicos dos peptídeos F27.1, F27.2 para efeitos em canais de Na^+ voltagem dependentes e receptores nicotínicos de acetilcolina, respectivamente. Todavia como não foi encontrado nenhuma sugestão de ação farmacológica para os peptídeos F25 e F43.3 esses foram testados em ambos ensaios.

Os ensaios eletrofisiológicos não apresentaram atividade dos peptídeos isolados para canais de Na^+ voltagem dependentes e receptores Nicotínicos de acetilcolina para as concentrações testadas.

Com relação a esses resultados divergentes dos esperados destaca-se alguns aspectos importantes. Existem divergências ao comparar as massas observadas em sistema de MALDI-TOF com as calculadas para as sequências similares preditas por cDNA de *Lasiodora* sp. Por exemplo, para o peptídeo F27.1 obteve-se 4765,48 Da de massa molecular, todavia a toxina LTx4, que apresenta 100% de similaridade com sequência parcial, tem 4922,1 Da de massa molecular. Apesar de a sequência parcial sugerir uma similaridade entre estas toxinas, é possível que a parte não sequenciada tenha

diferenças significativas na sua composição de aminoácidos. Ou ainda, como mencionado anteriormente, é possível a existência de modificações pós-traducionais que podem afetar consideravelmente a ação dos peptídeos.

As concentrações testadas são inferiores as que podem promover uma alteração na atividade do canal. Bosmans et al., (2005) demonstra que as toxinas CcoTx1 e CcoTx2 isoladas de *Ceratogyrus cornuatus* promovem o bloqueio de canais do tipo Nav 1.1 e 1.2 com aproximadamente 2 μ M. Clemente et al., (2007) somente consegue um bloqueio parcial em canais Nav com 20 μ M de GrTX1 isolado de *Grammostola rosea*. Li et al., 2003 promove um bloqueio de 50% de canais tipo Nav 1.2 com 68 μ M de HnTx-1 isolado de *Selenocosmia hainana*. Diferentemente das toxinas bloqueadoras de canais para sódio voltagem dependentes de escorpiões, aparentemente essas toxinas em aranhas possuem uma baixa afinidade por esses canais, necessitando assim de altas concentrações para a atuação. Nossos ensaios de *Patch clamp* foram realizados no Instituto de Biotecnologia da Universidade Autônoma do México, Campus Cuernavaca - Morelos, onde a rotina de estudos são basicamente as toxinas de escorpiões. A concentração de 1 μ M é a concentração padrão para os ensaios de novas toxinas. Possivelmente a ausência de atividade indicada nos ensaios farmacológicos deve-se ao fato do uso de concentrações inferiores a concentração efetiva do peptídeo.

6.4. Ensaios preliminares com Acilpoliaminas

Todos os componentes de massa identificados no grupo JL1 apresentam massa molecular menor que 1000 Da. Escoubas et al. (2006) sugere que estes componentes de baixo peso molecular e de caráter hidrofílico são acilpoliaminas.

Skinner et al. (1996) identificou em *Aphonopelma chalcodes* as acilpoliaminas APC600 e APC728 e fez suas caracterizações parciais. Identificou-se que essas moléculas não apresentam aminoácidos em sua estrutura. McCormick & Meinwald (1993) sugerem uma estrutura para essas duas acilpoliaminas, porém sua estrutura ainda não foi totalmente elucidada (Figura 33). O padrão de fragmentação dos componentes 600,34 Da e 728,31 Da não correspondem ao padrão de fragmentação de peptídeos. Acreditamos que os componentes de massa molecular encontrados no grupo de frações JL1 e outras frações de *Lasiodora* sp. sejam as acilpoliaminas APC600 e APC728.

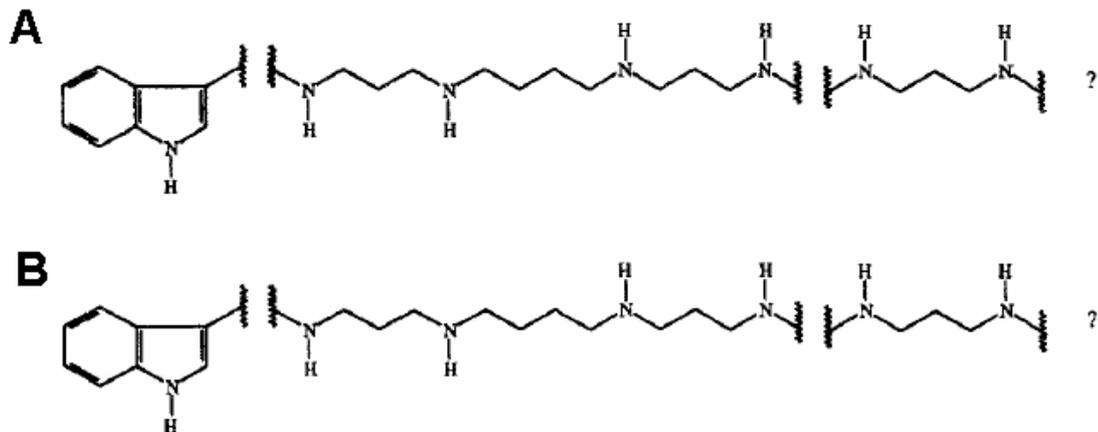


Figura 33. Estrutura proposta e parcialmente elucidada para as acilpoliaminas APC600 (A) e APC728 (B). Adaptado de McCormick & Meinwald (1993).

Kalaphotakis et al. (2003) realizaram ensaio com a peçonha bruta de *Lasiodora* sp. em coração isolado de rato. Os resultados mostram bradicardia dose-dependente e reversível, com paradas transitórias e distúrbios no ritmo cardíaco. O eletrocardiograma mostra uma bradicardia sinusal. Para elucidar o modo de ação da peçonha, o grupo fez vários testes complementares. Mostrou-se então que o efeito do veneno foi potencializado pela neostigmina, uma anti-colinesterase, reprimido pela atropina, um antagonista dos receptores muscarínicos de acetilcolina, e inibida pelo vesamicol, um inibidor do transporte vesicular de acetilcolina. A tetrodotoxina não inibiu o efeito do veneno. Diante dos resultados, os autores propõem que a peçonha bruta de *Lasiodora* sp. promove a ativação de canais voltagem-dependente para Na^+ resistentes a TTX nas terminações nervosas parassimpáticas, resultando na liberação de acetilcolina, um neurotransmissor que possui efeito inibitório no coração. Em nossos ensaios com fatia de coração de *L. catesbeianus*, identificamos a atividade inotrópica e cronotrópica negativas quando aplicamos a peçonha bruta. Apesar de mais discreto, resultado similar foi identificado quando aplicamos o grupo JL1. Estes resultados indicam que o grupo JL1 pode ser o responsável pela atividade cardiotoxica identificada em nossos ensaios e por Kalaphotakis et al. (2003). As acilpoliaminas são conhecidas por atuarem em receptores de glutamato, que não estão presentes no coração. Portanto a investigação dessa atividade sugerida pode revelar um novo alvo e mecanismo de ação para as acilpoliaminas.

Uma acilpoliamina com atividade antimicrobiana, denominada migalina, foi identificada em hemócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana* (Pereira et al., 2007). Essa molécula possui 417 Da teve sua estrutura elucidada utilizando-se técnicas de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (RMN) e ultravioleta (UV). A

Migalina foi identificada como bis-acilpoliamina N1, N8-bis (2,5-dihidroxibenzoil) espermidina (figura 34) (Pereira et al., 2007).

A Migalina não apresentou atividade contra *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*, porém, foi efetiva contra *E. coli* (MIC = 85 µM). Sua atividade foi completamente inibida pela catalase. Sugerindo, que a inibição do crescimento bacteriano deve-se a produção de peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) (Pereira et al., 2007).

Destacamos a forte inibição do crescimento identificada em nossos ensaios com o grupo JL1. A prospecção de acilpoliaminas com atividade antimicrobiana é de grande valia diante do cenário atual, onde muitos microrganismos possuem mecanismos de resistência aos antibióticos comerciais. Um aspecto relevante sobre acilpoliaminas é que a sua baixa massa molecular facilita sua produção em grande escala, diferentemente dos peptídeos antimicrobianos.

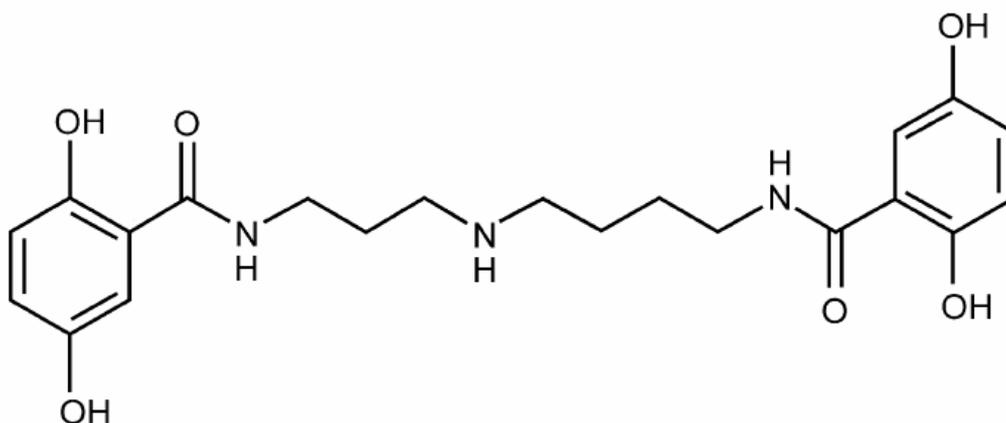


Figura 34. Estrutura da migalina, N1, N8-bis (2,5-dihidroxibenzoil) espermidina. Adaptado de Pereira et al. (2007).

É fundamental a separação, identificação e caracterização completa de cada um dos componentes do grupo JL1. Esse passo é determinante para a determinação de quais moléculas são responsáveis pelas atividades farmacológicas apresentadas e o seu modo de ação. Mesmo sem realizar a espectrometria de massas para cada uma das frações eluídas durante a recromatografia do grupo JL1, acreditamos que a separação dos compostos não foi eficiente. Sendo, portanto, necessário o uso de outras técnicas de separação. Sugere-se o uso de cromatografia com coluna de troca iônica e outras colunas com fases estacionárias mais polares que uma C18.

7. Conclusões

- Este estudo amplia os conhecimentos sobre a peçonha de *Lasiadora* sp.
- A peçonha de *Lasiadora* sp. apresenta uma diversidade muito grande de toxinas, compreendendo aproximadamente 200 componentes de massa molecular, com predominância dos componentes menores que 1000 Da e entre 4000 e 8500 Da.
- As peçonhas de espécies do gênero *Lasiadora* apresentam alguns compostos idênticos e outros com massas moleculares muito próximas.
- A peçonha bruta de *Lasiadora* sp. possui atividade antimicrobiana significativa. Oito das frações testadas e o grupo JL1 também inibem o crescimento de bactérias.
- As sugestões de atividade indicadas por similaridade entre toxinas devem ser testadas com os componentes isolados da peçonha para fins de comprovação. Cinco toxinas peptídicas foram purificadas e tiveram suas sequências parciais determinadas, nenhuma delas apresentou a atividade eletrofisiológica sugerida por similaridade com outras toxinas depositadas em banco de dados.
- Os componentes de baixa massa molecular contribuem para os efeitos cardiotoxicos identificados para a peçonha de *Lasiadora* sp. e devem ser estudados com mais detalhes pois sugere-se uma nova forma de atuação.

8. Referências

- ADAMS, M. E., HEROLD, E. E., VENEMA, V.J. (1989). Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. *Journal of a Comparative Physiology*, **164** (3):333-42.
- BEMPORAD, D., SANDS, Z. A., WEE, C. L., GROTTESI, A., SANSOM, M. S. P., (2006). Vstx1, a Modifier of Kv Channel Gating, Localizes to the Interfacial Region of Lipid Bilayers. *Biochemistry*, **45** (39): 11844-11855.
- BODE, F., SACHST, F. (2001). Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature*, **406**: 35.
- 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.
- BOURINET, E., ZAMPONI, G. W. (2005). Voltage Gated Calcium Channels as Targets for Analgesics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **5**: 539-546.
- BRAZIL, V., VELLARD, J. (1925). Contribuição ao estudo do veneno de aranhas. *Memórias do Instituto Butantan*, **2**: 1-70. In: LUCAS, S. M., DA SILVA JR., P.I., BERTANI, R., COSTA CARDOSO, J. L. (1994). Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of São Paulo, Brazil. *Toxicon*, **32** (10): 1211-1215.
- BROWN, M. R., SHEUMACK, D. D., TYLER, M. I., HOWDEN, M. E., (1988). Aminoacid sequence of versutoxin, a lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax versutus*, *Biochemical Journal*, **250**:401-405.
- 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., LOHNER, K., (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**:1529-1539.
- BUDNIK, B. A., OLSEN, J. V., EGOROV, T. A., ANISIMOVA, V. E., GALKINA, T. G., MUSOLYAMOV, A. K., GRISHIN, E. V. ZUBAREV, R. A. (2004). *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.
- 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.
- CASTEELS-JOSSON, K., ZHANG, W., CAPACI, T., CASTEELSL, P., TEMPS, P. (1994). Acute Transcriptional Response of the Honeybee Peptide-Antibiotics Gene Repertoire and Required Post-translational Conversion of the Precursor Structure. *The journal of biological chemistry*, **269 (46)**: 28569-28575.
- CASTRO I. M., VIEIRA A. L. G., KALAPOTHAKIS, E. (2007). Screening of a *Lasiadora* sp. expression library and molecular cloning of *Lasiadora* sp. toxins in expression vectors. Submitted (JAN-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- CASTRO, M. S., MATSUSHITA, R. H., SEBBEN, 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.
- 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.
- CHOI, S., PARENT, R., GUILLAUME, C., DEREGNAUCOURT, C., DELARBRE, C., OJCIUS, D. M., MONTAGNE, J., CÉLÉRIER, M., PHELIPOT, a., AMICHE, M., MOLGO, J., CAMADRO, J., GUETTE, C. (2004). Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula *Psalmopoeus cambridgei*. *Federation of European Biochemical Societies - FEBS Letters*, **572**: 109-117.
- CLEMENT, H., ODELL, G., ZAMUDIO, F. Z., REDAELLI, E., WANKE, E., ALAGÓN, A., POSSANI, L. D. (2007). Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the spider *Grammostola rosea* that blocks sodium channels. *Toxicon*, **50 (1)**: 65-74.
- CORZO, G., VILLEGAS, E., GÓMEZ-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. *Journal of Biological Chemistry*, **277 (26): 23627-23637**.
- CORZO, G., GILLES, G., SATAKE, H., VILLEGAS, E., DAI, L., NAKAJIMA, T., HAUPT, J. (2003). Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. *Federation of European Biochemical Societies - FEBS Letters*, **547: 43-50**.
- CORZO, G., DIEGO-GARCÍA, E., CLEMENT, H., PEIGNEUR, S., ODELL, G., TYTGAT, J., POSSANI, L. D., ALAGÓN, A. (2008). An insecticidal peptide from the therapsid *Brachypelma smithi* spider venom reveals common molecular features among spider species from different genera. *Peptides*, **29 (11): 1901-1908**.
- DIOCHOT, S., DRICI, M., MOINIER, D., FINK, M., LAZDUNSKI, M. (1999). Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of I_{to1} in cardiac electrogenesis. *British Journal of Pharmacology*, **126: 251-263**.
- DE DEUS, A. D. T. Caracterização do veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. Mestrado em Ciências Biológicas: Farmacol. Bioq. Molecular - Universidade Federal de Minas Gerais.
- DIOCHOT, S. (2005). Precious natural peptides from spider venoms: new tools for studying potassium channels. *Toxin Reviews*, **24: 291-314**.
- DUTRA, A. 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 da Universidade Federal de Ouro Preto.
- DUTRA, A. A. A., SOUSA, L. O. , RESENDE, R. R., BRANDÃO, R. L., KALAPOTHAKI, E., CASTRO, I. M. (2008). Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiodora* sp. effecting on calcium channels. *Peptides*, **29: 1505 - 1513**.
- EBBINGHAUS, J., LEGROS, C., NOLTING, A., GUETTE, C., CELERIER, M. J., PONGS, O., BÄHRING, R. (2004). Modulation of Kv4.2 channels by a peptide isolated from the venom of the giant bird-eating tarantula *Theraphosa leblondi*. *Toxicon*, **43 (8): 923-932**.
- ECKERT, R., RANDALL, D., AUGUSTINE, G. (2002). *Animal physiology*, 5^aed. New York.

- ESCOUBAS P., CELERIER M.-L., ROMI-LEBRUN R., NAKAJIMA T. (1996). Two novel peptide neurotoxins from the venom of the tarantula *Lasiodora parahybana*. *Toxicon*, **35**:805-806.
- ESCOUBAS, P., CÉLÉRIER, M. L., NAKAJIMA, T. (1997). High-performance Liquid Chromatography Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry Peptide Fingerprinting of Tarantula Venoms in the Genus *Brachypelma*: Chemotaxonomic and Biochemical Applications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **11**: 1891-1899.
- ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CORZO, G. (2000). Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*, **82**: 893-907.
- ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CÉLÉRIER, M., NAKAJIMA, T., LAZDUNSKI, M. (2002). Novel Tarantula Toxins for Subtypes of Voltage-Dependent Potassium Channels in the Kv2 and Kv4 Subfamilies. *Molecular Pharmacology*, **62**: 48-57.
- ESCOUBAS, P., CORZO, G., HITELEY, B. J., CÉLÉRIER, 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., RASH, L. (2004). Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, **43 (5)**: 555-74.
- ESTRADA, G., VILLEGAS, E., CORZO, G. (2007). Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Natural Products Reports*, **24**: 145-161.
- FERREIRA, F. R. B., de MARCO, R., BEZERRA, M. S. S., MENDONCA, T. F., LUZ, B. R., PAIVA, P. M. G., TANAKA, A. S., MORAIS, M. M. C., CAVALCANTI, M. S. M., SILVA JUNIOR, P. I. (2007). Identification of Protease Inhibitor and Antimicrobial Peptides in *Lasiodora* sp hemolymph. In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference, Salvador - Bahia. **CD XXXVI SBBq - Program and Abstract.**

- FONTANA M. D., LUCAS H. S. M., VITAL BRAZIL O. (2002). Neuromuscular blocking action of the *Theraphosa blondii* spider venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, **8 (2): 316-323**.
- FUJIWARA, S., IMAI, J., FUJIWARA, M., YAESHIMA, T., KAWASHIMA, T., KOBAYASHIT, K., KOBAYASHI, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *The journal of biological chemistry*, **265 (19): 11333-11337**.
- FREYVOGEL, T. (1972). Poisonous and venomous animals in East África. *Acta Tropica*, **29: 401-451**. In: LUCAS, S. M., DA SILVA JR., P.I., BERTANI, R., COSTA CARDOSO, J. L. (1994). Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of São Paulo, Brazil. *Toxicon*, **32 (10): 1211-1215**.
- GUETTE, C., LEGROS, C., TOURNOIS, G., GOYFFON, M., CÉLÉRIER, M. L. (2006). Peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of the *Lasiadora parahybana* tarantula venom gland *Toxicon*, **47 (6):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**.
- HAUPT, J. (2005). Taxonomy of spiders. *Toxin Reviews*, **24:249-256**.
- 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**.
- KALAPOTHAKIS, E., KUSHMERICK, C., GUSMÃO, D. R., FAVARON, G. O. C., FERREIRA, A. J., GOMEZ, M. V., ALMEIDA, A. P. (2003). Effects of the venom of a Mygalomorph spider (*Lasiadora* sp.) on the isolated rat heart. *Toxicon*, **41: 23 - 28**.
- KASSIRI, Z., ZOBEL, C., NGUYEN, T., MOLKENTIN, J. D., BACKX, P. H. (2002). Reduction of I_{to} Causes Hypertrophy in Neonatal Rat Ventricular Myocytes. *Circulation Research*, **90: 578-585**.
- KAWAI, N. (2005). Spider polyamine toxin. *Toxin Reviews*, **24: 273-289**.

- 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. *Journal of Biological Chemistry*, **281**: 20983-20992.
- KUHN-NENTWIG, L., MÜLLER, 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). *Journal of Biological Chemistry*, **277(13)**: 11208-11216.
- KUSHMERICK, C., MESQUITA DE CARVALHO, F., MARIA, M., MASSENSINI, A.R., ROMANO-SILVA, M.A., GOMEZ, M.V., KALAPOTHAKIS, E., PRADO, M.A.M. (2001). Effects of a *Lasiadora* spider venom on Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Toxicon*, **39**: 991-1002.
- LAMBERT, J. B.; SHURVELL H. F.; LIGHTNER A. D.; COOKS G. R. (1998) Organic Structural Spectroscopy. Ed. Prentice Hall, New Jersey.
- LAMPE, R. A., DEFEO, P. A., DAVISON, M. D., YOUNG, J., HERMAN, J. L., SPREEN, R. C., HORN, M. B., MANGANO, T. J., KEITH, R. A. (1993). Isolation and pharmacological characterization of omega-grammotoxin SIA, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium channel responses. *Molecular Pharmacology*. **44(2)**: 451-60.
- LEE, C. W., KIM, S., ROH, S. H., ENDOH, H., KODERA, Y., MAEDA, T., KOHNO, T., WANG, J. M., SWARTZ, K. J., KIM, J. I. (2004). LEGROS, C., CÉLÉRIER, M., HENRY, M., GUETTE, C. (2004). Nanospray analysis of the venom of the tarantula *Theraphosa leblondi*: a powerful method for direct venom mass fingerprinting and toxin sequencing. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**: 1024-1032.
- LI, D., XIAO, Y., HU, W., XIE, J., BOSMANS, F., TYTGAT, J., LIANG, S. (2003). Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. *Federation of European Biochemical Societies - FEBS Letters*, **555**: 616-622.
- LIAO, Z., YUAN, C., DENG, M., LI, J., CHEN, J., YANG, Y., HU, W., LIANG, S. (2006). Solution Structure and Functional Characterization of Jingzhaotoxin-XI: A Novel Gating Modifier of both Potassium and Sodium Channels. *Biochemistry*, **45 (51)**: 15591-15600.

- LIAO, Z., YUAN, C., PENG, K., XIAO, Y., LIANG, S. (2007). Solution structure of Jingzhaotoxin-III, a peptide toxin inhibiting both Nav1.5 and Kv2.1 channels. *Toxicon*, **50**: 135-143.
- LIU, Z., DAI, J., CHEN, Z., HU, W., XIAO, Y., LIANG, S. (2003). Isolation and characterization of hainantoxin-IV, a novel antagonist of tetrodotoxin-sensitive sodium channels from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **60**: 972-978.
- LIU, Z., DAI, J., DAI, L., DENG, M., HU, Z., HU, W., LIANG, S. (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 (13)**: 8628-8635.
- LIU, Z. H., QIAN, W., LI, J., ZHANG, Y., LIANG, S. (2009). Biochemical and pharmacologic al study of venom of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, **15 (1)**: 79-92.
- LORENZINI, D. M., SILVA JR. P. I., FOGAÇA, A. C., BULET, P., DAFFRE, S. (2003) Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Developmental and Comparative Immunology*, **27**: 781-791.
- LORENZINI, D. M., FUKUZAWA, A. H., SILVA, P. I., MACHADO-SANTELLI, G., BIJOVSKY, A. T., DAFFRE, S. (2003). Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **33(10)**: 1011-1016
- LUCAS, S. M., DA SILVA JR., P.I., BERTANI, R., COSTA CARDOSO, J. L. (1994). Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of São Paulo, Brazil. *Toxicon*, **32 (10)**: 1211-1215.
- LAURE, M., DE, E., COSETTE, P., GAGNON, J., MOLLE, G. R., LANGE, C. (1999). Isolation, amino acid sequence and functional assays of SGTx1 - The first toxin purified from the venom of the spider *Scodra griseipes*. *Federation of European Biochemical Societies - FEBS Journal*, **265**: 572-579.

- MATSUZAKI, K., NAKAMURA, A., MURASE, O., SUGISHITA, K., FUJII, N., MIYAJIMA, K. (1997). Modulation of Magainin 2 - Lipid bilayer interactions by peptide charge. *Biochemistry*, **36**: 2104-2111.
- MCCORMICK, K. D. & MEINWALD, J. (1993). Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. *Journal of Chemical Ecology*, **19** (10): 2411-2451.
- MIDDLETON, R. E., WARREN, V. A., KRAUS, R. L., HWANG, J. C., LIU, C. J., DAI, G., BROCHU, R. M., KOHLER, M. G., GAO, Y., GARSKY, V. M., BOGUSKY, M. J., MEHL, J. T., COHEN, C. J., SMITH, M. M. (2002). Two Tarantula Peptides Inhibit Activation of Multiple Sodium Channels. *Biochemistry*, **41** (50): 14734-14747.
- NASCIMENTO, A., CHAPEAUROUGE, A., PERALES, J., SEBBEN, 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., SZOKE, B., PALMA, A., WANG, G., CHEN, X., HOPKINS, W., CONG, R., MILLER, J., URGE, L., TARCZY-HORNOCH, K., LOO, J. A., DOOLEY, D. J., NADASDI, L., TSIEN, R. W., LEMOS, J., MILJANICH, G. (1998). Selective Peptide Antagonist of the Class E Calcium Channel from the Venom of the Tarantula *Hysteroocrates gigas*. *Biochemistry*, **37**: 15353-15362.
- NICOLAS, P., MOR, A. (1995). Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annual Reviews of Microbiology*, **49**:277-304.
- NIHEI, K., KATO, M. J., YAMANE, T., PALMAC, M. S., KONNO, K. (2002). An Efficient and Versatile Synthesis of Acylpolyamine Spider Toxins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **12**: 299-302.
- PENG, K., CHEN, X., LIANG, S. (2001). The effect of Huwentoxin-I on Ca²⁺ channels in differentiated NG108-15 cells, a patch-clamp study. *Toxicon*, **39**: 491-498.
- PEREIRA, L. S., SILVA JR., P. I., MIRANDA, T. M., ALMEIDA, I. C., NAOKI, H., KONNO, K., DAFFRE, S. (2007). Structural and biological characterization of an antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **352**: 953-959.

- PIMENTEL, C., CHOI, S., CHAGOT, B., GUETTE, C., CAMADRO, J., DARBON, H. (2006). Solution structure of PcFK1, a spider peptide active against *Plasmodium falciparum*. *Protein Science* **15**: 628-634.
- 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.
- REES, J. A., MONIATTE, M., BULET, P. (1997). Novel Antibacterial Peptides Isolated from a European Bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **27 (5)**: 113-122.
- RUTA, V., MACKINNON, R., (2004). Localization of the Voltage-Sensor Toxin Receptor on KvAP. *Biochemistry*, **43 (31)**: 10071-10079.
- SALAMONI, S. D., COSTA, J. C., PALMA, M. S., KONNO, K., NIHEI, K., TAVARES, A. A., ABREU, D. S., VENTURIN, G. T., CUNHA, F. B., OLIVEIRA, R. M., BREDA, V. R. (2005). Antiepileptic effect of acylpolyaminetoxin JSTX-3 on rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *Brain Research*, **1048**: 170 - 176.
- SANGUINETTI, M. C., JOHNSON, J. H., HAMMERLAND, L. G., KELBAUGH, P. R., VOLKMANN, R. A., SACCOMANO, N. A., MUELLER, A. L. (1997). Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Molecular Pharmacology*, **51 (3)**:491-8.
- SHAI, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1642**: 55-70.
- SHEUMACK, D. D., CLAASSENS, R., WHITELEY, N. M., HOWDEN, M. E. (1985). Complete amino acid sequence of a new type of lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax robustus*. *Federation of European Biochemical Societies - FEBS Letters*, **181**:154-156.
- SHU, Q., LIANG, S.P. (1999) Purification and characterization of huwentoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *Journal of Peptide Research*, **53**: 486-491.

- SIEMENS, J., ZHOU, S., PISKOROWSKI, R., NIKAI, T., LUMPKIN, E. A., BASBAUM, A. I., KING, D., JULIUS, D. (2006). Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature*, **444**: 208-212.
- SILVA JR., P. I., 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 horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *The Journal Of Biological Chemistry*, **275 (43)** : 33464-33470.
- SKINNER, W. S., ADAMS, M. E., QUISTAD, G. B., KATAOKA, H., CESARIN, B. J., ENDERLIN, F. E., SCHOOLEY, A. (1989). Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Journal of Biological Chemistry*, **264**: 2150-2155.
- SKINNER, W. S., DENNIS, P. A., LUI, A., CARNEY, R. L., QUISTAD, B. (1990). Chemical characterization of acylpolyamine toxins from venom of a trap-door spider and two tarantulas. *Toxicon*, **28 (5)**:541-546.
- STAPLETON, A., BLANKENSHIP, D. T., ACKERMANN, B. L., CHEN, T. M., GORDER, G. W., MANLEY, G. D., PALFREYMAN, M. G., COUTANT, J. E., CARDIN, A. D. (1990). Curtatoxins. Neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from the funnel-web spider *Hololena curta*. *Journal of Biological Chemistry*, **265**: 2054-2059.
- STRIESSNIG, J., GRABNER, M., MITTERDORFER, J., HERING, S., SINNEGGER, M. J., GLOSSMANN, H. (1998). Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, **19 (3)**: 108-115.
- 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.
- SWARTZ, K. J., MACKINNON, R. (1995). An inhibitor of the Kv2.1 Potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarântula. *Neuron*, **15**: 941-949.
- TAKEUCHI, K., PARK, E. J., LEE, C. W., KIM, J., TAKAHASHI, H., SWARTZ, K. J., SHIMADA, I. (2002). Solution Structure of ω -Grammotoxin SIA, A Gating Modifier of P/Q and N-type Ca²⁺ Channel. *Journal of Molecular Biology*, **321(3)**: 517-526.

- VIEIRA, A. L. G., MOURA, M. B., BABÁ, E. H., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C., KALAPOTHAKIS, E., CASTRO, I. M. (2004). Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiadora* sp.. *Toxicon*, **44(8): 949-952**.
- VILLEGAS, E., CORZO, G. (2005). Pore forming peptides from Spiders. *Toxin Reviews*, **24: 347-359**.
- XIAO, Y., LIANG, S. (2003). Purification and characterization of Hainantoxin-V, a tetrodotoxin-sensitive sodium channel inhibitor from the venom of the spider *Selenocosmia hainana*. *Toxicon*, **41: 643-650**.
- XIAO, Y., TANG, T., YANG, Y., WANG, M., HU, W., XIE, J., ZENG, X., LIANG, S. (2004) Jingzhaotoxin-III, a Novel Spider Toxin Inhibiting Activation of Voltage-gated Sodium Channel in Rat Cardiac Myocytes. *The Journal of biological chemistry*, **279 (25): 26220-26226**.
- XIAO, Y., TANG, J., HU, W., XIE, J., MAERTENS, C., TYTGAT, J., LIANG, S. (2005). Jingzhaotoxin-I, a Novel Spider Neurotoxin Preferentially Inhibiting Cardiac Sodium Channel Inactivation. *The Journal of biological chemistry*, **280 (13): 12069-12076**.
- YAN, L., ADAMS, M. E. (1998) Lycotoxins, Antimicrobial Peptides from Venom of the Wolf Spider *Lycosa carolinensis*. *The Journal Of Biological Chemistry*, **273(4): 2059-2066**.
- YEAMAN, M. R., YOUNT, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptides action and resistance. *Pharmacological Reviews*, **55: 27-55**.
- YUAN, C., LIAO, Z., ZENG, X., DAI, L., KUANG, F., LIANG, S. (2007). Jingzhaotoxin-XII, a gating modifier specific for Kv4.1 channels. *Toxicon*, **50: 646-652**.
- ZENG, X., DENG, M., LIN, Y., YUAN, C., LI, J., LIANG, S. (2007). Isolation and characterization of Jingzhaotoxin-V, a novel neurotoxin from the venom of the spider *Chilobrachys jingzhao*. *Toxicon*, **49: 388-399**.
- ZASLOFF, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415: 389-395**.