



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



Caracterização Química e Farmacológica de Componentes Bioativos da Peçonha da Aranha *Caranguejeira Guyruita cerrado*

Pollyanna Fernandes Campos

Orientador: Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

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



Brasília, 2011.

“Todos os homens, por natureza, desejam saber”.

Aristóteles.

Dedicatória:

À minha família que são meus amigos.

Aos meus amigos que são minha família.

Ao meu querido José Roberto.

A todos entusiastas da ciência.

Agradecimentos

Primeiramente quero citar uma frase de Albert Einstein que sintetiza perfeitamente o sentido desses agradecimentos: “Cem vezes por dia eu me lembro que minha vida interior e exterior depende do trabalho de outros homens, que estão vivos e mortos, e que eu devo me esforçar para me manifestar na mesma medida em que recebi”.

Agradeço a Deus por ter providenciado a conclusão desse mestrado em sua infinita generosidade e amor inefável.

À minha família que sempre me deu apoio mesmo achando a carreira de bióloga um tanto quanto estranha. Aos meus pais: Ilza Aparecida Fernandes e Paulo Cesar Fernandes Campos pelo amor, o incentivo, por serem os meus exemplos de determinação e honestidade. À minha irmã Paula Cristina F. Campos pelo amor, a amizade incondicional, o apoio e por ser a pessoa que sempre caminhou ao meu lado. Ao meu irmão Icaro F. Campos que sempre me incentivou de um modo muito peculiar e usou de métodos pouco convencionais para me apoiar (mas funciona) e principalmente por ter me dado a alegria de ter o Pedro como sobrinho. Ao meu querido, José Roberto de M. Faria pelo amor, o companheirismo e por sempre estar comigo mesmo quando estive distante.

Ao meu orientador, professor Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior pelo incentivo, o apoio, o aprendizado e a confiança ao me aceitar como mestranda;

Aos professores do Laboratório de Toxinologia (LTx-UnB): Dr. Carlos Alberto Schwartz, Dra Mariana de Souza Castro, Dra. Elisabeth N. Schwartz e Dra. Márcia Renata Mortari por terem me recebido no laboratório, pelas contribuições e sugestões dadas ao trabalho;

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Cenargen (LEM): Dra. Maura Prates Viana, Dr. Luciano Paulino Silva, Dr. Marcelo Bemquerer, Felipe Vinecky, Carol Ribeiro, Kelliane, Flávio e Daniel Sifuentes pela convivência e o apoio. De maneira especial, ao Dr. Carlos Bloch Júnior, por ter me concedido acesso ilimitado aos equipamentos e reagentes, pelo valioso aprendizado e as sempre bem vindas sugestões. Ao meu amigo Eder Barbosa, pela amizade, pela ajuda fundamental a esse trabalho, em especial com as análises por espectrometria de massa, pelo apoio

incondicional, o aprendizado, pelas sugestões, as críticas... A lista é enorme! A você sou muito grata pela amizade e por tudo que fez por mim!

Ao meu amigo Dr. André Melro Murad (Embrapa Cenargen) pelos ensinamentos e a ajuda com a modelagem molecular;

À Dra. Isabel de Fátima Correia Batista e Rafael Marques Porto do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pela contribuição no sequenciamento por degradação de Edman;

Ao Dr. Jader Santos Cruz e Antonio Nei Santana Gondim do Laboratório de Membranas Excitáveis (LAMex-ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por terem me recebido com imensa disposição para realizar os ensaios eletrofisiológicos;

Ao Hugo de Almeida Silva do Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro – UnB e à Solange Cristina Rêgo pela amizade e a ajuda com os ensaios de zimografia;

Aos meus amigos do Laboratório de Toxinologia: Janaína Emanuelle, Thalita, Natiela Beatriz, Jimmy, Fagner, Andréa, Marianne, Cristiano Gati pela ótima convivência e pelas diversas conversas. Às minhas queridas gurias, Luisa De Sordi (minha fotógrafa oficial) e Fernanda por terem levado ao meu mestrado mais leveza e alegria. À Solange Cristina que se encarregou do rock 'n' roll dos nossos resultados, pelas conversas, as traquinagens, pelo apoio e o sorriso. À minha querida e atrapalhada Carol Barbosa pela amizade, pelo apoio e pelas conversas que só a Carol pode proporcionar. À Jessica Kelle com quem tive a alegria de conviver e compartilhar a experiência de ser mestranda, agradeço pela amizade, a paciência, pelo apoio e o companheirismo. Ao Rafael Melani, meu amigo de todas as aventuras, meu parceiro no laboratório desde a minha chegada ao LTx, sempre presente na coleta dos espécimes de *Gyruita cerrado* e que mesmo alérgico me ajudou inúmeras vezes na extração de peçonha.

Aos meus amigos do Laboratório de Anatomia Animal (LACV-UnB): professor Dr. Antonio Sebben, Leandro Campos, Pedro Ivo Molina, Lucélia, Tainã e aos ex-LACV's Núbia Esther, Rafael Félix, Carolzinha Lins, Luisa Helena, Thompson Tomatieli, Núbia Carla pelo companheirismo, a preciosa amizade, os incontáveis

devaneios, as alegrias, a jogatina, os aprendizados e pelos empréstimos de pinças, algodões, lupas e afins.

Aos técnicos do laboratório do LTx Washington e Cezinha pelo apoio técnico, o carinho e por terem me apoiado na implementação do leite na copa do laboratório e ainda por garantir que nunca me faltasse leite;

Aos meus amigos da Universidade Católica de Brasília – UCB: Virgílio Hipólito, Leonardo Holanda, Bárbara Garcia, Lucas Carvalho, Betty Souza, Lilian Travassos, José Geraldo, Erivaldo Casado Filho e Thaina Lima, entre tantos outros por terem compartilhado comigo os meus primeiros passos na biologia, pela amizade e todo o aprendizado. De forma especial, à professora Dra Betânia Ferraz Quirino pelo aprendizado e por ter sido a primeira incentivadora ao meu ingresso à pesquisa.

Às minhas queridas amigas, Valéria N, Guimarães, Lara Ribeiro, Fernanda Monteiro, Carol e Carmen Peres pela amizade de sempre, pelo carinho e pelos momentos inesquecíveis.

Ao Dr. Antonio Essado proprietário da Fazenda Nossa Senhora Aparecida, que forneceu abrigo e doce de leite para as coletas das aranhas.

Gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por todo o suporte oferecido ao mestrado, em especial à Daniele Cristiane de Lara Brito por todo apoio e disposição aos alunos.

E ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Por fim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização desse trabalho. A vocês o meu muito obrigado!

Índice Geral

1. Introdução	1
1.2. Composição da Peçonha de Aranhas	1
1.3. Componentes Não-Proteicos (< 10 kDa)	2
1.4. Peptídeos (1-10 kDa)	5
1.4.1. Peptídeos Citolíticos Lineares	5
1.4.2. Peptídeos Neurotóxicos	6
1.5. Componentes Protéicos (> 10 kDa)	13
1.6. <i>Guyruita cerrado</i> (Guadanucci, 2007)	15
2. Justificativa	17
3. Objetivos	18
3.1. Objetivo geral	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. Material e métodos	19
4.1. Obtenção da peçonha	19
4.2. Quantificação das amostras	19
4.3. Fracionamento da Peçonha Bruta	19
4.4. Análises por Espectrometria de Massa e Sequenciamento De Novo	20
4.5. Redução e Alquilação	21
4.6. Hidrólise enzimática	21
4.7. Degradação de Edman e Sequenciamento N-terminal	21
4.8. Ensaio Eletrofisiológicos	22
4.8.1. Isolamento de Cardiomiócitos	22
4.8.2. Experimentos em <i>Whole-cell Patch-Clamp</i>	22
4.8.3. Protocolo Experimental	23
4.8.4. Análise Estatística	23
4.9. Construção do Modelo Molecular	24
4.10. Zimograma: Hialuronidase	24
5. Resultados	26
5.1. Fracionamento da Peçonha e Análise por Espectrometria de Massa	26
5.2. Caracterização Química e Farmacológica	30

5.2.1. Caracterização Química Parcial da Fração Gc24/25.....	30
5.2.2. Purificação da Fração Gc27	34
5.2.3. Caracterização Química e Farmacológica das Frações Gc32 e Gc33	35
5.3. Atividade Hialuronidásica das Frações Gc34 e Gc35.....	56
6. Discussão	58
7. Conclusões.....	64
8. Referências Bibliográficas	66

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura geral de acilpoliaminas isoladas de peçonha de aranha. (A) Acilpoliaminas com aminoácido: JSTX-1 e NSTX-3. (B) Acilpoliaminas sem aminoácido: AGEL 468 e HO 359. Modificado de McCormick & Meinwald, (1993).

Figura 2. Toxinas de aranhas que atuam em canais iônicos voltagem dependentes. (A) Esquema representativo vista do topo dos canais Na^+v , $\text{Ca}^{2+\text{v}}$ (esquerda) e K_v (direita). O centro do poro é circundado pelos quatro sensores de voltagem de quatro domínios (I-IV). Nos canais Na^+v e $\text{Ca}^{2+\text{v}}$, os “paddles” não são idênticos, sendo identificados no esquema por cores diferenciadas. No canal K_v , esses “paddles” são idênticos, portanto, estão representados pela mesma cor. (B) Visão lateral dos canais Na^+v , $\text{Ca}^{2+\text{v}}$ (acima) e K_v (abaixo) embebidos na bicamada lipídica. Nos canais Na^+v e $\text{Ca}^{2+\text{v}}$ cada domínio (I-IV) consistem em seis segmentos transmembrânicos (S1-S6) os quais S1-S4 formam os sensores de voltagem e os segmentos S5-S6 de cada domínio, juntos formam o poro seletivo para Na^+ e Ca^{2+} , respectivamente. (C) Alinhamento das sequências primárias das toxinas de aranhas com três pontes dissulfeto e ação em canais Na^+v , $\text{Ca}^{2+\text{v}}$ e/ou K_v (indicado por círculos azuis). %C (% resíduos conservados). Modificado de Bosmans & Swartz, (2010).

Figura 3. Representação molecular das estruturas tridimensionais de neurotoxinas isoladas da peçonha de aranhas. (A) Hanatoxina-1, atua em canais para K^+ (PDB 1D1H; Takahashi et al., 2000); (B) Huwentoxina-IV, atua em canais para Na^+ (PDB 1MB6; Peng et al., 2002); (C) ω -Agatoxina-IVA, atua em canais para Ca^{++} (PDB 1OAV; Kim et al., 1995). As pontes dissulfeto estão representadas em laranja. Imagens obtidas com auxílio do programa Pymol.

Figura 4. Espécime de fêmea de *Guyruita cerrado*.

Figura 5. Perfil cromatográfico do fracionamento da peçonha de *Guyruita cerrado*. Fracionamento em coluna C_{18} Phenomenex (0,46 x 250 mm) em sistema RP-HPLC. O monitoramento das frações foi em 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. As frações destacadas foram selecionadas para caracterização bioquímica.

Figura 6. Comparação dos perfis cromatográficos da peçonha bruta de fêmea (azul) e macho (preto) de *Guyruita cerrado*. Fracionamento em coluna C_{18} Phenomenex (0,46 x 250 mm) em sistema RP-HPLC. O monitoramento das frações foi em 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min.

Figura 7. Frequência de íons (m/z) detectados nas frações cromatográficas da peçonha de *Guyruita cerrado* por tempo de retenção (min.). A linha azul representa o gradiente de acetonitrila.

Figura 8. Recromatografia da fração Gc24/25. (A) A recromatografia da fração Gc24/25 em sistema RP-HPLC em coluna analítica C_{18} Phenomenex Luna 5u 100 A (4,6 mm x 150 mm) e gradiente de acetonitrila resultou em três frações distintas chamadas de Gc24/25.1; Gc24/25.2 e Gc24/25.3. (B) Purificação da fração Gc24/25.2, identificada pela seta. (C) Espectrograma de massa do peptídeo Gc24/25.2. Massa molecular detectada em sistema MALDI TOF/TOF MS.

Figura 9. Sequenciamento parcial *de novo* de Gc24/25.2 por MALDI-MS/MS. (A) Sequenciamento do precursor $[\text{M}+\text{H}]^+$ 5044.802. Série c está assinalada no topo. Íons não assinalados constituem série b e fragmentos internos. (B) Detalhe dos íons gerados a partir da fragmentação na fonte do precursor $[\text{M}+\text{H}]^+$ 5044.802.

Figura 10. Alinhamento da sequência parcial de Gc24.2 realizado por meio do programa ClustalW. (Thompson et al., 1994). Ba1b e Ba1a (*Brachypelma ruhnaui*; Corzo et al., 2008); Bs1a (*Brachypelma smithii*; Kaiser et al., 1994); Asp1a e Asp1b (*Eurypelma californicum*; Savel-Niemann, 1989); JZTX-47; JZTX-47.2; JZTX-8; JZTX-8.2 (*Chilobrachys jingzhao*;

Liao *et al.*, 2007). “*”: resíduos idênticos, “.”: substituição conservativa, “:”: substituição semi-conservativa.

Figura 11. Purificação do peptídeo GC27_1. (A) Recromatografia da fração Gc27.1 (indicada pela seta) em sistema RP-HPLC em coluna analítica C₁₈ Phenomenex Luna 5u 100 A (4,6 mm x 150 mm) e gradiente de acetonitrila. (B) Espectrograma de massa da fração Gc27.1. Massa molecular obtida por sistema MALDI TOF/TOF MS.

Figura 12. Recromatografia da fração GC32. (A) A recromatografia da fração GC32 em sistema RP-HPLC em coluna analítica C₁₈ Phenomenex Luna 5u 100 A (4,6 mm x 150 mm) e gradiente de acetonitrila resultou em três frações distintas. (B) As três frações foram novamente cromatografadas em sistema RP-HPLC em coluna analítica C₁₈ Phenomenex Luna 5u 100 A (4,6 mm x 150 mm) e gradiente de acetonitrila resultando nas frações Gc32.1; Gc32.2 e Gc32.3.

Figura 13. Espectrogramas de massa molecular das frações recromatografadas de Gc32 detectadas em sistema MicroQTOF-Q II. (A) Massa molecular de Gc32.1. (B) Massa molécula de Gc32.2. (C) Massa molecular de Gc32.3.

Figura 14. Mobilidade gasosa do peptídeo Gc32.1. A mobilidade gasosa de GC32_1 foi observada em sistema ESI/MALDI – SYNAPT. O íon 3150.23 Da, representado pelo valor de sua dupla carga de 1575.709 apresenta um perfil que sugere duas conformações. O íon que apresenta apenas a conformação menos compacta, o qual possui um valor de “drift time” menor, foi possível observar que trata-se de um perfil isotópico de íon com quatro cargas (diferença igual a 0.25 Da entre os picos). O valor da massa monoisotópica desse íon é igual a 1575.9418 (em destaque no quadro), ou seja, o dobro da massa molecular do peptídeo Gc32.1 o que caracteriza a provável dimerização.

Figura 15. Sequenciamento parcial *de novo* de Gc32.1 por MALDI-ISD. (A) Sequenciamento do precursor [M+H]⁺ 3151.230. Série c está assinalada no topo. Íons não assinalados constituem série b e fragmentos internos. (B) Detalhe dos íons gerados a partir da fragmentação na fonte do precursor [M+H]⁺ 3151.230. (C) Sequência primária completa de Gc32.1 resultante das combinação de sequenciamento por degradação de Edman e MALDI-ISD.

Figura 16. Sequenciamento parcial *de novo* de Gc32.2 por MALDI-ISD. (A) Sequenciamento do precursor [M+H]⁺ 3313.368. Série c está assinalada no topo. Íons não assinalados constituem série b e fragmentos internos. (B) Detalhe dos íons gerados a partir da fragmentação na fonte do precursor [M+H]⁺ 3313.368.

Figura 17. Sequenciamento parcial *de novo* de Gc32.3 por MALDI-ISD. (A) Sequenciamento do precursor [M+H]⁺ 3385.754. Série c está assinalada no topo. Íons não assinalados constituem série b e fragmentos internos. (B) Detalhe dos íons gerados a partir da fragmentação na fonte do precursor [M+H]⁺ 3385.754.

Figura 18. Sequenciamento de novo do fragmento tríptico (1529.611 m/z) que gerou os últimos resíduos C-terminais de Gc32.3. (A) Sequenciamento do precursor [M+H]⁺ 1529.611 pós fonte (MALDI-PSD) por meio do espectrômetro de massa MALDI microFlex. Séries y e b estão assinaladas no topo. Íons não assinalados constituem outras séries, fragmentos internos ou imônios. (B) Sequenciamento do precursor [M+H]⁺ 1529.611 (MALDI-TOF/TOF-MSMS). Séries y está assinaladas no topo (C) Sequência primária completa do peptídeo Gc32.3 obtida através da combinação das técnicas de sequenciamento por degradação de Edman, MALDI-ISD e MALDI microFlex-PSD.

Figura 19. Purificação da fração GC33. (A) Recromatografia da fração GC33 RP-HPLC em coluna analítica C₁₈ Phenomenex Luna 5u 100 A (4,6 mm x 150 mm) e gradiente de

acetonitrila. (B) Espectrograma de massa molecular da Gc33.1 em sistema MALDI TOF/TOF MS, modo linear.

Figura 20. Sequenciamento parcial *de novo* de Gc33.1 por MALDI-MS/MS. (A) Sequenciamento do precursor $[M+H]^+$ 3499.90. Série c está assinalada no topo. Íons não assinalados constituem série b e fragmentos internos. (B) Detalhe dos íons gerados a partir da fragmentação na fonte do precursor $[M+H]^+$ 3499.90.

Figura 21. Sequenciamento *de novo* do fragmento tríptico (1642.85 m/z) que gerou os últimos resíduos C-terminais de Gc33.1. (A) Sequenciamento do precursor $[M+H]^+$ 1642.85 pós fonte (MALDI-PSD) por meio do espectrômetro de massa MALDI microFlex. Séries y e b estão assinaladas no topo. Íons não assinalados constituem outras séries, fragmentos internos ou imônios. (B) Sequência primária completa do peptídeo Gc33.1 obtida através da combinação das técnicas de sequenciamento por degradação de Edman, MALDI-MS/MS e MALDI microFlex-PSD.

Figura 22. Alinhamento das sequências de Gc32.1; Gc32.2; Gc32.3 e Gc33.1 realizado por meio do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). SGTx1 (*Scodra griseipes*; Marvin *et al.*, 1999); HaTx1 e HaTx2 (*Grammostola rosea*; Swartz & Mackinnon); HmTx1 (*Heteroscodra maculata*; Escoubas *et al.*, 2002); VaTx1 e VaTx2 (*Psalmopoeus cambridgei*; Siemens *et al.*, 2006); JZTX-XI.4; JZTX-41; ZTX-41.2 e JZTX-42. “*”: resíduos idênticos, “.”: substituição conservativa, “:”: substituição semi-conservativa.

Figura 23. Comparação da superfície molecular de Hanatoxina (PBD 1D1H) e os peptídeos GcTx2 e GcTx3. As setas indicam os resíduos envolvidos na funcionalidade da hanatoxina (K22 e R3) e a substituição da lisina por leucina (L22) de GcTx2 e GcTx3. A região circundada representa o cinto de cargas. Coloração de acordo com a hidrofobicidade da molécula, em azul (apolar) e em vermelho (polar).

Figura 24. Modelo molecular 3D dos peptídeos GcTx2 e GcTx3. (A) Modelos 3D de GcTx2 (acima a esquerda) e GcTx3 (abaixo a esquerda) mostrando a estrutura de $\beta\beta$. (B) Sobreposição dos modelos 3D de Gc32.3 e Gc33.1 evidenciando a semelhança estrutural entre eles.

Figura 25. Efeito de GcTx1-3 sobre a corrente de potássio de acordo com a relação de voltagem. (A) GcTx1 aumentou a corrente de potássio no estado despolarizado da membrana. (B) GcTx2 aumentou a corrente de potássio no estado despolarizado. (C) GcTx3 aumentou a corrente de potássio no estado despolarizado. D. Foi usado rampas de voltagem (120 mV/s) onde as membranas celulares foram mantidas a -80 mV, despolarizadas para +60 mV e em seguida repolarizadas para -120 mV por 1.5 s.

Figura 26. Efeito de GcTx1-3 sob as correntes transitórias de potássio (I_K) em canais K_v de cardiomiócitos. Valor máximo da corrente transitória (I_K) medida logo após o início do pulso despolarizante registradas em miócitos usando a técnica de *whole-cell patch-clamp*. As I_K s foram obtidas por pulsos de despolarização +60 mV/s, potencial de repouso de -80mV. Os peptídeos GcTx1-3 provocaram o aumento das correntes transitórias.

Figura 27. Efeito dos peptídeos GcTx1-3 sob o decurso para correntes de saída (I_{to}). Pulso de despolarização para +60 mV/s, pontencial de repouso -80 mV sob condições controle (acima); prolongamento do decurso para correntes de saída com 3 μ M de GcTx1-3 (ao meio) e a sobreposição da linha das correntes K^+ no controle, na presença de 3 μ M de GcTx1-3 (abaixo).

Figura 28. Comparação do efeito dos peptídeos GcTx1-3 na corrente de saída de potássio de cardiomiócitos (I_{to}). GcTx2 gerou um aumento da corrente transiente de potássio maior em

relação aos peptídeos GcTx1 e GcTx3. Os asteriscos indicam que a diferença foi significante estatisticamente, $p < 0.05$.

Figura 29. Comparação do efeito dos peptídeos GcTx1-3 na corrente de potássio no estado estável (I_{kss}). A corrente de potássio retoma ao fluxo do controle no estado estável, efeito reversível.

Figura 30. Relação corrente-voltagem (I/V) feita a partir dos valores de correntes medidos em passos de 10 mV, de -120 a +50 mV. Os asteriscos indicam que o efeito foi significativo estatisticamente, $p < 0.05$.

Figura 31. Comparação do efeito dos peptídeos GcTx1-3 na despolarização dos canais K_v de cardiomiócitos. GcTx1 tem um efeito maior na despolarização dos canais K_v em relação à GcTx2 e 3. Os asteriscos indicam que a diferença foi significativo estatisticamente, $p < 0.05$.

Figura 32. Comparação do efeito dos peptídeos GcTx1-3 na repolarização dos canais K_v de cardiomiócitos. As correntes de potássio na presença de GcTx1-3 retomam ao fluxo do potássio na condição controle no momento da repolarização, efeito reversível.

Figura 33. Zimograma hialuronidásico em SDS-PAGE 12%, ácido hialurônico 0,14% da peçonha bruta de *Guyruita cerrado*; Frações GC34 e 35. (M) Marcador de massas moleculares (Broad Range Protein Molecular Weight Markers); (1) Controle positivo – *Loxosceles gaucho*; (2) Peçonha bruta de *G. cerrado*; (3) Frações Gc34 e 35.

Figura 34. Espectrograma de massa das hialuronidasas isoladas da peçonha de *Guyruita cerrado* obtido em sistema ESI/MALDI – SYNAPT - Waters. (A) Massa molecular monoisotópica da fração Gc34 – 42567 Da. (B) Massa molecular monoisotópica da fração Gc35 – 42958 Da.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Massas moleculares detectadas no fracionamento da peçonha bruta de fêmea de *G. cerrado*. Dados obtidos a partir de análise em espectrometria de massa (MALDI-TOF), nos modos refletido e linear com intervalo de faixa de 500 a 20000 m/z . As massas moleculares em negrito indicam exclusividade para a peçonha de fêmea.

Tabela 2. Massas moleculares detectadas no fracionamento da peçonha bruta de macho de *G. cerrado*. Dados obtidos a partir de análise em espectrometria de massa (MALDI-TOF), nos modos refletido e linear com intervalo de faixa de 500 a 20000 m/z . As massas moleculares em negrito indicam exclusividade para a peçonha de macho.

Tabela 3. Canais e genes correspondentes das correntes K^+ cardíacas.

LISTA DE ABREVIACÕES

Abs – Absorbância

ACN – Acetonitrila

AH – Ácido hialurônico

Canal para Na^+_v – Canal para sódio voltagem dependente

Canal para Ca^{2+}_v – Canal para cálcio voltagem dependente

Canal para K^+_v – Canal para potássio voltagem dependente

C-terminal – Carboxi-terminal

Da – Dalton

1,5 DAN – Matriz 1,5-diaminonafetaleno

g – Grama

L – Litro

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

MALDI-ISD - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization In Source Decay*

MS – *Mass Spectrometry*

mg – Miligrama

mL - Mililitro

mV – Milivolt

min – Minuto

m/z – Massa/carga

nm – Nanômetro

N-terminal – Amino-terminal

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

rpm – Rotação Por Minuto

PAM – Peptídeo Antimicrobiano

PDB - *Protein Data Bank*

pH – Potencial Hidrogeniônico

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TEMED - Tetrametiletenodiamina

TFA – Ácido Trifluoroacético

s – segundo

μL – Microlitro

μM – Micromolar

μs – Microsegundos

μV – Microvolt

v – Volume

LISTA DOS AMINOÁCIDOS

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

Resumo

A peçonha de aranhas representa um enorme reservatório de componentes capazes de exibir propriedades que os tornam potenciais ferramentas na investigação de moléculas bioativas visando à compreensão de sistemas biológicos e avanços biotecnológicos. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química e farmacológica de componentes bioativos presentes na peçonha da aranha *Guyruita cerrado*. O fracionamento por RP-HPLC da peçonha bruta de machos e fêmeas resultou na eluição de 28 e 38 frações cromatográficas, respectivamente. As análises em RP-HPLC e espectrometria de massa permitiram observar que existem diferenças qualitativas e quantitativas dos componentes moleculares entre os gêneros de *G. cerrado*. As análises descritas a seguir foram realizadas apenas com a peçonha de fêmea. Por sistemas (MALDI TOF/TOF MS e ESI/MALDI – SYNAPT) foram detectados 274 componentes de massa molecular distintos. Destes, foi possível a purificação de duas proteínas de cerca de 42 kDa com atividade hialuronidásica e de sete peptídeos. As sequências primárias completas e/ou parciais foram elucidadas por meio da combinação das técnicas de degradação de Edman, MALDI-MSD e MALDI-PSD. A sequência primária parcial do peptídeo Gc24/25.1 revelou similaridade de 60 - 65% com toxinas inseticidas de aranhas caranguejeiras. Foi possível a determinação da sequência primária completa de Gc32.1, Gc32.3, Gc33.1 e parcial de Gc32.2. Esses peptídeos apresentaram similaridade de 48 - 66% com neurotoxinas de canais para potássio de aranhas caranguejeiras. Os peptídeos Gc32.2, Gc32.3 e Gc33.1 foram renomeados de GcTx1, GcTx2 e GcTx3, respectivamente. Também foi realizada a modelagem molecular de GcTx2 e GcTx3 usando a hanatoxina como molde. O modelo proposto para esses peptídeos revelou uma estrutura $\alpha\beta\beta$ ligadas por três pontes dissulfeto e comportamento estável na simulação em ambiente solvatado por água. Através da técnica *whole-cell patch clamp* foi verificado que GcTx1-3 (3 μ M) provocaram aumento da condutância das correntes de saída K^+ em cardiomiócitos de camundongos. Dessa forma, é possível supor que a diversidade de compostos bioativos encontrados na peçonha da aranha caranguejeira *Guyruita cerrado* pode corroborar para buscas por novos fármacos e para a ampliação de pesquisa da biodiversidade de aranhas caranguejeiras do Cerrado brasileiro.

Abstract

The venom of spiders presents a huge reservoir of compounds able to exhibit properties that become a potential tool for investigation of bioactive molecules looking for an understanding of biological systems and biotechnological advances. Given this, the objective of this work performed a chemical and pharmaceutical characterization of the bioactive components present in *Guyruita cerrado* venom. The fractionating by RP-HPLC from the male and female whole venom resulted in 28 and 38 chromatographic eluted fractions respectively. The analysis on RP-HPLC and mass spectrometry showed qualitative and quantitative differences of the molecular mass components between *G. cerrado* genera. The forward analyses were performed for female venom. 274 components with different molecular masses were using two MS systems (MALDI TOF/TOF MS and ESI/MALDI – SYNAPT). From these, two proteins with approximately 42 kDa with hyaluronidase activity and 7 peptides were purified. The primary sequences were elucidated by a combination of Edman, MALDI-MS and MALDI-PSD degradation techniques. The partial primary sequences of the peptide Gc24/25.1 revealed a similarity between 60-65% to insecticide toxins from tarantula spiders. It was achieved the complete primary sequences determination of Gc32.1, Gc32.3, Gc33.1 and partial primary sequence resolution of Gc32.2. These peptides had 48-66% of similarity to tarantula spiders neurotoxins that affects potassium channels. The peptides Gc32.2, Gc32.3 and Gc33.1 were renamed GcTx1, GcTx2 and GcTx3 respectively. The molecular modeling of GcTx2 and GcTx3 was done using hanatoxin as template. The mold of peptides showed an $\alpha\beta\beta$ structures linked by three disulfide bonds and stable behavior in simulation in a water solvated environment. The GcTx1-3 (3 μ M) were assayed using the *whole-cell patch clamp* technique and cause an increase on the current conductance of K^+ in mouse cardiomyocytes. On this way, it's possible to suppose that the diversity of the bioactive compounds found in tarantula spiders *Guyruita cerrado* venom can collaborate to searches for new drugs and to the expansion the biodiversity research of tarantula spiders in Brazilian Cerrado.

1. Introdução

A primeira aparição das aranhas data do período Carbonífero por volta de 300 milhões de anos. As aranhas estão entre os animais terrestres mais bem sucedidos e diversificados, atrás apenas dos insetos e carrapatos (Rash & Hodgson, 2002).

A lista atual de diversidade global de aranhas inclui 41253 espécies em 3777 gêneros distribuídas em 109 famílias (Platnick, 2010). A ordem Aranae está dividida em três subordens: Mesothelae, a qual contém apenas a Família Liphistiidae, constituída de aranhas asiáticas de abdômen segmentado; Araneomorphae que é representada por famílias mais derivadas; e Mygalomorphae com representantes mais primitivos por conservarem características plesiomórfas (Brusca & Brusca, 2003; Haupt, 2003; Platnick, 2010).

A disputa por recursos está presente em todos os habitats, dessa forma, o uso de veneno ou de peçonha está entre uma das técnicas mais fascinantes de captura de presa e de defesa contra predadores (Fry *et al.* 2006). Assim, as aranhas também utilizam a peçonha na imobilização e/ou morte da presa e defesa contra predadores (Rash & Hodgson, 2002).

As aranhas são animais carnívoros com uma dieta composta principalmente por insetos e outros artrópodes. No entanto, aranhas migalomorfas de grande porte podem capturar e se alimentar de sapos, lagartos, cobras, pequenas aves e roedores (McCormick & Meinwald, 1993; Rash & Hodgson, 2002).

A peçonha de aranhas pode ser dividida em dois grandes grupos de acordo com o caráter de sua ação: neurotóxica ou citolítica, podendo apresentar ambos efeitos biológicos (Vassilevski *et al.*, 2009).

1.2. Composição da Peçonha de Aranhas

A peçonha das aranhas é uma mistura complexa que compreende moléculas de diferentes naturezas químicas, com caráter hidrofílico e de baixa massa molecular, as acilpoliaminas e pequenos polipeptídios, além de amins biogênicas, ácidos livres, neurotransmissores, glicose, aminoácidos livres, sais e íons inorgânicos que podem

possuir ações farmacológicas, tais como moduladoras e/ou bloqueadores de canais iônicos, e formadores de poros em membranas plasmáticas. Além disso, a peçonha das aranhas contém moléculas de alta massa molecular, incluindo enzimas e neurotoxinas proteicas (Escoubas *et al.*, 2000; Estrada *et al.*, 2007).

A maior parte das toxinas de peçonha de aranha com função conhecida tem como alvo o sistema nervoso central provocando a interrupção de impulsos de condutância e/ou da transmissão sináptica através da ação em canais iônicos. Além disso, outras toxinas podem causar a ruptura da membrana celular e consequentemente necrose através da ação enzimática (Yan & Adams, 1998).

Estudos indicam que as aranhas podem produzir de 600-1000 peptídeos tóxicos diferentes em suas glândulas veneníferas (Escoubas *et al.*, 2006). Por outro lado, apenas quatro grupos de aranhas são potencialmente letais para os humanos como as aranhas dos gêneros *Latrodectus*, *Loxosceles*, *Phoneutria*, *Atrax* e *Hadronyche* (Isbister & White, 2004; Vetter & Isbister, 2008).

Os componentes presentes na peçonha de aranhas podem ser classificados em três grupos em função das diferenças nas massas moleculares: (1) moléculas de baixa massa molecular (<10 kDa); (2) peptídeos (1-10 kDa), distintos pela estrutura funcional em neurotoxinas contendo pontes dissulfeto e peptídeos lineares citolíticos; (3) componentes de alta massa molecular (>10 kDa), polipeptídeos, proteínas e neurotoxinas (Vassilevski *et al.*, 2009).

1.3. Componentes Não-Proteicos (< 10 kDa)

Os componentes de baixa massa molecular que são frequentemente encontrados na peçonha de aranhas são ácidos livres (como cítrico e láctico), glicose, aminoácidos livres, aminas biogênicas (como diaminopropano, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina) e neurotransmissores (como aspartato, glutamato, serotonina, histamina, ácido γ -butírico, dopamina e epinefrina) (Escoubas *et al.*, 2000). Vários desses componentes são neurotransmissores e outros são bloqueadores de canais iônicos. Diante disso, neurotoxinas de baixa massa molecular são potenciais fontes neuroquímicas para estudos do sistema nervoso central. Sendo assim, essas pequenas moléculas podem constituir novos modelos de fármacos, além disso, apresentar potencial importância para a indústria agroquímica (Palma & Nakajima, 2005).

Apesar da crescente caracterização de componentes de baixa massa molecular em peçonhas, existem outras remanescentes para serem descobertas. Algumas das toxinas de baixa massa molecular reportadas em peçonha de aranhas são as acilpoliaminas (Palma & Nakajima, 2005).

As acilpoliaminas são constituídas por um grupamento ácido carboxílico ligado a uma cadeia lateral constituída por 1 a 9 unidades de aminopropil, aminobutil ou aminopentil (Escoubas et al., 2000, 2000; Lima *et al.*, 2007). As primeiras acilpoliaminas isoladas de peçonha de aranha foram identificadas em *Nephila clavata* e *Argiope lobata*. Essas moléculas estão divididas em dois grupos: acilpoliaminas com aminoácidos e sem aminoácidos (Figura 1) (McCormick & Meinwald, 1993). Essas moléculas possuem propriedades que aparentemente são inseticidas, respondendo pela paralisação rápida de insetos através do bloqueio reversível da junção neuromuscular de insetos e no receptor pós-sináptico sensível a glutamato de mamíferos e insetos (Lima *et al.*, 2007). Devido à similaridade entre receptores de invertebrados e vertebrados, essas moléculas também reconhecem e antagonizam receptores de mamíferos (Estrada *et al.*, 2007).

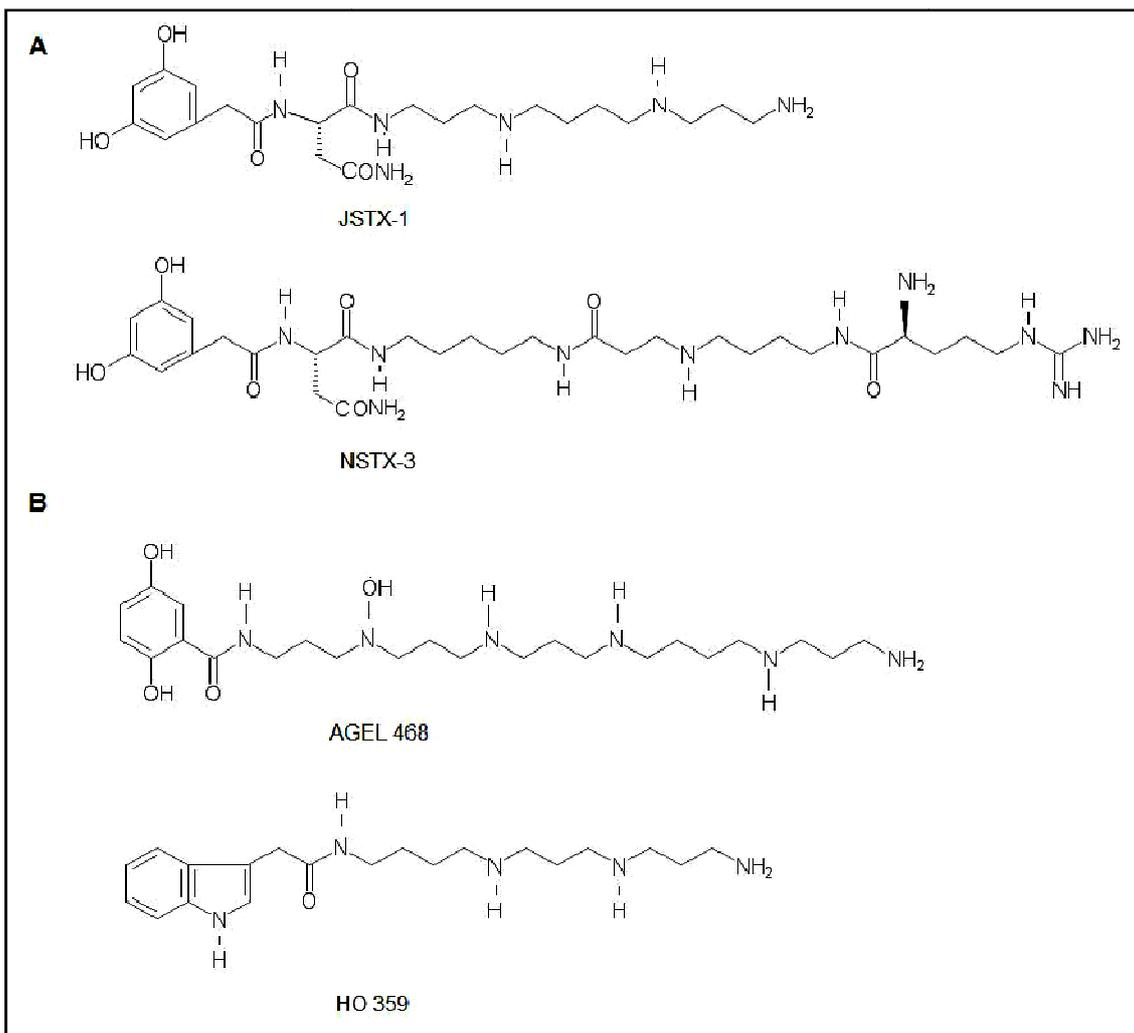


Figura 1. Estrutura geral de acilpoliaminas isoladas de peçonha de aranha. A. Acilpoliaminas com aminoácido: JSTX-1 e NSTX-3. **B.** Acilpoliaminas sem aminoácido: AGEL 468 e HO 359. Modificado de McCormick & Meinwald, (1993).

As acilpoliaminas neurotóxicas são instrumentos importantes para estudos de função fisiológica e organização do sistema nervoso. Esses estudos permitiriam a caracterização e identificação de neuroreceptores e canais iônicos através da habilidade de regulação que essas toxinas exercem sob receptores. Além disso, as poliaminas foram usadas no desenvolvimento de drogas e métodos para doenças associadas com distúrbios funcionais do sistema nervoso central de humanos, em particular, no tratamento da hipóxia, isquemia, epilepsia, e nas doenças de Alzheimer e Parkinson (Rogoza *et al.*, 2005).

Além das acilpoliaminas, foi reportado o isolamento de bis-(agmatina)-oxamida da peçonha de *Plectreurys tristis* (Quistad *et al.*, 1993); toxinas nucleosídicas mono ou disulfatadas que agem em canais Ca^{2+} tipo 1 com efeito similar a toxina HF-6 da peçonha de *Hololena curta* (Taggi *et al.*, 2004); tetraidro- β -carbolinas (alcalóide)

isolado da aranha social *Parawixia bistrata* (Cesar *et al.*, 2005) e de *Nephila clavipes* (Marques *et al.*, 2005); esses componentes apresentam atividade inseticida, neurotóxica, convulsivante e são letais para ratos (Saidemberg *et al.*, 2009).

Recentemente, foi caracterizada uma dioxopiperidina da aranha *Phoneutria nigriventer*, a Nigriventrina (423.06 Da). Esse composto mostrou ser neuroativa em sete regiões cerebrais de rato e foi capaz de causar convulsão nos mesmos (Gomes *et al.*, 2010).

1.4. Peptídeos (1-10 kDa)

Foram descritos aproximadamente 200 peptídeos isolados de aranhas, no entanto apenas, 25% correspondem a peptídeos de aranhas caranguejeiras (Migalomorfos). Cerca de 30 peptídeos foram caracterizados de aranhas da família Theraphosidae. A maioria apresenta caráter básico, estrutura primária composta por 31 a 41 resíduos de aminoácidos estabilizada por três pontes dissulfeto e massa moleculares de 3500 a 4500 Da (Estrada *et al.*, 2007).

1.4.1. Peptídeos Citolíticos Lineares

Os peptídeos lineares são livres de pontes dissulfeto e exibem efeito citolítico interferindo no status fisiológicos do animal alvo, além de provavelmente responder pela maior parte da toxicidade de diversas peçonhas de aranhas (Estrada *et al.*, 2007). Estes podem ser subdivididos em: ricos nos resíduos de aminoácidos prolina, arginina e ocasionalmente, triptofano e os que podem adotar uma estrutura em α -hélice (Audreu & Rivas, 1998; Braff & Gallo, 2006).

Além de serem lineares, esses peptídeos são caracterizados por serem pequenos (< 50 a.a.), catiônicos com carga positiva relativamente alta, anfipáticos propensos a formação de estrutura em α -hélice e possuem afinidade pela bicamada lipídica (Kuhn-Nentwig, 2003). Essas características os tornam o maior grupo de peptídeos antimicrobianos e apresentam atividade, em concentrações micromolares, por meio da formação de poros na membrana do microorganismo. A interação do peptídeo com a membrana do microorganismo depende principalmente da distribuição de cargas do peptídeo e da composição de fosfolipídios da membrana celular (Erand & Vogel, 1999).

O primeiro peptídeo com atividade citolítica isolado da peçonha de aranhas foi identificado na peçonha de *Lycosa singoriensis* (Xu *et al.*, 1989). Mais tarde, dois peptídeos anfipáticos formadores de poros foram encontrados na peçonha da aranha *Lycosa carolinensis*, as Licotoxinas I e II (Yan & Adams, 1998).

Budnik e colaboradores (2004) acrescentaram ao grupo de peptídeos lineares outras duas toxinas de *L. singoriensis*, as Lycocitinas 1, 2 e 3. Esses peptídeos são homólogos as Licotoxinas e inibiram ação antibacteriana e antifúngica.

Foram isolados os peptídeos Cupienninas e Oxyopininas, identificadas em peçonha das aranhas *Cupiennus salei* e *Oxyopes kitabensis*, respectivamente (Villegas & Corzo, 2005). As Cupienninas e Oxyopininas possuem a porção N-terminal composta por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, enquanto que na porção C-terminal é constituído de resíduos mais polares. Essas características estruturais permitem às essas toxinas múltiplas atividades, uma vez que, além da atividade antimicrobiana, também apresentam atividade inseticida, promovendo o efluxo de íons de cálcio de sinaptossomos, e assim reduzindo o gradiente elétrico da membrana, por fim causam também a lise em eritrócitos (Corzo *et al.*, 2002; Haeberli *et al.*, 2000; Kuhn-Nentwig *et al.*, 2002).

Outra classe de peptídeos lineares são as laticinas (Ltc) (laticina 1, laticina 2a, laticina 3a, laticina 4a e laticina 5) isolados de *Lachesana tarabaevi* que demonstram atividade contra um amplo espectro de bactérias (Dubovskii *et al.*, 2006).

1.4.2. Peptídeos Neurotóxicos

Canais voltagem dependentes para sódio (Na^+_v), cálcio (Ca^{2+}_v) e potássio (K^+_v) são responsáveis por produzir sinais elétricos a partir da geração de potenciais de ação em neurônios e em outras células excitáveis (Catterall, 1995).

A estrutura do canal para Na^+_v é uma única proteína complexa formada por uma subunidade principal α (220–260 kDa) e duas subunidades β auxiliares (33–36 kDa). A subunidade principal é formada por dois domínios homólogos que contém seis segmentos transmembrânicos formando um poro (Figura 2A, 2B) (Catterall, 1995; Catterall *et al.*, 2007). Clonagem e sequenciamento demonstraram que a estrutura do canal para Ca^{2+}_v é homóloga ao canal para Na^+_v , com uma subunidade α associada a subunidades auxiliares $\alpha 2\delta$, β e γ . Assim como os canais para Na^+_v , a subunidade α do

canal para Ca^{2+}_v forma o poro. Enquanto que os canais para K^+_v são formados por quatro segmentos transmembrânicos homólogos a um único domínio da subunidade α dos canais para Na^+_v e Ca^{2+}_v (Figura 2A, 2B) (Catterall *et al.*, 2007).

As subunidades principais e auxiliares dos canais para Na^+_v , Ca^{2+}_v e K^+_v são elementos requeridos para condução, reconhecimento e seleção de íons (Catterall *et al.*, 2007). O mecanismo dos sensores de voltagem aparentemente é conservado nesses canais (Hille, 2001). Essa estrutura é alvo de neurotoxinas que modelam a sua funcionalidade e a conservação presente ao longo da evolução molecular dos canais iônicos provavelmente explica a similaridade do modo de ação dos peptídeos sobre as diferentes famílias de canais (Li-Smerin & Swartz, 1998; Swartz & MacKinnon, 1997; Winterfield & Swartz, 2000; Catterall *et al.*, 2007).

As toxinas de peçonha de aranhas com ação em canais iônicos consistem em uma cadeia única de polipeptídeo que contém de 3 a 6 cisteínas, que formam pontes dissulfeto intramoleculares (Figura 3). Esses peptídeos compartilham um motivo estrutural comum conhecido como *inhibitor cystine knot* (ICK) (Bosmans *et al.*, 2006; Sollod *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2000) (Figura 2C). Como consequência desse dobramento todos os peptídeos apresentam uma região hidrofóbica circundada por um único “cinto de cargas” na superfície de interação.

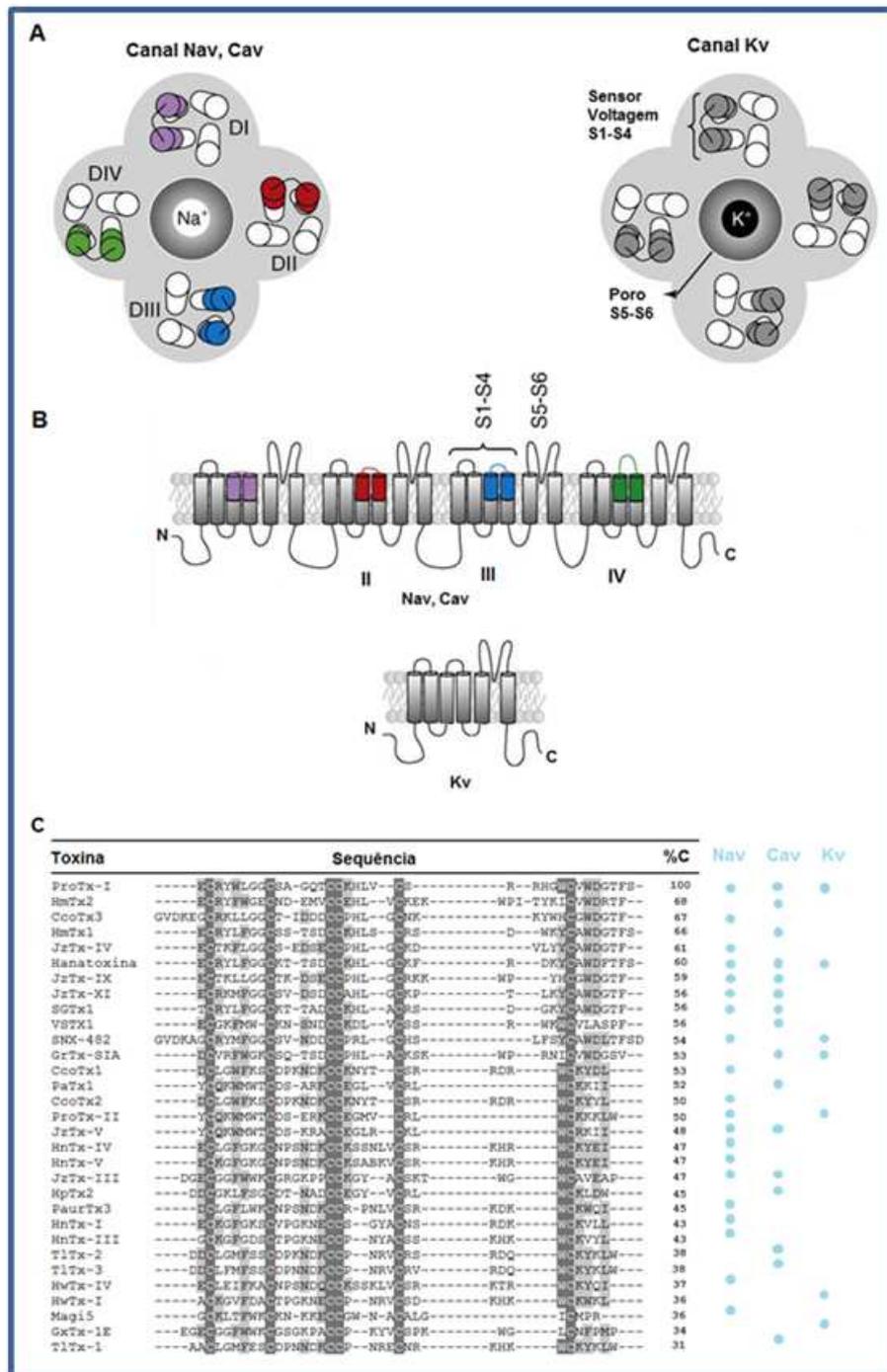


Figura 2. Toxinas de aranhas que atuam em canais iônicos voltagem dependentes. A. Esquema representativo exibindo uma visão do topo dos canais para Na⁺_v, Ca²⁺_v (esquerda) e K⁺_v (direita). O centro do poro é circundado pelos quatro sensores de voltagem de quatro domínios (I-IV). Nos canais para Na⁺_v e Ca²⁺_v, os “remos” não são idênticos, sendo identificados no esquema por cores diferenciadas. No canal para K⁺_v, esses “remos” são idênticos, portanto, estão representados pela mesma cor. **B.** Visão lateral dos canais para Na⁺_v, Ca²⁺_v (acima) e K⁺_v (abaixo) embebidos na bicamada lipídica. Nos canais para Na⁺_v e Ca²⁺_v cada domínio (I-IV) consiste em seis segmentos transmembrânicos (S1-S6) sendo que S1-S4 formam os sensores de voltagem e os segmentos S5-S6 de cada domínio, juntos formam o poro seletivo para Na⁺ e Ca²⁺, respectivamente. **C.** Alinhamento das estruturas primárias das toxinas de aranhas com três pontes dissulfeto e ação em canais para Na⁺_v, Ca²⁺_v e/ou K⁺_v (indicado por círculos azuis). %C (% resíduos conservados). Modificado de Bosmans & Swartz, (2010).

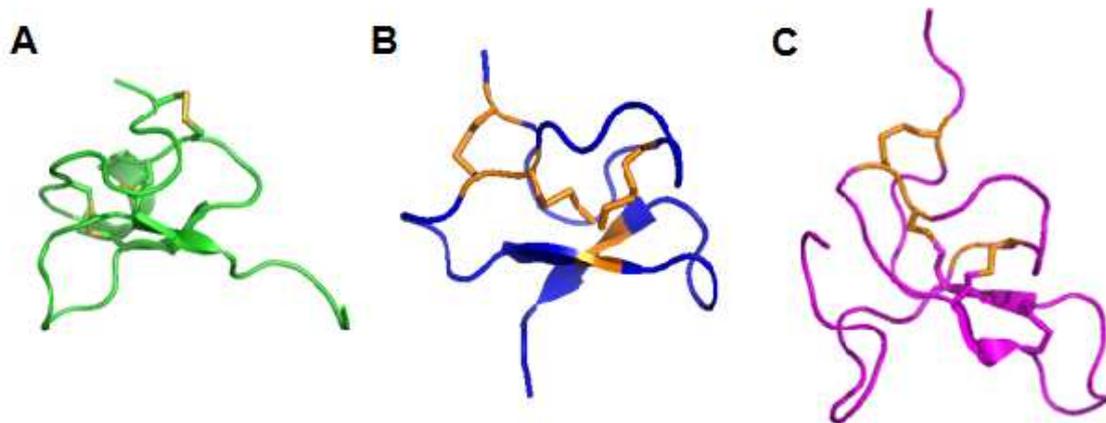


Figura 3. Representação esquemática das estruturas tridimensionais de neurotoxinas isoladas da peçonha de aranhas. A. Hanatoxina-1, atua em canais para K^+ (PDB 1D1H; Takahashi et al., 2000); B. Huwentoxina-IV, atua em canais para Na^+ (PDB 1MB6; Peng et al., 2002); C. ω -Agatoxina-IVA, atua em canais para Ca^{2+} (PDB 1OAV; Kim et al., 1995). As pontes dissulfeto estão representadas em laranja. Imagens obtidas com auxílio do programa Pymol.

As neurotoxinas de peçonha de aranhas podem ser classificadas em dois grupos de acordo com o seu mecanismo de ação: 1) Bloqueadoras de poro (inibição direta da condutividade do íon pela interação com a região receptora do canal iônico); 2) Moduladoras da ativação ou inativação (Vassilevski *et al.*, 2009).

1.4.2.1. Ação em canais para Ca^{2+}

A maioria das toxinas de aranhas bloqueadoras de canais para Ca^{2+}_v foi inicialmente encontrada na busca pela atividade inseticida ou por moduladores de funções sinápticas (Adams *et al.*, 2004; King *et al.*, 2002; Tedford *et al.*, 2004). No entanto, algumas dessas toxinas são consideradas promíscuas, uma vez que provocam efeito em canais para Ca^{2+}_v de vertebrados e invertebrados, tal como as ω -agatoxinas tipo IV (ω -AgaIV) (Adams *et al.*, 2004; Rash & Hodgson, 2002).

As ω -agatoxinas foram isoladas da peçonha da aranha *Agelenopsis aperta* e a ação inibitória é resultado da liberação de vários neurotransmissores. Esses polipeptídios antagonistas pré-sinápticos de canais para Ca^{2+}_v possuem massa molecular entre 5 e 10 kDa e sua classificação é baseada na similaridade estrutural e no espectro de atividade contra canais para Ca^{2+}_v de insetos e vertebrados. São conhecidas quatro famílias de ω -agatoxinas (tipos I-IV):

- Tipo I (ω -Aga IA, IB e IC) bloqueia a transmissão neuromuscular de insetos, mas não inibe os receptores para ω -conotoxina GVIA em membranas de sinaptossomos;
- Tipo II (ω -AgaII) bloqueia a transmissão neuromuscular de insetos e inibe os receptores para ω -conotoxina GVIA em membranas de sinaptossomos;
- Tipo III (ω -AgaIII) inibe os receptores para ω -conotoxina GVIA em membranas de sinaptossomos, mas não bloqueia transmissão neuromuscular de insetos;
- Tipo IV (ω -AgaIV) não são tóxicas nas junções neuromusculares, mas são as ω -agatoxinas melhores caracterizadas por serem potentes inibidores de canais para Ca^{2+}_v em neurônios centrais de insetos e bloqueadores de canais tipo P/Q (Ca^{2+}_v 2.1) de mamíferos (Adams *et al.*, 2004; Rash & Hodgson, 2002).

Interessantemente, em termos de neurotoxinas peptídicas, a peçonha *Phoneutria nigriventer* é composta basicamente por toxinas que atuam em uma variedade de subtipos de canais Ca^{2+}_v . A PnTx3-3 inibe a liberação de neurotransmissores através do bloqueio de canais P/Q e tipo-R. As ω -phonetoxinas IIA (PnTx3-4), as quais mostram estrutura primária com alta homologia a família III das ω -agatoxinas, bloqueiam canais para Ca^{2+}_v do tipo-N. Além disso, esses peptídeos também bloqueiam canais Ca^{2+}_v do tipo-L, assim como as toxinas Tx3-2 e Tx3-5 (Gomez *et al.*, 2002).

Outras toxinas também foram isoladas e caracterizadas de migalomorfa (ω -grammotoxina SIA de *Grammostola spatulata* e SNX482 de *Hysteroocrates gigas*) e aranhas de araneomorfos (SNX325 de *Segestria florentina*; DW13.3 de *Filistata hibernalis* e PLTX-II de *Plectreurys tristis*) (Lampe., 1999; Liang, 2004; Rash & Hodgson, 2002).

Foram descritos alguns bloqueadores seletivos de canais para Ca^{2+}_v de insetos na peçonha de aranhas “funnel web”. Estes peptídeos são neurotoxinas letais como a ω -ACTX-Hv1a, uma das mais potentes toxinas descobertas. A ω -ACTX-Hv1a se liga a canais para Ca^{2+}_v de ortópteros em concentrações nanomolares. Assim como a ω -ACTX-Hv2a, uma toxina seletiva de 45 resíduos inibidora de canais para Ca^{2+}_v de insetos, mas com uma estrutura 3D muito diferente (Rash & Hodgson, 2002).

1.4.2.2. Ação em canais para Na⁺

Os canais para Na⁺_v são um dos alvos mais comuns de moléculas presentes em venenos/peçonhas de animais (Mebs, 2002). Por essa razão, essas toxinas estão sendo usadas para descrição de receptores de sítios de canais para Na⁺_v. No entanto, estudos da interação de toxinas de aranhas com os canais para Na⁺_v de mamíferos foram iniciados recentemente (Bosmans & Swartz, 2010).

Diversas toxinas de aranhas modulam canais para sódio através da ligação nos sítios 3 e 4, no retardo da ativação ou causando uma mudança no potencial de ativação. Dentre essas estão as δ-toxinas das aranhas *Hadronyche*, *Atrax* spp. e *Missulena bradleyi* as quais são toxinas letais, responsáveis pela maior parte do envenenamento humano. Essa família de peptídeos possui 42 resíduos de aminoácidos e causam um prolongamento do potencial de ação durante o aparecimento do plâtor da potencialização. Essa ação de inativação lenta do canal para Na⁺_v também foram detectadas para as toxinas PnTx2-6 isoladas da peçonha da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* (Nicholson, 2006) e δ-palutoxins de *Pireneitega luctuosa* (Bosmans *et al.*, 2008; Corzo *et al.*, 2000).

Da peçonha de *Agelenopsis aperta* foi isolada a família de toxinas de canais para sódio, as μ-agatoxinas (μ-Aga-1 a μ-Aga-VI). As μ-agatoxinas possuem de 36 a 48 resíduos de aminoácidos, com oito cisteínas que formam quatro pontes dissulfeto, podendo ter ou não a porção C-terminal amidada. Essas toxinas induzem uma mudança em canais para Na⁺_v para potenciais mais negativos (Skinner *et al.*, 1989). Assim como as Curtatoxinas (Ct-I e Ct-II) da peçonha da aranha *Hololena curta*, os polipeptídeos (Tx1 e Tx2-9) da peçonha da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* e huwentoxinaIV de *H. schmidti*. No entanto, o mecanismo de ação ainda não está esclarecido (Stapleton *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992).

As toxinas moduladoras de canais para Na⁺_v de mamíferos melhores estudadas são as Protoxinas (ProTx-I e ProTx-II) de *Thrixopelma pruriens*. As Protoxinas interagem com regiões conservadas do domínio voltagem dependente de canais para Na⁺_v e interferem na sua ativação (Bosmans *et al.*, 2008; Middleton *et al.* 2002; Schmalhofer *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2007).

1.4.2.3 Ação em canais para K⁺

Os estudos de toxinas de peçonha de aranhas que atuam em canais para K⁺, estão em um contínuo avanço, onde toxinas como a hanatoxina de *Grammostola spatulata* tem sido usada como modelo na investigação das propriedades e funções desses canais (Swartz & MacKinnon, 1995; Escoubas *et al.*, 2002).

A hanatoxina (HaTx) é um peptídeo de 35 resíduos de aminoácidos de 4.1 kDa que foi isolado durante a procura por inibidores de canais K_v2.1. A HaTx mostrou efeito sobre canais K_v2.1 através da mudança do potencial da membrana para potenciais mais positivo inibindo a ativação do canal. No entanto, a seletividade da hanatoxina não é exclusiva para os canais K_v2.1, uma vez que inibe com similar afinidade canais K_v4.2. Por essa razão, a hanatoxina tem sido considerada o peptídeo neurotóxico modulador de canais para K⁺ mais bem estudada (Huang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Li-Smerin & Swartz, 1998, 2000, 2001; Lou *et al.*, 2002, 2003; Nishizawa & Nishizawa, 2006; Shiao *et al.*, 2003; Swartz & MacKinnon, 1995, 1997a, b; Takahashi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004).

Outras toxinas que tem como alvos os canais, K_v2 e K_v4 foram identificadas, tais como as stromatoxina (ScTx1) de *Stromatopelma calceata* e heteroscodratoxinas (HmTx1,2) de *Heteroscodra maculate* (Escoubas *et al.*, 2002).

Foi isolado da aranha *Scodra griseipes* uma toxina homóloga a HaTx, a SGTx1 que impede a inativação rápida de canais K_v2.1. Essas toxinas possuem um grupo de resíduos hidrofóbicos cercados por resíduos básicos (Marvin *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004). Também foi observado que a Guangxitoxina (GxTx1E) de *Plesiophrictus guangxiensis* se ligam à canais K_v2.1 com alta afinidade (Herrington *et al.*, 2006).

Por outro lado, algumas toxinas aparentemente são seletivas apenas para canais K_v4, como as heteropodatoxinas (HpTx1-3) de *Heteropoda venatoria* (Sanguinetti *et al.*, 1997; Zarayskiy *et al.*, 2005), as phrixotoxinas (PaTx1,2) de *Phrixotrichus auratus* (Diochot *et al.*, 1999) e TLTx1-3 da peçonha de *Theraphosa leblondi* (Ebbinghaus *et al.*, 2004).

A atividade de toxinas de canais para potássio não está restrita aos canais K_v2 e K_v4, como foi para VsTx1 isolada de *Grammostola spatulata* que se liga em canais K_vAP (Ruta *et al.*, 2003).

Além da classe de toxinas moduladoras de canais para potássio existem as bloqueadoras, tais como a huwentoxina-XI de *Haplopelma schmidtii* que possui estrutura com motivo Kunitz, um potente inibidor de tripsina (Yuan *et al.*, 2008).

A sequência de aminoácidos das toxinas com efeito em canal para K^+_v discutidas mostraram serem similares (82% a 30%) e todas possuem seis resíduos de cisteína, formando três pontes dissulfeto. Interessantemente, com exceção de HpTx1-3, todas essas toxinas foram isoladas da peçonha de aranhas caranguejeiras (Jiang *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005).

A ação dessas moléculas sob canais para potássio tem sido considerada uma ferramenta promissora no entendimento da complexa interação entre essa família de toxinas com os domínios sensíveis a voltagem (Herrington *et al.*, 2006).

1.5. Componentes Protéicos (> 10 kDa)

Diversos componentes de alta massa molecular são comumente encontrados em peçonha de aranhas, tais como: enzimas que apresentam um amplo espectro de atividades enzimáticas, proteínas transportadoras, regulatórias, e estruturais (Vassilevski *et al.*, 2009).

Estudos têm sido realizados para demonstrar a diversidade e caracterização de enzimas presentes em peçonha de aranhas (proteases, nucleases, lipases, fosfatases, glicosidases). Entre estas, as hialuronidases, são componentes frequentemente encontrados em peçonhas de aranhas (Devaraja *et al.*, 2008).

As hialuronidases são uma classe de glicosidases que degradam predominantemente ácido hialurônico (AH) presente na matriz extracelular de células de vertebrados, com habilidade limitada para a clivagem de condroitina e sulfato de condroitina (El-Safory *et al.*, 2010). As hialuronidases/AH estão envolvidas em processos fisiológicos tais como, migração celular, desenvolvimento embrionário e na fertilização e também estão associados a processos alérgicos, inflamatórios, artrite reumatóide e câncer (Laurent & Fraser, 1986; Kreil, 1995).

Além disso, as hialuronidases são consideradas facilitadoras da difusão de toxinas nas presas, uma vez que a degradação de matriz extracelular aumenta a

permeabilidade de tecidos conectores e diminui a viscosidade de fluidos corpóreos (Nagaraju, 2007; El-Safory *et al.*, 2010).

Foram descritas hialuronidases em peçonha de diversas espécies de aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles* e de aranhas caranguejeiras (Barbaro *et al.*, 2005; Da Silveira 2006; El-Safory *et al.*, 2010).

Inibidores da degradação de ácido hialurônico podem ser usados na redução do progresso de doenças, da difusão de peçonha e de bactérias patogênicas. Dessa forma, inibidores de hialuronidases são potentes agentes na regulação do catabolismo e anabolismo de AH. Além disso, esses inibidores podem ser usados como contraceptivo, devido o envolvimento que essas enzimas têm na fertilização (El-Safory *et al.*, 2010).

Existem outras aplicações de hialuronidases, tais como o uso de moléculas recombinantes para o desenvolvimento de ferramentas para fertilização *in vitro*, agentes anti-tumorais, antibacterianos e na inibição do espalhamento de toxinas (Kreil, 1995; Shuster *et al.*, 2002; Botzki *et al.*, 2004; Girisk & Kemparaju, 2007; Lampe *et al.*, 2007). Adicionalmente, moléculas recombinantes podem ser utilizadas na investigação do papel fisiológico e fisiopatológico de AH e hialuronidases nativas (Senff-Ribeiro *et al.*, 2008).

Outra classe de proteínas conhecidas de peçonha de aranhas são as fosfolipases D que catalisam a hidrólise de esfingomiélin de membrana celular, por essa razão eram chamadas de esfingomiélinases D. As fosfolipases D são encontradas nas aranhas do gênero *Loxosceles* e são consideradas as principais mediadoras da lesão dermonecrotica típica provocada pelo envenenamento por essas aranhas, o loxoscelismo cutâneo (Barbaro *et al.*, 2005; Lee & Lynch, 2005; Murakami *et al.*, 2005).

Na peçonha das aranhas conhecidas como “viúva-negra” do gênero *Latrodectus* é encontrada uma família de neurotoxinas de alta massa molecular (>100 kDa), as latrotoxinas, que exibem um efeito letal contra vários animais. Ensaio eletrofisiológicos mostraram que as latrotoxinas estimulam a liberação de neuromediadores de terminações nervosas com ação seletiva. Foram reportadas sete diferentes latrotoxinas da peçonha de *L. tredecimguttatus*: a α -latrotoxina que responde pelo efeito nas sinapses de vertebrados; as latroinsectotoxinas - LITs (α -, β -, γ -, δ - e ϵ -

LIT) são seletivas para insetos e a α -latrocrustoxina (α -LTC) com ação seletiva para crustáceos (Ushkaryov *et al.*, 2004).

Em resumo, os componentes protéicos da peçonha de aranhas desempenham várias funções como: efeito tóxico direto (necrotoxinas ou neurotoxinas) e “fator de espelhamento” (enzimas que destroem elementos teciduais) (Vassilevski *et al.*, 2009).

1.6. *Guyruita cerrado* (Guadanucci, 2007)

A família Theraphosidae está distribuída principalmente em áreas tropicais e semi-tropicais e apresentam uma grande diversidade ecológica, podendo ser encontrada em áreas secas e úmidas, savanas, desertos e habitats semi-temperados. A variedade de nichos ecológicos é devida à combinação do comportamento de predação com a diversidade da peçonha (Corzo & Escoubas, 2003). As theraphosas, conhecidas popularmente como tarântulas (caranguejeiras), formam a família de aranhas mais diversificada, com 116 gêneros, 900 espécies descritas e está dividida em 10 subfamílias (Platnick, 2010; Raven, 1985).

A subfamília Ischnocolinae compreende os terafosídeos de menor tamanho, podendo ter em média 15 mm de comprimento. Os ischnocolídeos são aranhas muito rápidas que se abrigam debaixo de troncos e pedras, possuem numerosos espinhos nas pernas, ausência de pelos urticantes, subtegulum estreito e bulbo copulador sem quilhas (Gerschman de Pikelin & Schiapelli, 1973). Essa subfamília compreende 13 gêneros, entre eles, *Guyruita* que possui três espécies: *G. atlantica*, *G. cerrado* e *G. waikoshiemi*.

A espécie *Guyruita cerrado* (Figura 4) foi descrita por Guadanucci e colaboradores (2007), é endêmica do Brasil e está distribuída nos estados do Pará, Piauí, Maranhão, Tocantins, Goiás e Distrito Federal.



Figura 4. Espécime de fêmea de *Guyruita cerrado*.

2. Justificativa

Embora exista cerca de 41000 espécies de aranhas descritas, um número ainda maior aguarda caracterização. Dentre essas apenas quatro grupos de aranhas são capazes de causar envenenamentos fatais em humanos ((Isbister & White, 2004; King, 2004; Platnick, 2010). Assim, diante da história das pesquisas de toxinas, não é surpreendente que a peçonha de aranhas tem recebido menos atenção comparada à peçonha de outros animais, devido ao seu impacto mínimo sobre a saúde humana.

Sendo assim, os primeiros estudos relacionados à peçonha de aranhas foram concentrados exclusivamente nas aranhas que representam relevância médica (*Latrodectus* spp., *Loxosceles* spp., *Atrax* e *Hadronyche*). O cenário da pesquisa de toxinas de aranhas mudou no final da década de 80 quando Adams e colaboradores demonstraram as propriedades farmacológicas inerentes às diferentes classes de agatoxinas isoladas da aranha *Agelenopsis aperta* (Adams, 2004; Escoubas *et al.*, 2006).

A partir disso, um número crescente de peçonhas de aranha tem sido explorado com o objetivo de elucidar a sua composição, mas principalmente como fontes de novos canais iônicos e ligantes do receptor (Escoubas *et al* , 2000; Corzo & Escoubas, 2003).

Adicionalmente, o estudo das neurotoxinas da peçonha de aranha pode fornecer subsídios para a construção de compostos ativadores e bloqueadores de canais iônicos com potenciais terapêuticos (Rash & Hodgson, 2002). Uma vez que, está cada vez mais evidente que a peçonha de aranha apresenta uma enorme diversidade de moléculas com amplas propriedades farmacológicas.

A investigação sistemática de moléculas bioativas propicia a compreensão de sistemas biológicos, avanços biotecnológicos, bem como atentam para a necessidade da conservação desses animais. O presente trabalho auxilia nas buscas por novos fármacos e na ampliação de pesquisa da biodiversidade de aranhas caranguejeiras do Cerrado brasileiro, uma vez que este é o primeiro estudo de caracterização da peçonha da aranha caranguejeira *Guyruita cerrado*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Caracterizar química e farmacologicamente componentes bioativos presentes na peçonha da aranha caranguejeira *Guyruita cerrado*.

3.2. Objetivos específicos

1. Isolar, purificar e identificar peptídeos e/ou proteínas presentes na peçonha da aranha caranguejeira *G. cerrado*;
2. Caracterizar quimicamente os peptídeos purificados por meio da determinação de suas estruturas primárias;
3. Comparar as estruturas primárias dos peptídeos identificados com outras estruturas depositadas em banco de dados;
4. Investigar a atividade biológica dos componentes moleculares isolados;
5. Realizar modelagem molecular das estruturas primárias dos peptídeos isolados.

4. Material e métodos

4.1. Obtenção da peçonha

Os espécimes de *Guyruita cerrado* (cerca de 200 fêmeas e 15 machos) sob licença do IBAMA (23424-2) foram coletados na Fazenda Nossa Senhora Aparecida, município de Monte Alegre – GO e mantidos em cativeiro, em caixas individuais no biotério do Laboratório de Toxinologia – UnB. Os animais foram regularmente alimentados, aproximadamente uma vez ao mês, com insetos.

A peçonha foi obtida por meio de estimulação elétrica (30 s) moderada de corrente contínua de 100 V, com baixa amperagem, na região basal das quelíceras. A peçonha foi coletada individualmente em água “Milli-Q” com o auxílio de tubos plásticos tipo *ependorf*, de acordo com Estrada *et al.*, 2007. Estas amostras foram imediatamente congeladas e liofilizadas.

4.2. Quantificação das amostras

A quantificação da peçonha bruta e das frações cromatográficas foi realizada medindo-se a absorbância em 280 nm, assumindo que uma unidade de absorbância em uma cubeta de quartzo de 1 cm equivale a 1 mg/mL de concentração protéica (Caliskan *et al.*, 2006).

4.3. Fracionamento da Peçonha Bruta

As amostras liofilizadas foram ressuspensas em uma solução de 0,1% de ácido trifluoracético (TFA), centrifugadas a 14000 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 Phenomenex Synergi 4μ Fusion-RP80 (0,46 x 250 mm). A eluição foi realizada com gradiente binário de solventes: A - Solução aquosa de TFA 0,12% e B - Solução de acetonitrila e TFA 0,1% (v/v) com fluxo de 1 mL/min. (Chen *et al.*, 2004). O gradiente teve início com 0% de B por 10 minutos; 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 e monitoradas em comprimentos de onda (216 e 280 nm) com coluna analítica C₁₈ Phenomenex Luna 3μ 100 A (4,6 mm x 150 mm). As frações manualmente coletadas foram liofilizadas.

4.4. Análises por Espectrometria de Massa e Sequenciamento De Novo

Espectrometria de Massa em sistema MALDI TOF/TOF UltraFlex III (Bruker Daltonics, Alemanha), operando no modo refletido ou no linear positivo, foram realizados para a inspeção de massas moleculares (MS) e para fragmentação das amostras de interesse (MS/MS). Para MALDI TOF as frações foram dissolvidas em uma matriz saturada de ácido α-cyano 4-hydroxicinâmico e para fragmentação diretamente na fonte MALDI (ISD) foi utilizada a matriz 1,5-diaminonaftaleno (1,5 DAN) ambas dissolvidas em acetonitrila/água/3% de ácido trifluoroacético (5:4:1).

Foi adicionada uma solução de matriz para ionização na proporção de 1/1 (v/v) à mistura de peptídeos antes da calibração. Para as análises em MALDI-ISD foi utilizado BSA (69,3 kDa) como calibrante.

Em alguns casos também foi utilizado o híbrido Waters SYNAPT G1 FDMS (High Definition Mass Spectrometry) o qual apresenta uma geometria do tipo ESI/MALDI-Quadrupolo-mobilidade iônica-TOF. Neste tipo de equipamento, pacotes de íons são lançados em uma câmara na qual são separados de acordo com sua mobilidade através de um gás inerte sob a influência de um campo elétrico fraco. Os dados foram adquiridos com a fonte de íons ESI operando em modo positivo, voltagem do capilar igual a 1,8 kV e tensão de cone igual a 35 V. A mobilidade iônica foi realizada em pressão de nitrogênio igual a 1 bar, velocidade da onda variando entre 300 a 450 m/s, e amplitude de onda com variação de 6 a 16 V. A aquisição dos dados e as análises foram realizadas com os programas MassLynx e DriftScope.

Com o objetivo de obter uma precisão maior nos valores de massa molecular dos íons de interesse (aproximadamente 0,5 ppm), análises foram realizadas em espectrômetro de massa MicroQTOF-Q II (Bruker Daltonics, Alemanha), operando em modo positivo.

O sequenciamento *de novo* foi realizado por meio de interpretação manual com o auxílio do software FlexAnalysis. Buscas por similaridade foram realizadas por meio dos programas Fasta3 sob o servidor Expasy (Expasy Molecular Biology server; <http://www.expasy.org>) e BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Outros programas como Clustal foram utilizados para o alinhamento das sequências e comparação das substituições de aminoácidos.

4.5. Redução e Alquilação

As frações purificadas por RP-HPLC foram reduzidas em 100 µL de tampão NH₄HCO₃ 100 mM, pH 8 adicionado com DTT 50 mM. As amostras foram incubadas sob agitação constante de 300 rpm durante 1 h a 37 °C. Para a alquilação foi adicionado iodoacetamida 50 mM em tampão NH₄HCO₃ 100 mM, pH 8. Em seguida, as amostras foram incubadas no escuro por 1 h a 70°C.

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

4.6. Hidrólise enzimática

Após redução e alquilação, os peptídeo purificado de interesse foram submetidos à hidrólise enzimática com tripsina imobilizada (Immobilized Trypsin, TPCK Treated, Pierce) em tampão de atividade (100 mM NH₄HCO₃ 50 mM, pH 8) incubadas a 37 °C (2 – 12h). A razão de enzima/substrato utilizada foi de 1:50 (v/v) em um volume final de 50 µL para obtenção de digestões parciais que pudessem auxiliar no sequenciamento do peptídeo. Alíquotas de 1 µL foram dissolvidas em matriz de ácido α-ciano 4-hidroxi-cinâmico e monitoradas em MALDI TOF e/ou MALDI micro Flex para estabelecer o tempo de hidrólise enzimática.

4.7. Degradação de Edman e Sequenciamento N-terminal

Após a determinação das massas moleculares e do grau de pureza, alguns peptídeos de interesse foram sequenciados automaticamente pelo método de degradação de Edman (realizado pela Dra. Isabel de Fátima Correia Batista, pesquisadora do Laboratório de Bioquímica e Biofísica – Instituto Butantan). A determinação da

estrutura primária por meio do sequenciamento automático do N-terminal de peptídeos foi realizada no sequenciador de aminoácidos PPSQ-21 (Shimadzu, Japão), conforme instruções do fabricante. O sistema cromatográfico foi calibrado previamente com PTH aminoácidos padrões antes de cada análise.

4.8. Ensaios Eletrofisiológicos

4.8.1. Isolamento de Cardiomiócitos

Cardiomiócitos ventriculares de camundongo (C57Bl/6J) foram enzimaticamente isolados como descrito em Shioya (2007) com algumas modificações. Resumidamente, os corações foram montados em um sistema Langendorff a uma pressão constante, perfundidos com uma solução tampão livre de cálcio (CIB) contendo (mM): 130 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 0,33 NaH₂PO₄, 22 glicose, 25 HEPES, e 0,4 EGTA (pH ajustado para 7,4 com NaOH) mantidos a 37 °C por 3 min.

Em seguida, os corações foram perfundidos por 5-7 min com CIB (sem EGTA) contendo 0,3 mM CaCl₂, 1 mg/mL colagenase tipo II, 0,06 mg/mL de protease tipo XXIII e 0,06 mg/mL de tripsina pancreática. Os corações foram removidos da cânula e os ventrículos foram separados, cortados em pequenos pedaços, submetidos a uma digestão adicional por 15 min a 37 °C com CIB suplementado com colagenase, tripsina e protease como descrito anteriormente e com CaCl₂ 0,7 mM.

As células isoladas foram filtradas (150 µm mesh), centrifugadas a 300 rpm por 3 min, ressuspensas e mantidas em solução CIB contendo 1,2 mM CaCl₂ e 2 mg/mL albumina sérica bovina (BSA) por 5 min a 37°C. Finalmente, as células foram centrifugadas novamente (300 rpm por 3 min), ressuspensas e armazenadas em solução Tyrode's com 1% de penicilina/estreptomicina e BSA 2 mg/mL contendo (mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 0,33 NaH₂PO₄, 11 glicose, 5 HEPES e 1,8 CaCl₂ (pH ajustado para 7,4 com NaOH). Apenas os miócitos tolerantes a cálcio, quiescentes, com forma arredondada mostrando estrias evidentes foram utilizados. Os miócitos cardíacos isolados foram usados no prazo de 3-5 horas após o isolamento enzimático.

4.8.2. Experimentos em *Whole-cell Patch-Clamp*

Registros eletrofisiológicos de *Whole-cell voltage-clamp* foram obtidos a temperatura ambiente (22 - 25 °C) em amplificador EPC-9.2 patch clamp (HEKA

Electronics, Rheinland-Pfalz, Germany) como previamente descrito por (Oliveira *et al.*, 2007). Em seguida, as soluções de equilíbrio da pipeta foram igualadas com o interior da célula de 3 a 5 minutos. A resistência dos eletrodos estava entre 0.5 a 1.5 M Ω . As correntes de potássio foram registradas com filtro (2.9 kHz) e digitalizadas a 10 kHz. Para as análises, foram utilizados os miócitos que mostraram uma resistência em série (R_s) menor do que 6 M Ω e a compensação da R_s foi de 40%. As pipetas foram preenchidas com solução interna contendo (mM): 20 KCl, 130 KOH, 130 aspartato, 2 MgCl₂, 5 NaCl, 10 HEPES, 5 EGTA (pH ajustado para 7,2 com KOH). Para a mensuração das correntes de potássio foi usado uma solução externa contendo (mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 0,33 NaH₂PO₄, 11 glicose, 5 HEPES, 1.8 CaCl₂. Nifedipina (10 μ M) e tetrodotoxina (10 μ M) foram adicionadas a solução externa para suprimir as correntes de cálcio e sódio, respectivamente.

4.8.3. Protocolo Experimental

Para análise do efeito de 3 μ M de GcTx1, GcTx2 e GcTx3 sobre canais para potássio presentes em miócitos, foram utilizados dois protocolos experimentais: no primeiro, a corrente de potássio (I_K) foi medida a cada 10 s pelos pulsos de despolarização para +60 mV/s de um potencial de repouso anterior de -80 mV, durante e depois da lavagem dos peptídeos. Nesse caso, foram mensuradas as correntes transientes de saída K⁺ (I_{to}) quando o pulso começava e a corrente no estado estável (I_{kss}) até o fim do pulso (duração de 800 ms). No segundo protocolo, foi realizada a análise do efeito dos peptídeos sobre a corrente de potássio versus a relação de voltagem usando rampas de voltagem (120 mV/s), onde as membranas celulares foram mantidas a -80 mV, despolarizadas para +60 mV e em seguida repolarizadas para -120 mV por 1.5 s.

4.8.4. Análise Estatística

Todos os dados foram expressos com significância \pm DP e os números das células estão mostrados como n. As diferenças entre os grupos foi determinada por teste t Student pareado unilateral. Os valores de probabilidade $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram analisados usando Origin (Origin Lab, Northampton, MA, USA) ou Sigmaplot (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

4.9. Construção do Modelo Molecular

A modelagem molecular dos peptídeos (GcTx2 e 3) foi realizada submetendo as sequências (GcTx2: **GCRWMFGACKTTADCCCKALACIGTCVWDGTYG** e GcTx3: **GCRWMFGACKTTADCCCKALACIGTCVWDGTYGN**) no BioInfo Meta Server26 (Ginalski *et al.*, 2003) para obtenção de um molde com homologia para estruturas primárias dos peptídeos. Foi escolhida, a partir dos resultados do algoritmo FFAS03, a estrutura da hanatoxina 1 de *Grammostola rosea* (PDB 1D1H) com um escore de -14300 para GcTx2 e -11900 para GcTx3, indicando uma boa homologia estrutural entre a sequência e o molde. FFAS0327 é um método de alinhamento de sequências que utiliza um perfil algoritmo que fornece escores de menores e maiores identidades de sequências. Escores menores do que 9.5 indicam menos do que 3% de falsos positivos. (Jaroszewski *et al.*, 2005). Os modelos tridimensionais de GcTx2 e 3 foram obtidos por transferência das coordenadas atômicas da estrutura consenso de RMN da hanatoxina para as sequências de GcTx2 e 3 satisfazendo as restrições espaciais usando o Programa Modeller. As estruturas dos modelos foram checadas usando o VADAR web Server (Leigh *et al.*, 2003). Os modelos finais foram visualizados e manipulados usando o software Pymol (0.99 rc6) (DeLano, 2002).

4.10. Zimograma: Hialuronidase

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

Foi adicionado ao gel SDS-PAGE 0,14% de ácido hialurônico como substrato para atividade enzimática, utilizando com modificações o método de Miura e colaboradores (1995). O gel foi lavado com água destilada para remover o excesso de Triton X-100 e incubado em tampão de atividade contendo Tris-HCl 20 mM pH 7.4

com 0,5 mM de CaCl_2 por 16 h a 37°C sob constante agitação e em seguida corado com 0,5% de Alcian Blue em 25% de metanol e 10% de ácido acético. A digestão do ácido hialurônico foi identificada como zonas claras contra o fundo corado em azul.

5. Resultados

5.1. Fracionamento da Peçonha e Análise por Espectrometria de Massa

O fracionamento da peçonha bruta de *Guyruita cerrado* em sistema RP-HPLC resultou em perfis cromatográficos com significativa reprodutibilidade e a eluição de 38 frações cromatográficas. As frações em destaque representam os componentes selecionados para recromatografia, com exceção das frações Gc 34 e Gc 35 que não necessitaram de passos cromatográficos subsequentes, uma vez que já se encontravam em estado de pureza satisfatório (Figura 5).

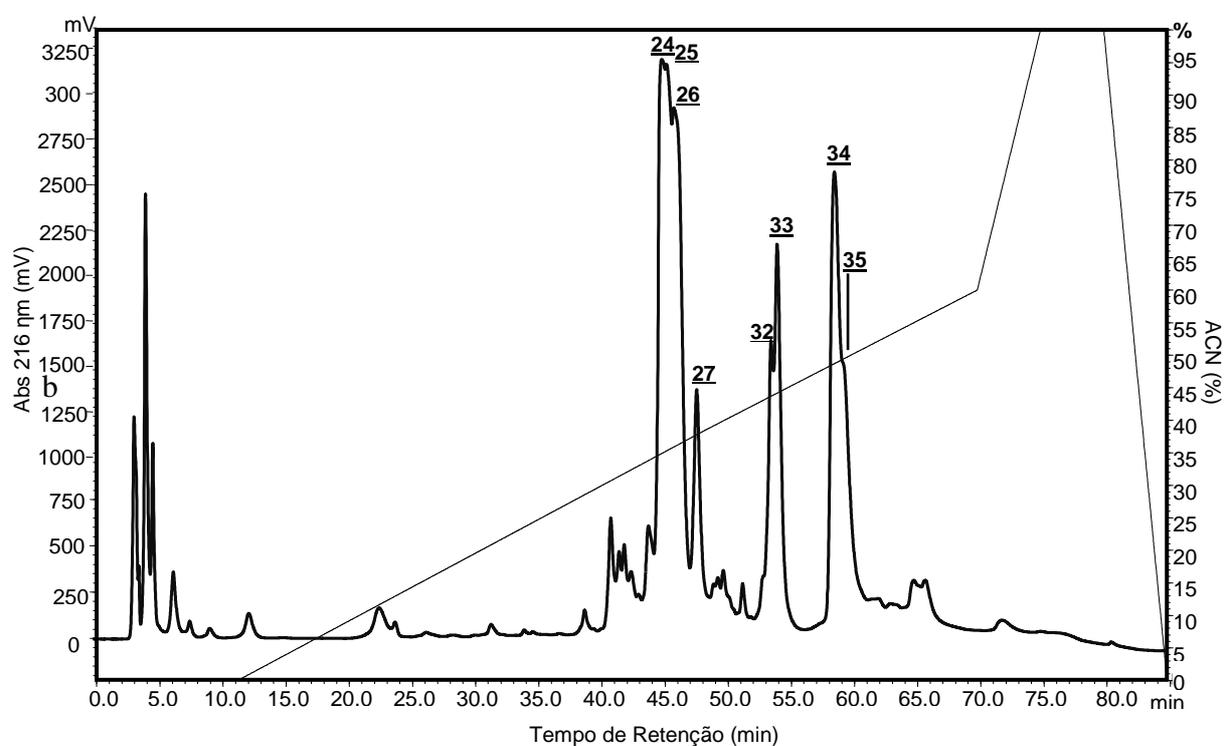


Figura 5. Perfil cromatográfico do fracionamento da peçonha de *Guyruita cerrado*. Fracionamento em coluna C₁₈ Phenomenex (0,46 x 250 mm) em sistema RP-HPLC. O monitoramento das frações foi em 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. As frações destacadas foram selecionadas para caracterização bioquímica.

As frações obtidas a partir do fracionamento da peçonha bruta de fêmea de *G. cerrado* foram analisadas em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF na faixa de m/z 500 a 10000 Da. Os 132 componentes de massas moleculares detectados $[M + H]^+$ estão classificados por faixa e representados na tabela 1.

Tabela 1. Massas moleculares detectadas no fracionamento da peçonha bruta de fêmea de *G. cerrado*. Dados obtidos a partir de análise em espectrometria de massa (MALDI-TOF), nos modos refletido e linear com intervalo de faixa de 500 a 20000 *m/z*. As massas moleculares em negrito indicam exclusividade para a peçonha de fêmea.

Fração	Massa molecular <i>m/z</i>
1-12	ND
13	587.024 602.050 1762.923 1777.897 2008.718 2164.829
14	1019.494 1979.684 2886.272 2901.212 2916.243 2944.267 2978.151 2979.165
15	1738.599 2311.895 2929.325 2944.329
16	2481.946 2723.075 4064.780 4079.845
17	602.048 2332.941 2424.965 2647.081 3274.259 3777.577 3867.994 3926.962 4064.822 4079.882 4118.225 4133.350 5134.022
18	1171.564 1203.604 2422.936 2549.022 3173.233 3481.523 3777.622 4079.929
19	ND
20	2789.106 2947.609 2959.272 3339.592 3369.576 3531.549 3534.547 3540.312 3592.637 3867.615 3884.874 3925.598 4010.896 4087.904 4100.896 4117.678 4133.111 4165.050 5520.380
21	1934.26 3533.46 3739.51 3851.58 3867.66 3926.72 4132.97
22	3009.197 3283.503 3425.392 3724.534 3739.566 3766.548 3798.563 3867.654 3911.675 3926.701 3943.637
23	2696.564 3040.238 3696.564 3740.238 3750.516 3766.494 3770.471 3798.455 3832.468 3850.558 3867.568 3909.513 3926.534 3983.724 4004.921 4023.840 4043.745 4058.952 4073.161 4133.006 5046.000 5554.334
24	3040.267 3696.604 3740.583 3816.448 3831.506 3926.592 3970.641 4007.823 4024.816 4898.876 5044.802
25	3780.488 3795.589 3839.574 3867.547 3926.484 3952.654 3971.541 4008.677 4023.779 4039.791 4809.869 4851.887 4884.978 4898.785 4956.989 5044.802 5952.113
26	3892.86 3907.95 3936.89 3952.06 4958.04 4999.05 5046.23
27	2522.64 3892.79 3907.80 3951.85 4959.88 4998.16 5045.07 8914.684
28	2478.63 2499.67 2522.64 3891.77 3907.79 3951.83 4956.93 4999.12 5029.95 5045.02
29	3025.47 3169.57 4160.25 4958.46
30	3169.31 3186.38 4084.81 4159.89
31	2351.89 2784.99 3039.10 3169.21 3187.27 4084.63
32	3006.437 3042.893 3135.623 3150.23 3165.529 3313.36 3385.70 3901.74
33	3474.347 3499.90 3683.630 3909.611 4084.801 4318.971 4374.071 4733.241 4748.423 4958.012
34	3150.23 3234.51 3250.47 3737.50 3754.52
35	3150.23 3165.25 3313.36 3367.29 3385.70 3401.39 3417.34
36	ND
37	ND
38	ND

ND – não detectado.

O perfil cromatográfico do fracionamento da peçonha bruta de macho de *Guyruita cerrado* em sistema RP-HPLC resultou em 28 frações cromatográficas, revelando a eluição de 7 frações a menos em relação ao fracionamento da peçonha de fêmea (Figura 6).

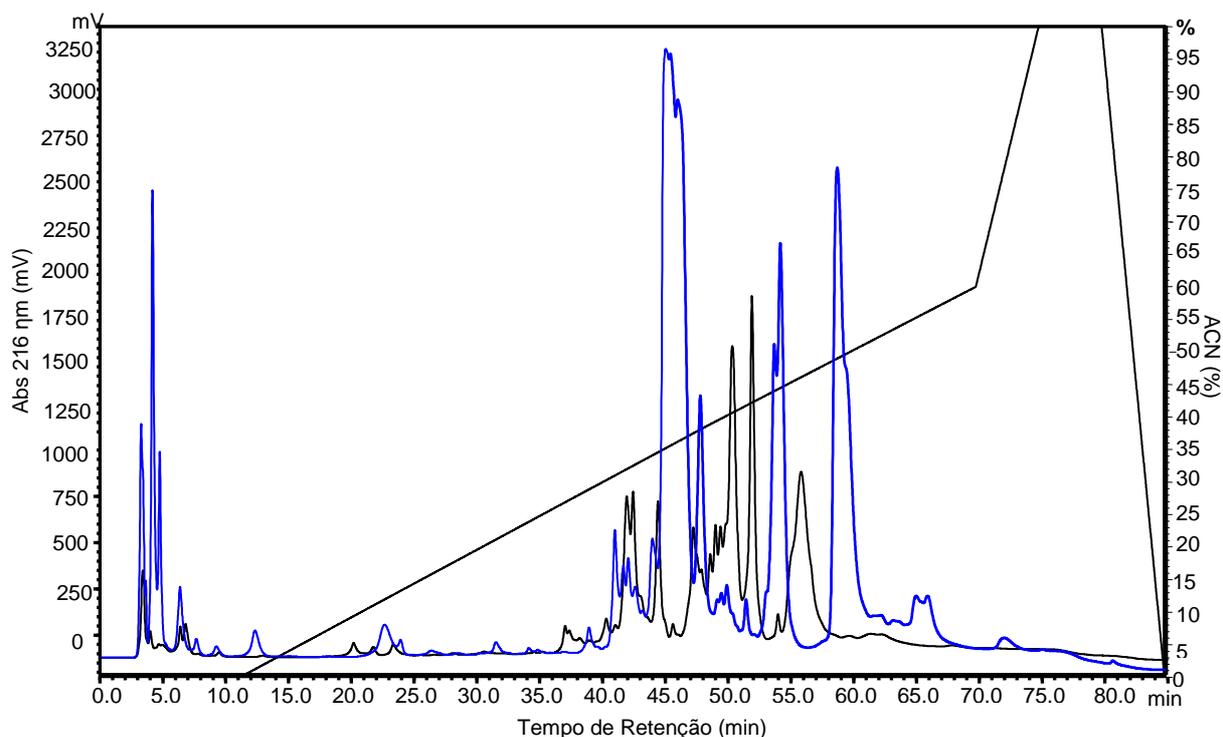


Figura 6. Comparação dos perfis cromatográficos da peçonha bruta de fêmea (azul) e macho (preto) de *Guyruita cerrado*. Fracionamento em coluna C₁₈ Phenomenex (0,46 x 250 mm) em sistema RP-HPLC. O monitoramento das frações foi em 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min.

Além disso, foi observado através da detecção das massas moleculares em espectrômetro de massa que existem componentes de massa que diferem entre os gêneros de *G. cerrado*, sendo possível destacar massas moleculares encontradas apenas nas frações cromatográficas da peçonha de macho (Tabela 2).

Tabela 2. Massas moleculares detectadas no fracionamento da peçonha bruta de macho de *G. cerrado*. Dados obtidos a partir de análise em espectrometria de massa (MALDI-TOF), nos modos refletido e linear com intervalo de faixa de 500 a 20000 m/z . As massas moleculares em negrito indicam exclusividade para a peçonha de macho.

Fração	Massa molecular m/z
1	1313.636
2	1313.636 1154.194 1476.476
3	1313.636
4	1313.636 3412.954
5	1313.636
6	4399.120
7	2164.310 3767.310 4397.860
8	3742.435
9	3835.354
10	3466.280 3481.296 4847.672 4915.650
11	3893.175 3908.885 3937.084 3952.866
12	4959.440
13	3354.148 3369.023 3397.987 3413.018 4888.438 4954.816
14	ND
15	3333.192 3662.501 3677.391 3709.386
16	3466.683 3481.648
17	2607.870 3313.381 3724.832
18	ND
19	1706.888 3397.874 3724.873
20	3313.880 3377.957 3397.940 3412.936 3480.232 3716.062
21	2480.536 3313.937 3383.870 3423.023 3716.415
22	ND
23	3313.048 3480.440 3716.396
24	3499.900 4241.042
25	3313.937 3385.870 3499.900
26	ND
27	3243.708
28	3313.937 3499.900 3803.330

ND – não detectado.

A partir das análises em RP-HPLC e espectrometria de massa foi possível observar que existem diferenças qualitativas e quantitativas entre os componentes moleculares de macho e fêmea de *G. cerrado*.

Foi observado que a frequência de íons (m/z) variando entre 500 e 6000 Da foi maior entre 35 e 45 minutos, cerca de 25 a 35% de acetonitrila (TFA 0,1%) (Figura 7).

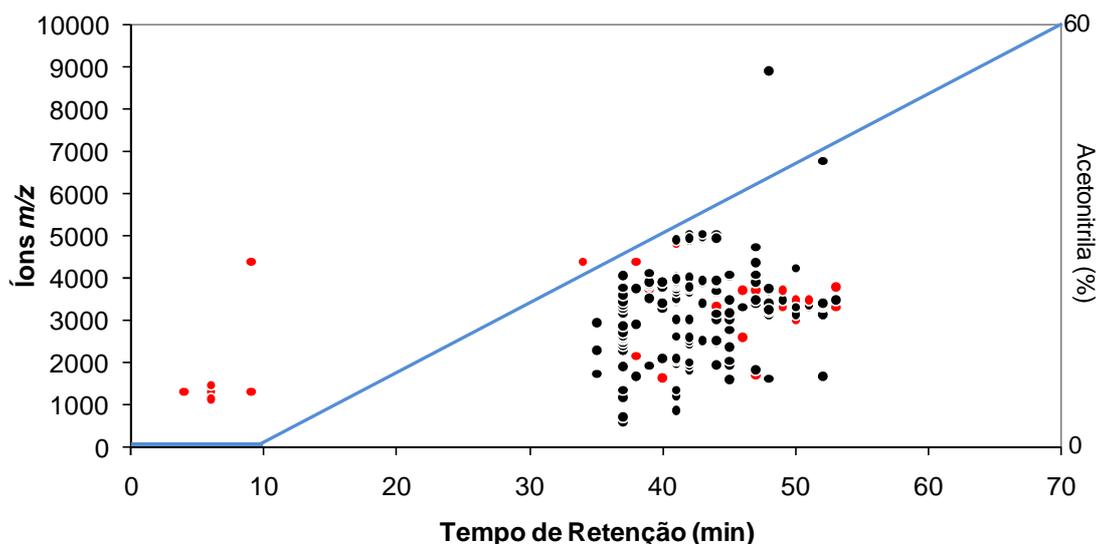


Figura 7. Frequência de íons (m/z) detectados nas frações cromatográficas da peçonha de *Guyruita cerrado* por tempo de retenção (min.). Frações de fêmea estão representadas por círculos pretos e frações de macho representadas por círculos vermelhos. A linha azul representa o gradiente de acetonitrila.

As análises seguintes foram realizadas apenas para as frações resultantes do perfil cromatográfico de fêmea de *Guyruita cerrado*.

5.2. Caracterização Química e Farmacológica

5.2.1. Caracterização Química Parcial da Fração Gc24/25

A recromatografia com o gradiente de acetonitrila otimizado resultou em três frações cromatográficas (Gc24/25.1, Gc24/25.2 e Gc24/25.3) (Figura 8A). As três frações foram novamente cromatografadas, no entanto, apenas o componente principal da Gc24/25.2 foi efetivamente isolado (Figura 8B).

A análise em sistema MALDI/TOF MS confirmou o bom grau de pureza da fração Gc24/25.2 a qual apresentou o íon com massa molecular igual a 5044.802 m/z (Figura 8C).

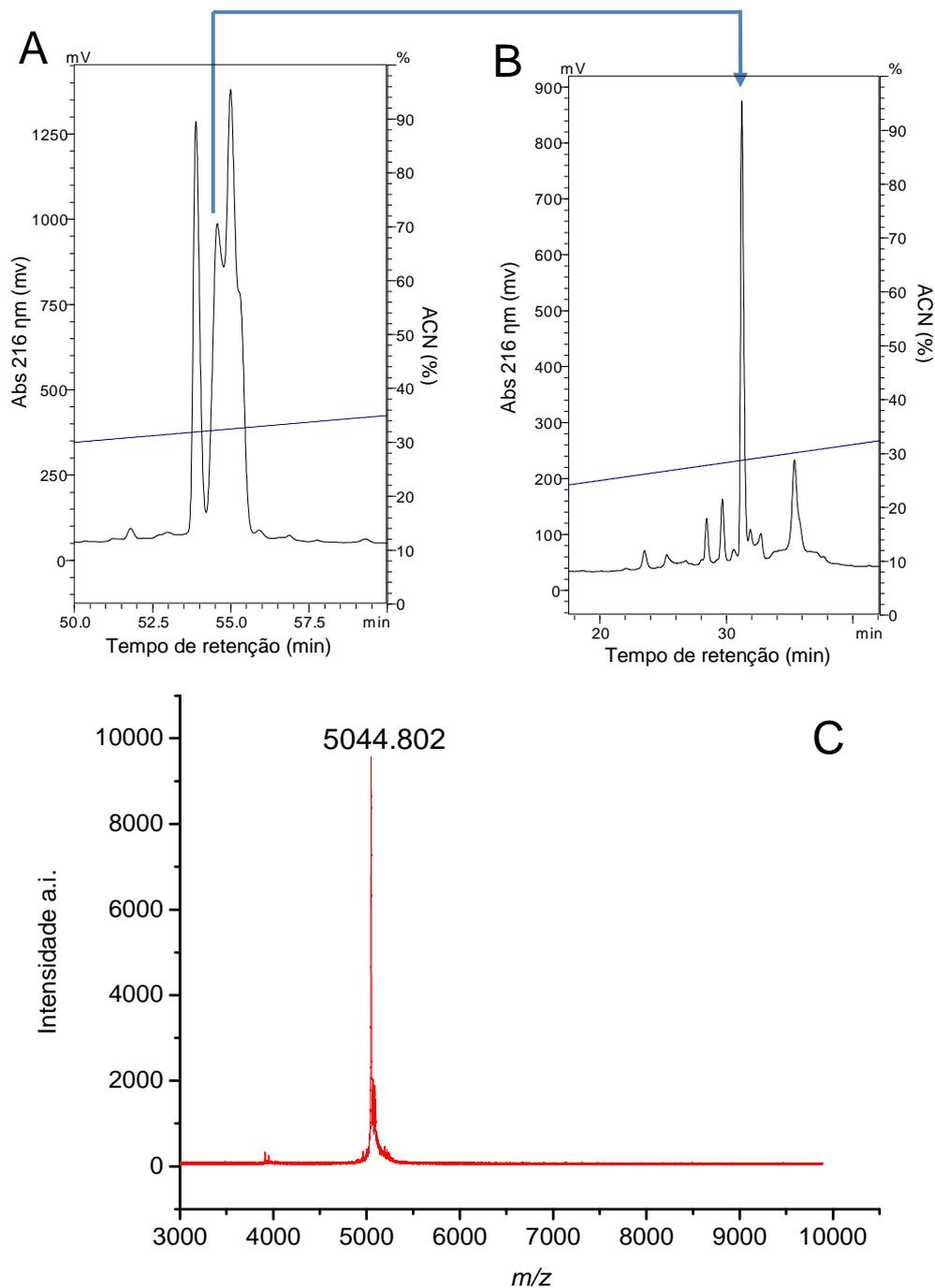


Figura 8. Recromatografia da fração Gc24/25. (A) A recromatografia da fração Gc24/25 em sistema RP-HPLC em coluna analítica C₁₈ Phenomenex Luna 5u 100 A (4,6 mm x 150 mm) e gradiente de acetonitrila resultou em três frações distintas chamadas de Gc24/25.1; Gc24/25.2 e Gc24/25.3. (B) Purificação da fração Gc24/25.2, identificada pela seta. (C) Espectrograma de massa do peptídeo Gc24/25.2. Massa molecular detectada em sistema MALDI TOF/TOF MS.

A sequência primária dos componentes isolados da peçonha de *Guyruita cerrado* foi determinada através da combinação de sequenciamento por degradação de Edman e técnicas associadas à espectrometria de massa: (1) fragmentação diretamente na fonte (MALDI-ISD) sem a necessidade de nenhum tratamento prévio especial, apenas o uso da matriz 1,5- diaminonaftaleno (1,5-DAN) e (2) a fragmentação pós-fonte (MALDI microFlex-PSD) através do método FAST (**F**ragmentation **A**nalysis and **S**trutural TOF).

O sequenciamento parcial por MALDI-ISD permitiu a obtenção de 22 resíduos de aminoácidos do peptídeo Gc24/25.2 o qual apresentou massa molecular igual a 5044.802 Da: **GFSKGGEKSCKGKEKKCGDF** (Figura 9).

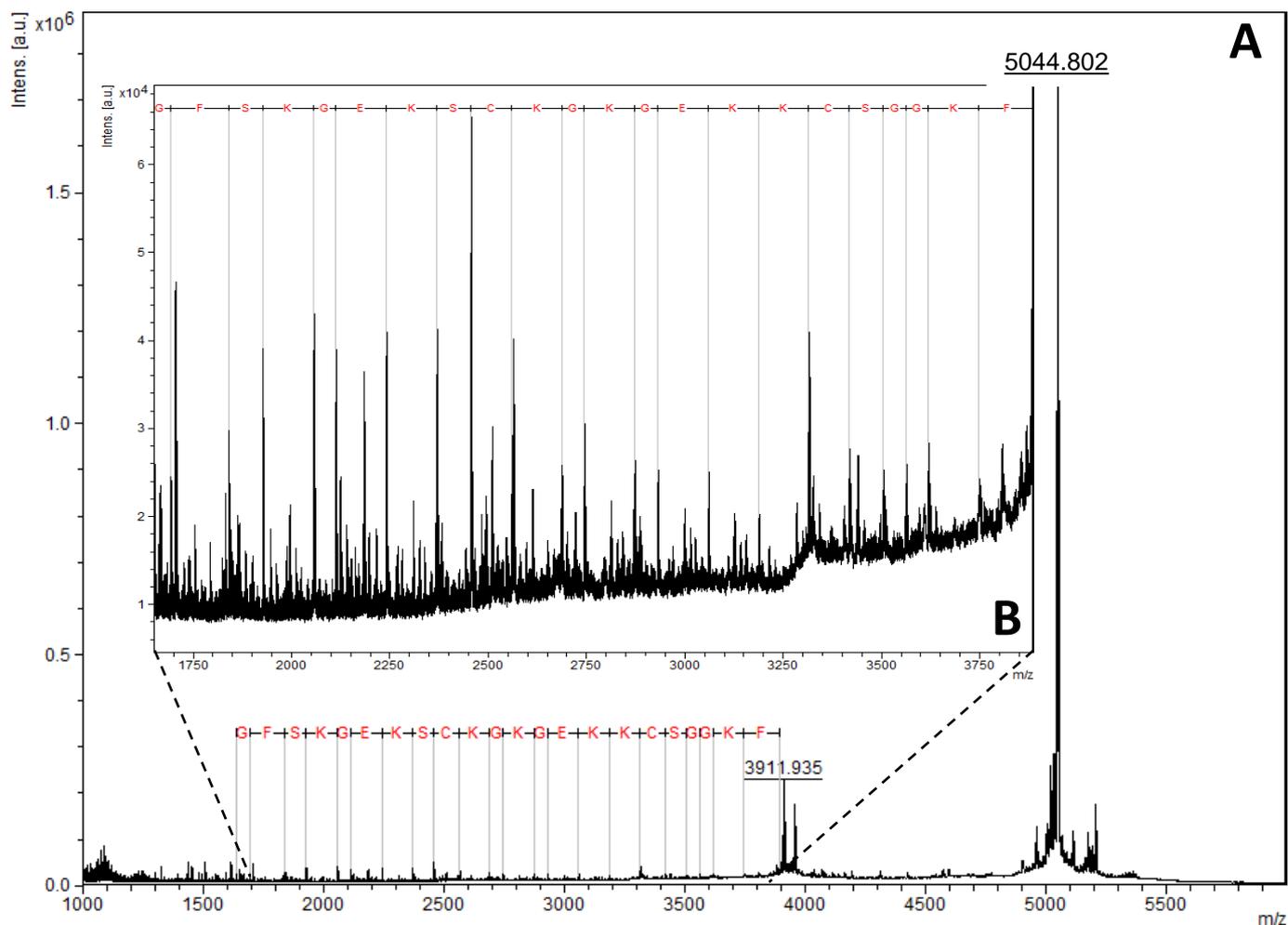


Figura 9. Sequenciamento parcial *de novo* de Gc24/25.2 por MALDI-MS/MS. (A) Sequenciamento do precursor $[M+H]^+$ 5044.802. Série c está assinalada no topo. Íons não assinalados constituem série b e fragmentos internos. (B) Detalhe dos íons gerados a partir da fragmentação na fonte do precursor $[M+H]^+$ 5044.802.

A busca por similaridades em bancos de dados e posterior alinhamento mostraram que a sequência parcial obtida do componente Gc24/25.2 apresenta similaridade 60 a 65% com toxinas inseticidas isoladas de aranhas caranguejeiras (Figura 10).

Toxina	Sequência	a.a	I%
Gc24.2	GFS----KGEKSCCKGKGEKKCSGG-----KF---	22	
Ba1b	IFECVFSCDIKKEGKPKPKGEKKCTGGWRCKIKLCLKI	39	60
Ba1a	I L E C V F S C D I K K E G K P C K P K G E K K C T G G W R C K I K L C L K I	39	60
Bs1a	IFECVFSCDIEKEGKPKPKGEKKCSGGWKCKIKLCLKI	39	65
Asp1b	IFECVFSCDIEKEGKPKPKGEKKCSGGWKCKIKLCLKI	39	65
Asp1a	IFECVFSCDIEKEGKPKPKGEKKCTGGWKCKIKLCLKI	39	60
JZTX-47	IFECVFSCDIKKNGKPKGAGEKKCSGGWRCKMNFVKV	39	65
JZTX-47.2	IFECVFSCDIKKNGKPKGAGEKKCSGGWRCKMNFVKV	39	65
JZTX-8.2	LFECVFSCDIKKNGKPKGSGEKKCSGGWRCKMNFVKV	44	65
JZTX-8	LFECVFSCDIKKNGKPKGSGEKKCSGGWRCKMNFVKV	44	65

: : * * * * * : * : * * * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * .

Figura 10. Alinhamento da sequência parcial de Gc24.2 realizado por meio do programa ClustalW. (Thompson *et al.*, 1994). Ba1b e Ba1a (*Brachypelma ruhnaui*; Corzo *et al.*, 2008); Bs1a (*Brachypelma smithii*; Kaiser *et al.*, 1994); Asp1a e Asp1b (*Eurypelma californicum*; Savel-Niemann, 1989); JZTX-47; JZTX-47.2; JZTX-8; JZTX-8.2 (*Chilobrachys jingzhao*; Liao *et al.*, 2007). “*”: resíduos idênticos, “.”: substituição conservativa, “:”: substituição semi-conservativa.

5.2.2. Purificação da Fração Gc27

A recromatografia da fração Gc27 resultou em dois componentes de massa molecular igual a 4959.888 e 8914.684 *m/z*, chamados de Gc27.1 e Gc27.2, respectivamente (Figura 11A). Nas análises realizadas em sistema MALDI TOF/TOF foi possível observar que o peptídeo Gc27.1 (4959.888 *m/z*) apresenta um maior grau de pureza em relação ao peptídeo Gc27.2 (Figura 11B).

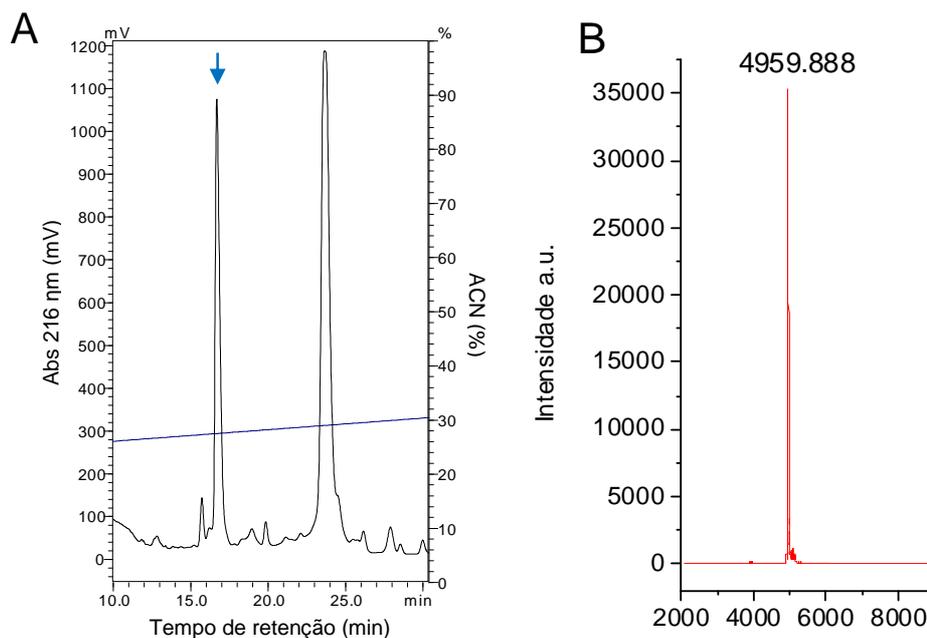


Figura 11. Purificação do peptídeo GC27_1. (A) Recromatografia da fração Gc27.1 (indicada pela seta) em sistema RP-HPLC em coluna analítica C₁₈ Phenomenex Luna 5u 100 A (4,6 mm x 150 mm) e gradiente de acetonitrila. (B) Espectrograma de massa da fração Gc27.1. Massa molecular obtida por sistema MALDI TOF/TOF MS.

5.2.3. Caracterização Química e Farmacológica das Frações Gc32 e Gc33

A recromatografia da fração GC32 resultou em três distintas frações cromatográficas chamadas de Gc32.1; Gc32.2 e Gc32.3 (Figura 12). Um novo passo cromatográfico com gradiente de acetonitrila otimizado foi necessário para a purificação dessas frações (Figura 12).

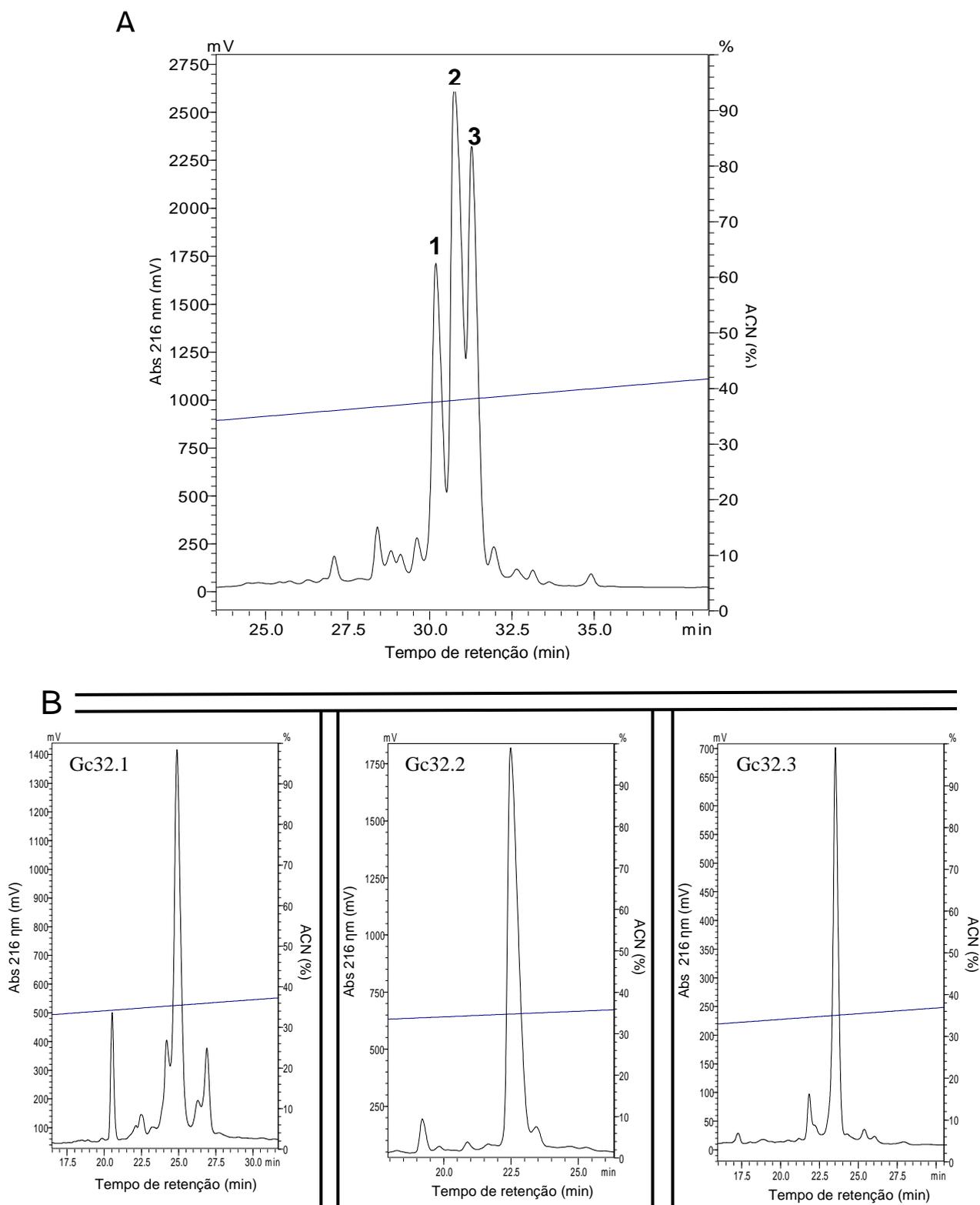


Figura 12. Recromatografia da fração GC32. (A) A recromatografia da fração GC32 em sistema RP-HPLC em coluna analítica C_{18} Phenomenex Luna 5u 100 A (4,6 mm x 150 mm) e gradiente de acetonitrila resultou em três frações distintas. (B) As três frações foram novamente cromatografadas em sistema RP-HPLC em coluna analítica C_{18} Phenomenex Luna 5u 100 A (4,6 mm x 150 mm) e gradiente de acetonitrila resultando nas frações Gc32.1; Gc32.2 e Gc32.3.

O grau de pureza dos componentes isolados a partir da recromatografia da fração Gc32 foi observado utilizando espectrometria de massa (MALDI TOF/TOF MS). Além disso, foram determinadas as massas moleculares das frações Gc32.1 (3150.230 Da); Gc32.2 (3313.364 Da) e Gc32.3 (3385.700 Da) com um maior grau de precisão (aproximadamente 0,5 ppm) por meio de análises realizadas no MicroQTOF-Q II (Figura 13 A, B e C).

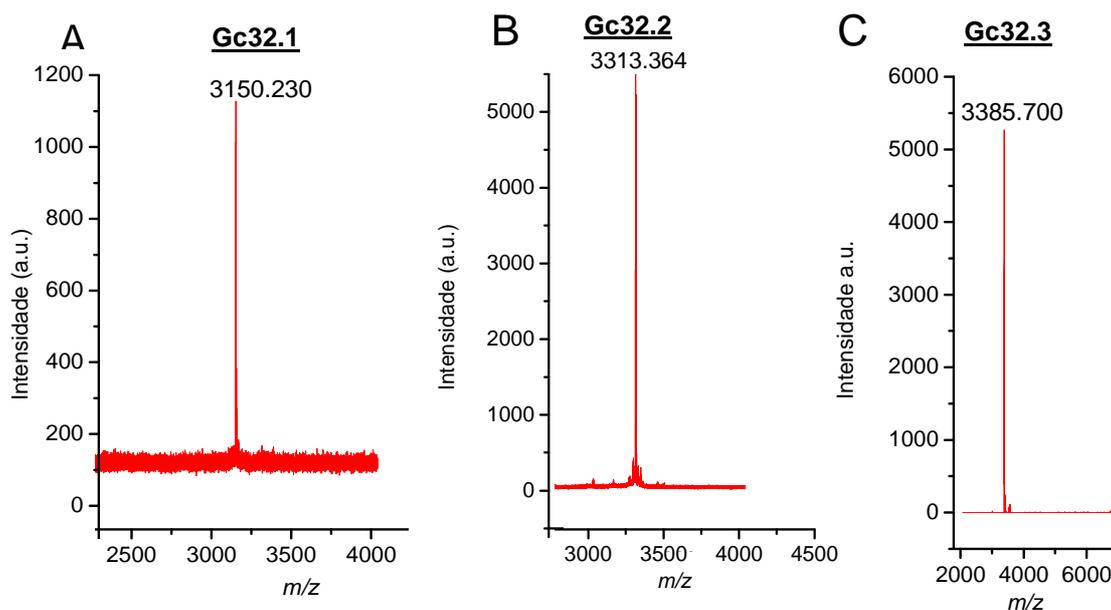


Figura 13. Espectrogramas de massa molecular das frações recromatografadas de Gc32 detectadas em sistema MicroQTOF-Q II. (A) Massa molecular de Gc32.1. (B) Massa molécula de Gc32.2. (C) Massa molecular de Gc32.3.

Adicionalmente, foi realizada uma análise da mobilidade gasosa do peptídeo Gc32.1 na qual foi possível verificar a ocorrência de uma provável dimerização deste. Como pode ser observado na figura 13, a mobilidade do íon 3150.23 Da, representado pelo valor de sua dupla carga de 1575.709 apresenta um perfil que sugere duas conformações. Analisando o íon que apresenta apenas a conformação menos compacta, o qual possui um valor de “drift time” menor (Figura 14), foi possível observar que se trata de um perfil isotópico de íon com quatro cargas (diferença igual a 0.25 Da entre os picos). O valor da massa monoisotópica desse íon é igual a 1575.9418, ou seja, o dobro da massa molecular do peptídeo Gc32.1. Essas análises sugerem fortemente que o íon 3150.23 Da está presente na amostra em duas formas: dimerizado e não dimerizado.

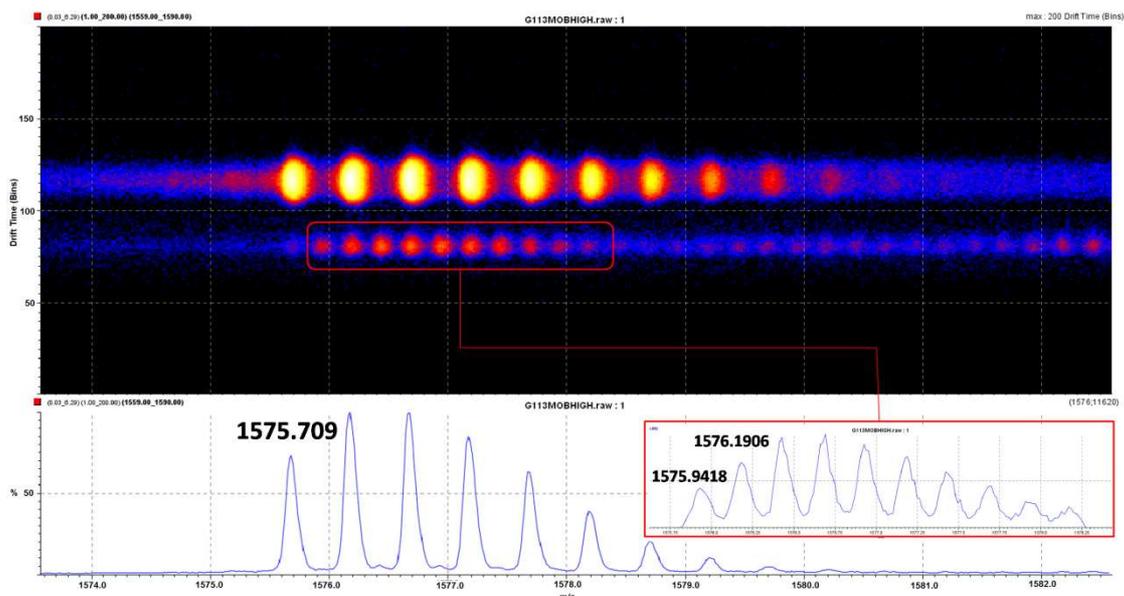


Figura 14. Mobilidade gasosa do peptídeo Gc32.1. A mobilidade gasosa de GC32_1 foi observada em sistema ESI/MALDI – SYNAPT. O íon 3150.23 Da, representado pelo valor de sua dupla carga de 1575.709 apresenta um perfil que sugere duas conformações. O íon que apresenta apenas a conformação menos compacta, o qual possui um valor de “drift time” menor, foi possível observar que trata-se de um perfil isotópico de íon com quatro cargas (diferença igual a 0.25 Da entre os picos). O valor da massa monoisotópica desse íon é igual a 1575.9418 (em destaque no quadro), ou seja, o dobro da massa molecular do peptídeo Gc32.1 o que caracteriza a provável dimerização.

O peptídeo Gc32.1, cuja massa molecular experimental é igual 3150.230 Da, apresenta 30 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária, incluindo 6 cisteínas que formam 3 pontes dissulfeto. A composição de aminoácidos da porção N-terminal do peptídeo foi obtida por degradação de Edman: **GCRWMFGACK**. Enquanto que a porção C-terminal foi obtida por MALDI-MS: **TTADCKALACVGTCIWDGS** (Figura 16A). A sequência primária do peptídeo está disposta na figura 15C.

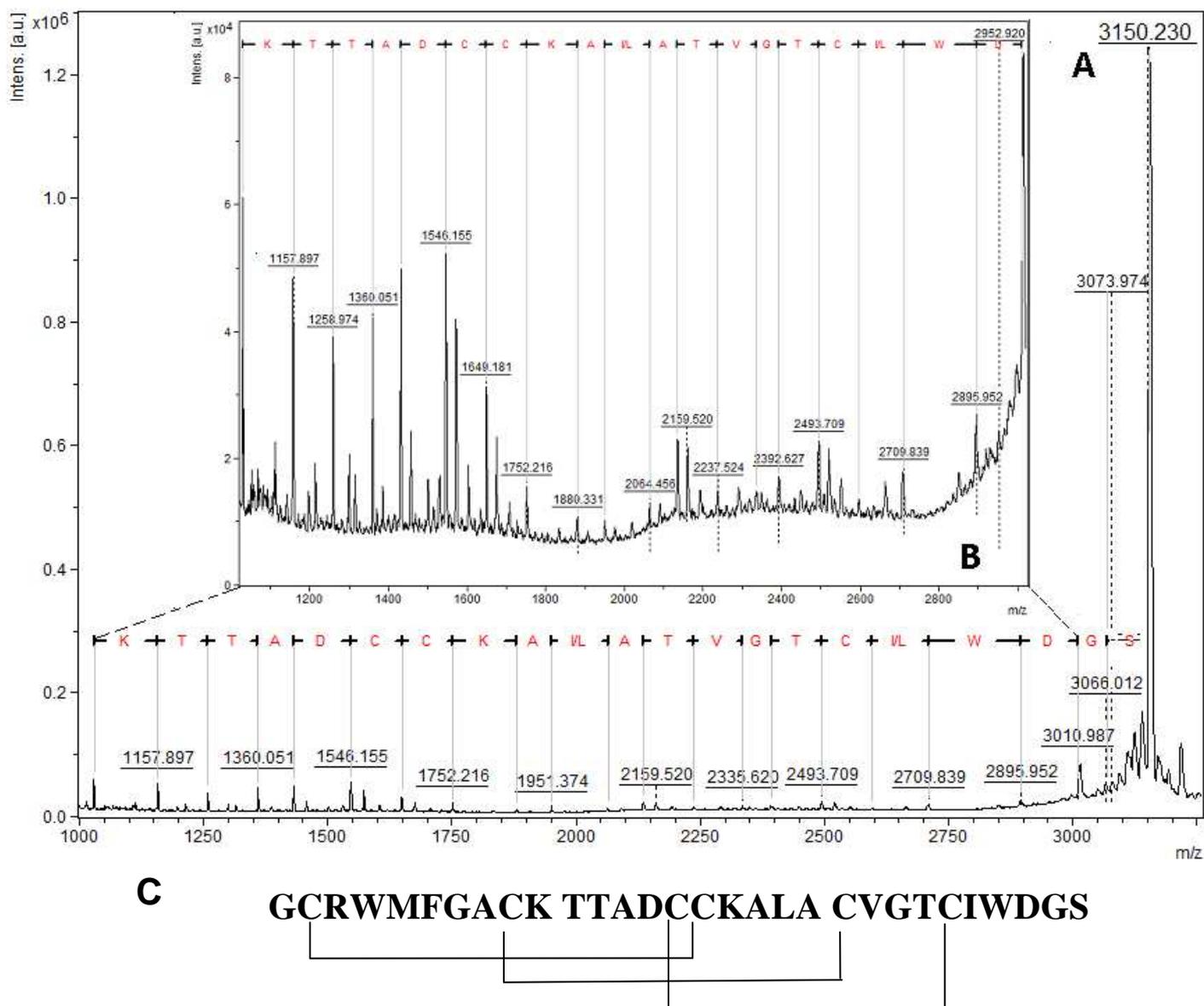


Figura 15. Sequenciamento parcial *de novo* de Gc32.1 por MALDI-MS. (A) Sequenciamento do precursor $[M+H]^+$ 3151.230. Série c está assinalada no topo. Íons não assinalados constituem série b e fragmentos internos. (B) Detalhe dos íons gerados a partir da fragmentação na fonte do precursor $[M+H]^+$ 3151.230. (C) Sequência primária completa de Gc32.1 resultante das combinação de sequenciamento por degradação de Edman e MALDI-MS.

O peptídeo Gc32.2, o qual apresenta massa molecular experimental igual a 3313.368 Da, possui 6 cisteínas que formam 3 pontes dissulfeto. A estrutura primária completa foi resolvida por degradação de Edman, MALDI-ISD e MALDI-PSD. Foram obtidos 29 resíduos de aminoácidos por Edman: **GCRWMFGACKTTADCCCKALACVGTCIWDG**. Além disso, essa técnica ainda permitiu a confirmação da sequência primária parcial obtida através de MALDI-ISD e a diferenciação entre Ile e Leu (Figura 16). Para a resolução da sequência primária completa do peptídeo, restou apenas, a determinação dos últimos resíduos C-terminais os quais correspondem a uma massa molecular igual a 223 Da.

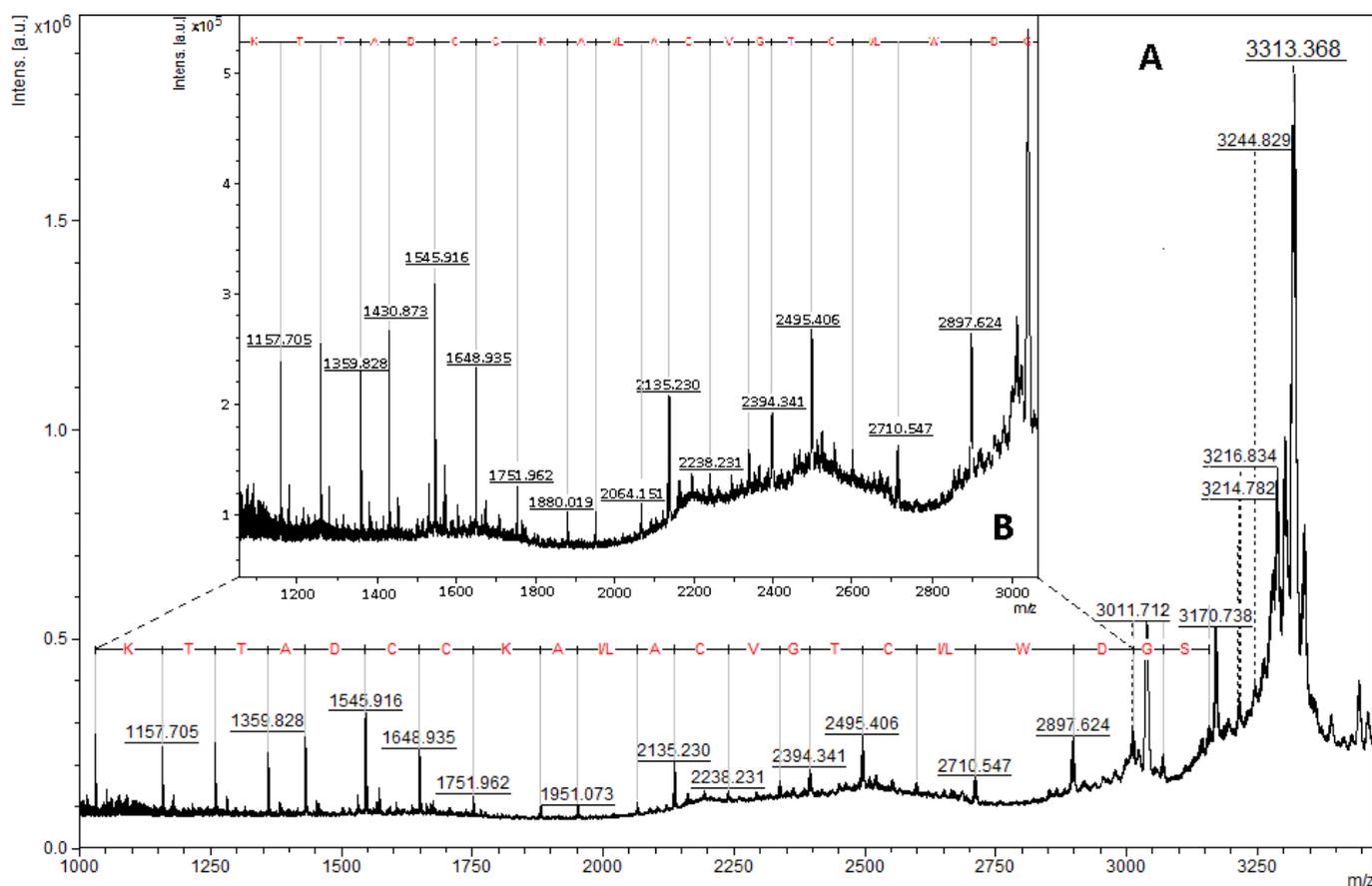


Figura 16. Sequenciamento parcial *de novo* de Gc32.2 por MALDI-MS/MS. (A) Sequenciamento do precursor $[M+H]^+$ 3313.368. Série c está assinalada no topo. Íons não assinalados constituem série b e fragmentos internos. (B) Detalhe dos íons gerados a partir da fragmentação na fonte do precursor $[M+H]^+$ 3313.368.

O peptídeo Gc32.3, cuja massa molecular experimental é igual a 3385.754 Da, apresenta 31 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária, com 6 cisteínas que formam 3 pontes dissulfeto. A composição de aminoácidos da porção N-terminal do peptídeo foi obtida pelo sequenciamento por degradação de Edman: **GCRWMFGACK**. Enquanto que, 19 resíduos da porção C-terminal foram obtidos por MALDI-MS/MS (Figura 17), para a obtenção dos últimos resíduos C-terminais, o peptídeo foi submetido à hidrólise com tripsina da qual os digestos foram analisados em MALDI TOF e MALDI microFlex. O íon 1529.611 m/z foi fragmentado e o sequenciamento “de novo” revelou os resíduos de aminoácido restantes: **TYG** (Figura 18). A figura 18B mostra a sequência completa do peptídeo Gc32.3 cuja massa molecular teórica (3385.4317 Da) calculada está em concordância com a massa experimental (3385.754 Da).

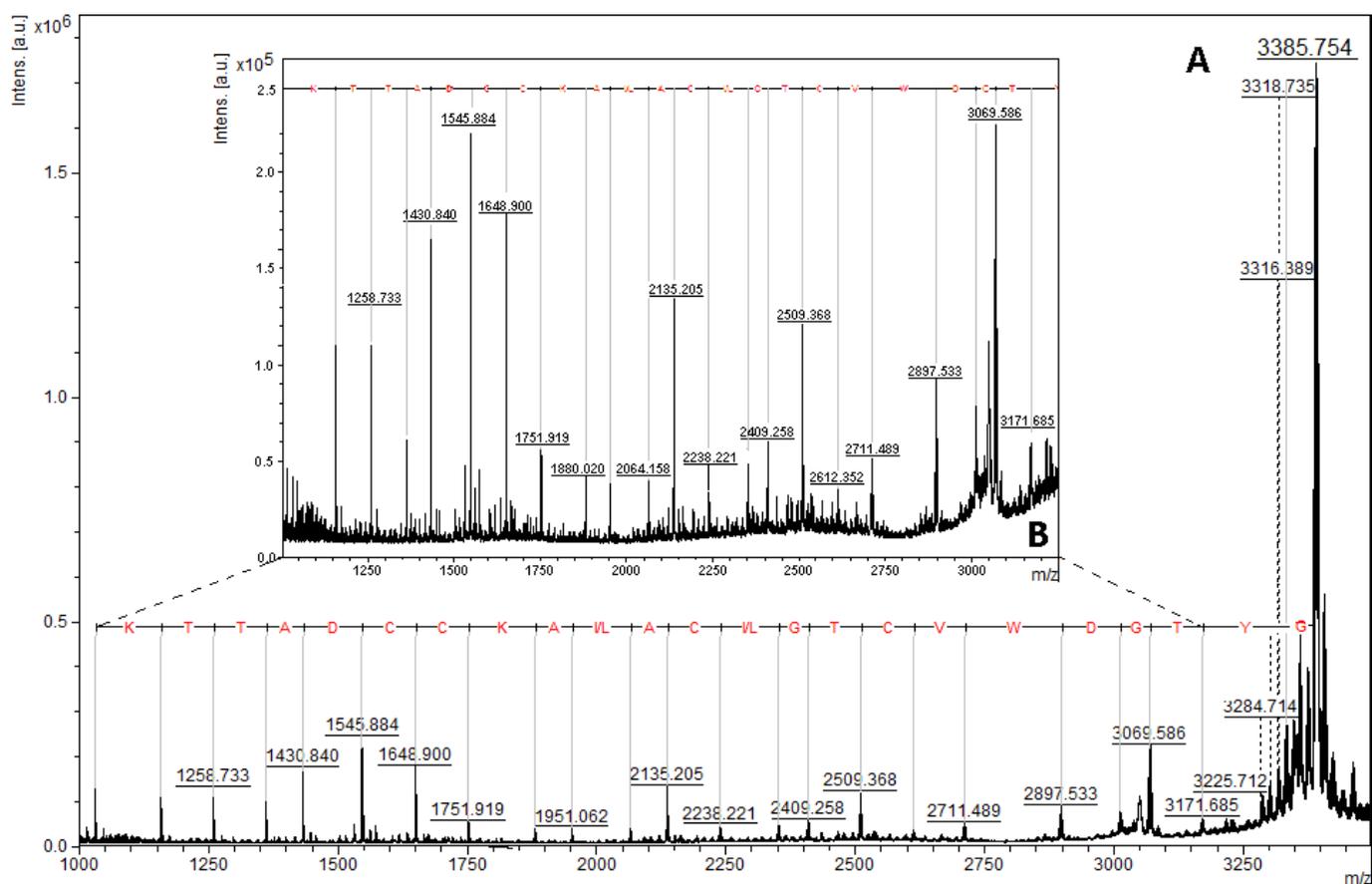


Figura 17. Sequenciamento parcial *de novo* de Gc32.3 por MALDI-MS. (A) Sequenciamento do precursor $[M+H]^+$ 3385.754. Série c está assinalada no topo. Íons não assinalados constituem série b e fragmentos internos. (B) Detalhe dos íons gerados a partir da fragmentação na fonte do precursor $[M+H]^+$ 3385.754.

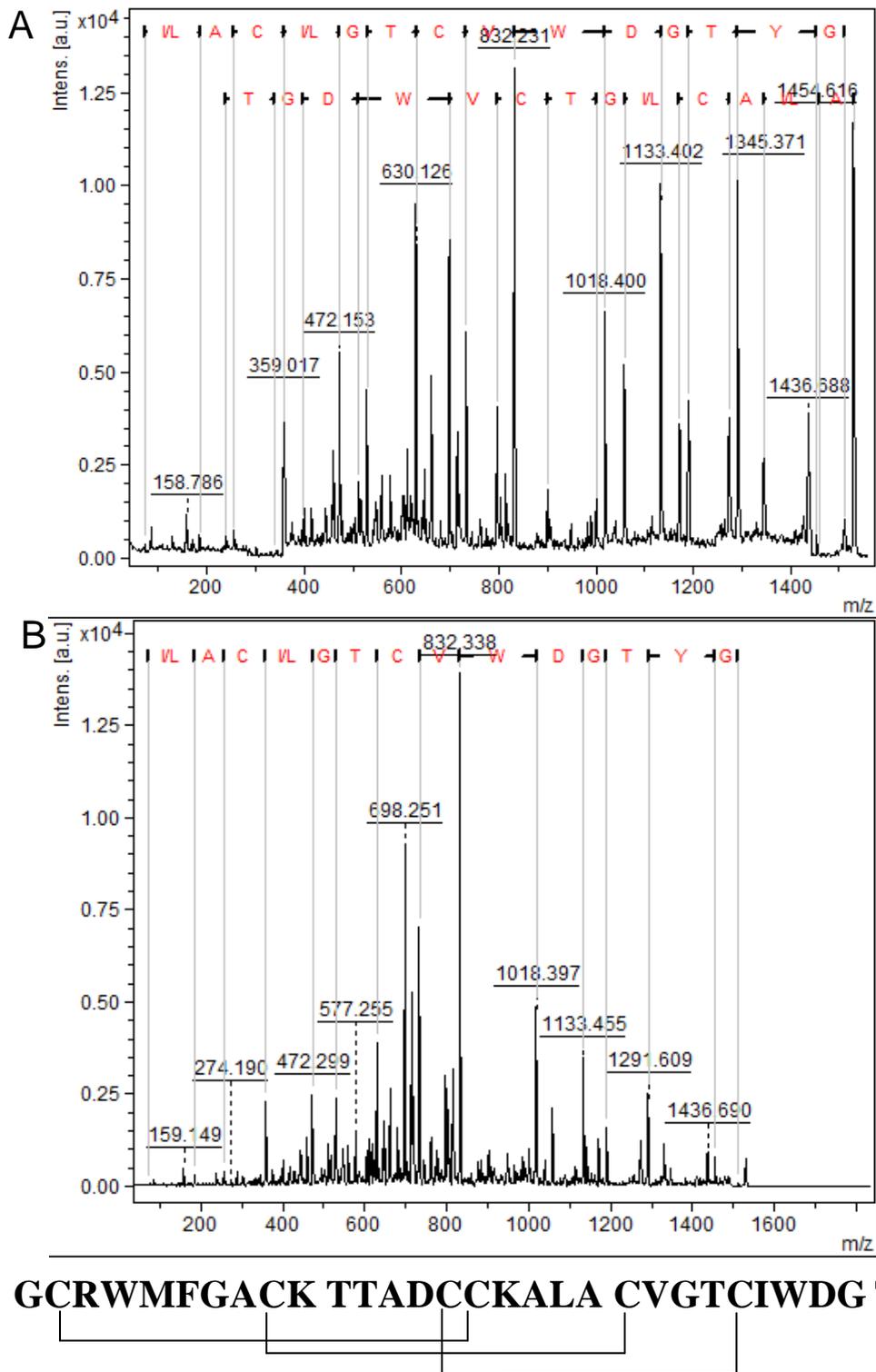


Figura 18. Sequenciamento de novo do fragmento triptico (1529.611 m/z) que gerou os últimos resíduos C-terminais de Gc32.3. (A) Sequenciamento do precursor $[M+H]^+ = 1529.611$ pós fonte (MALDI-PSD) por meio do espectrômetro de massa MALDI microFlex. Séries y e b estão assinaladas no topo. Íons não assinalados constituem outras séries, fragmentos internos ou imônios. (B) Sequenciamento do precursor $[M+H]^+ = 1529.611$ (MALDI-TOF/TOF-MSMS). Séries y está assinaladas no topo (C) Sequência primária completa do peptídeo Gc32.3 obtida através da combinação das técnicas de sequenciamento por degradação de Edman, MALDI-ISD e MALDI microFlex-PSD.

A fração GC33 foi recromatografada para a obtenção do seu componente principal Gc33.1 (Figura 19A). A verificação da pureza de Gc33.1 e da massa molecular de 3499.90 Da foi realizada por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF) (Figura 19B).

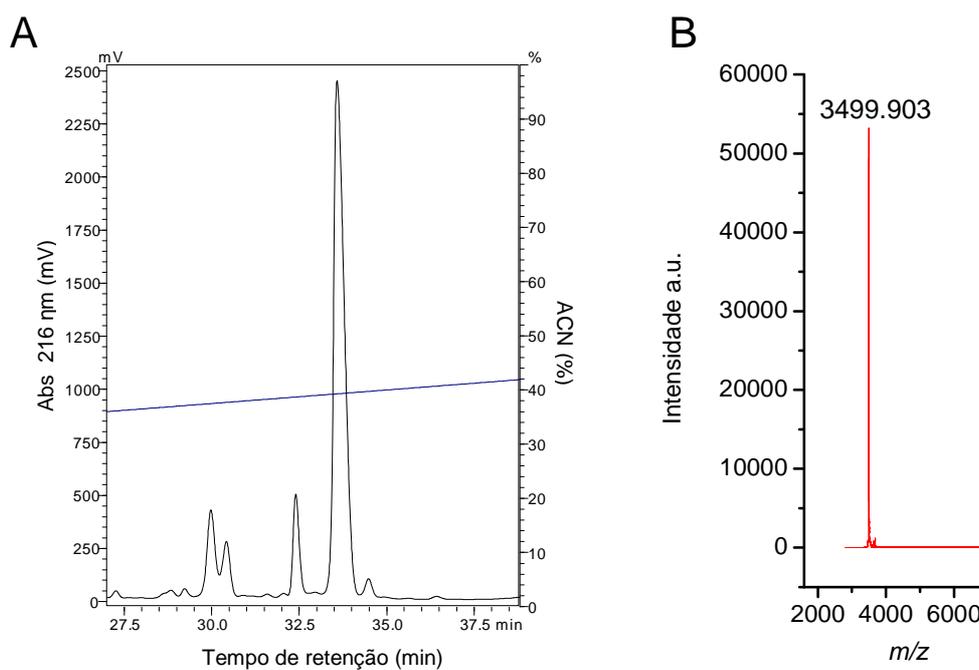


Figura 19. Purificação da fração GC33. (A) Recromatografia da fração GC33 RP-HPLC em coluna analítica C₁₈ Phenomenex Luna 5u 100 A (4,6 mm x 150 mm) e gradiente de acetonitrila. (B) Espectrograma de massa molecular da Gc33.1 em sistema MALDI TOF/TOF MS, modo linear.

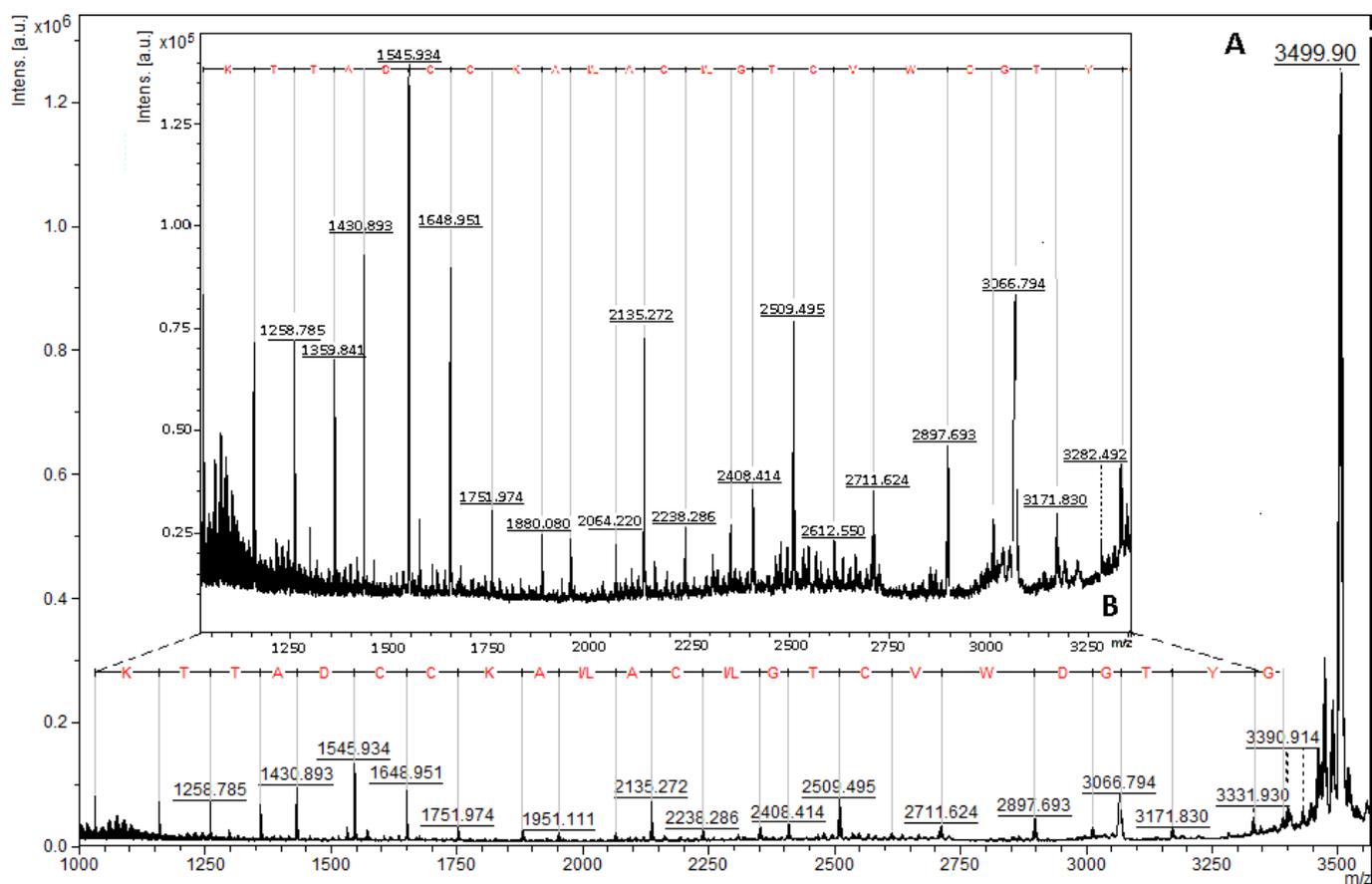


Figura 20. Sequenciamento parcial *de novo* de Gc33.1 por MALDI-MS/MS. (A) Sequenciamento do precursor $[M+H]^+$ 3499.90. Série c está assinalada no topo. Íons não assinalados constituem série b e fragmentos internos. (B) Detalhe dos íons gerados a partir da fragmentação na fonte do precursor $[M+H]^+$ 3499.90.

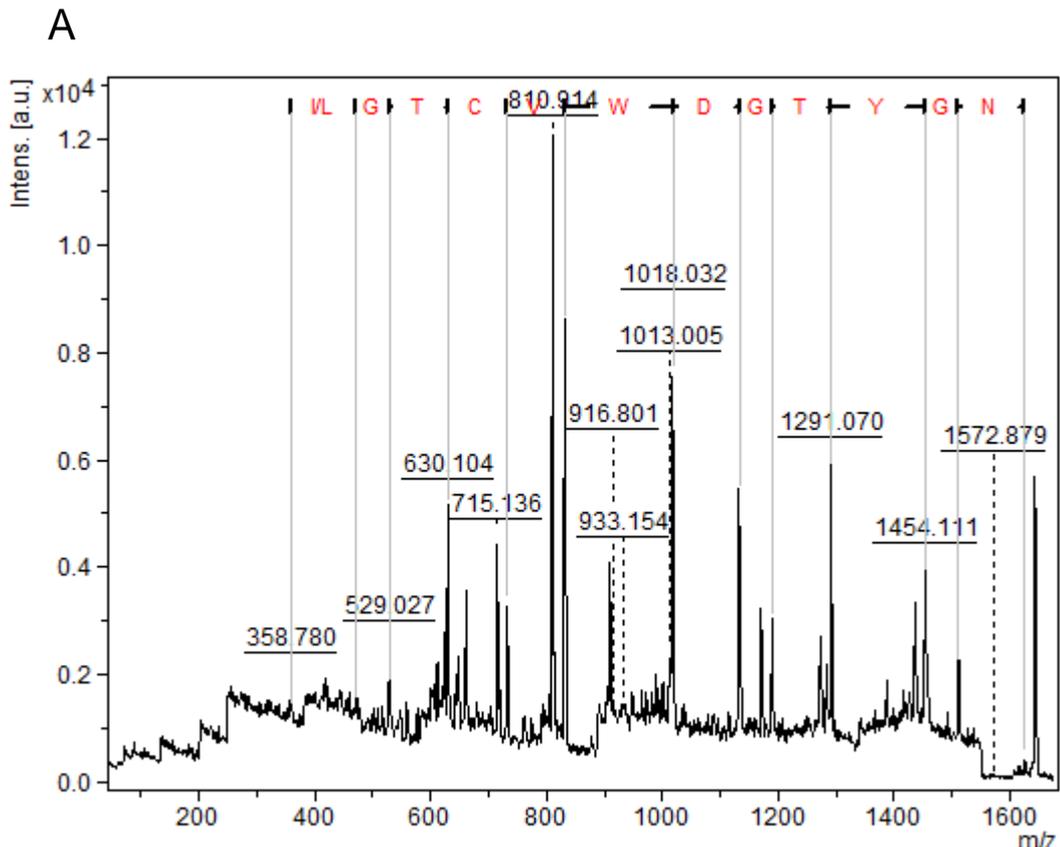


Figura 21. Sequenciamento de novo do fragmento tríptico (1642.85 m/z) que gerou os últimos resíduos C-terminais de Gc33.1. (A) Sequenciamento do precursor $[M+H]^+ = 1642.85$ pós fonte (MALDI-PSD) por meio do espectrômetro de massa MALDI microFlex. Séries y e b estão assinaladas no topo. Íons não assinalados constituem outras séries, fragmentos internos ou imônios. (B) Sequência primária completa do peptídeo Gc33.1 obtida através da combinação das técnicas de sequenciamento por degradação de Edman, MALDI-ISD e MALDI microFlex-PSD.

O alinhamento dos peptídeos isolados de *G. cerrado* com outras toxinas de aranhas mostrou que as Gc32.1, Gc32.2, Gc32.3 e Gc33.1 possuem a sequência N-terminal idêntica e se diferem apenas nos últimos resíduos C-terminais. Além disso, os peptídeos de *G. cerrado* possuem alta similaridade com toxinas bloqueadoras de canais K_v2 e K_v4 (Figura 22). Os peptídeos Gc32.2, Gc32.3 e Gc33.1 foram renomeados de GcTx1, GcTx2 e GcTx3, respectivamente, segundo classificação sugerida previamente por King *et al.*, (2008) e selecionados para avaliação da atividade em canais para potássio. Apesar da similaridade do peptídeo Gc32.1 com toxinas que atuam em canais para potássio a caracterização farmacológica não foi realizada pela inexistência de

detecção em sistema RP-HPLC e espectrometria de massa posteriores à caracterização química.

Toxina	Sequência	a.a	I%
Gc32.1	GCRWMFGACKTTA DCCKALACIG---TCVWDGS---	30	
Gc32.2	GCRWMFGACKTTA DCCKALACIG---TCVWDGS---	30	
Gc32.3	GCRWMFGACKTTA DCCKALACIG---TCVWDGTYG-	32	
Gc33.1	GCRWMFGACKTTA DCCKALACIG---TCVWDGTYGN	33	
SGTx1	TCRYLFGGCKTTA DCCKHLACRSDG-KYCAWDGTF--	34	66
HaTx1	ECRYLFGGCKTTS DCCKHLGCKFRD-KYCAWDFTFS-	34	51
VaTx2	ECRWMFGGCDSTS DCCEHLSCKM-GLDYCAWDGTF--	34	51
HmTx1	ECRYLFGGCSSTS DCCKHLSCRS-DWKYCAWDGTFFS-	35	51
HaTx2	ECRYLFGGCKTTA DCCKHLGCKFRD-KYCAWDFTFS-	35	54
VaTx1	ECRWMFGGCDSTL DCCKHLSCKM-GLYYCAWDGTF--	35	54
JZTX-XI.4	ECRKMFGGCSVDS DCCAHLGCKP-TLKYCAWDGTFGK	36	52
JZTX-42	ECRWMFGGCTTDS DCCEHLGCRWEKPSWCAWDGTVRK	37	50
JZTX-41.2	ECRWMFGGCTTDS DCCEHLGCRWEKPSWCAWDGTFRK	37	48
JZTX-41	ECRWMFGGCTTDS DCCEHLGCRWEKPSWCAWDGTFRK	37	48

** : : ** *** * . * : : * * * * *

Figura 22. Alinhamento das sequências de Gc32.1; Gc32.2; Gc32.3 e Gc33.1 realizado por meio do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). SGTx1 (*Scodra griseipes*; Marvin *et al.*, 1999); HaTx1 e HaTx2 (*Grammostola rosea*; Swartz & Mackinnon); HmTx1 (*Heteroscodra maculata*; Escoubas *et al.*, 2002); VaTx1 e VaTx2 (*Psalmopoeus cambridgei*; Siemens *et al.*, 2006); JZTX-XI.4; JZTX-41; ZTX-41.2 e JZTX-42. “*”: resíduos idênticos, “:”: substituição conservativa, “.”: substituição semi-conservativa.

As GcTx2 e 3 compartilham cerca de 50% de identidade com a hanatoxina 1 (HaTx1) incluindo as pontes dissulfeto. O alinhamento realizado em FFAS03 a estrutura NMR disponível no (PDB acesso 1DH1) foi usada como molde para criar o modelo da estrutura das GcTx2 e 3, uma vez que os resultados algoritmo FFAS03 revelou uma boa homologia estrutural entre as sequências e o molde, além disso, a HaTx1 é a toxina de canal para potássio mais bem estudada o que auxilia nas análises de estrutura e função dos peptídeos.

O modelo estrutural formado por duas folhas β paralelas de GcTx2 e 3 ligadas por três pontes dissulfeto está disposta na figura 23. No entanto, os peptídeos GcTx2 e 3 apresentam algumas diferenças de sequência de aminoácidos com a hanatoxina 1, como formação da díade, K22 e R3, de resíduos candidatos a funcionalidade em canal $K_v2.1$, onde a há uma substituição da Lisina por uma Leucina na estrutura primária de GcTx2 e 3. Além disso, o circulo de cargas formado na superfície da HaTx1 é formado pelos resíduos Y4, L5, F6, Y27 e W30, enquanto que existe a substituição da Leucina na posição 5 por uma Metionina (Y4, M5, F6, Y27 e W30).

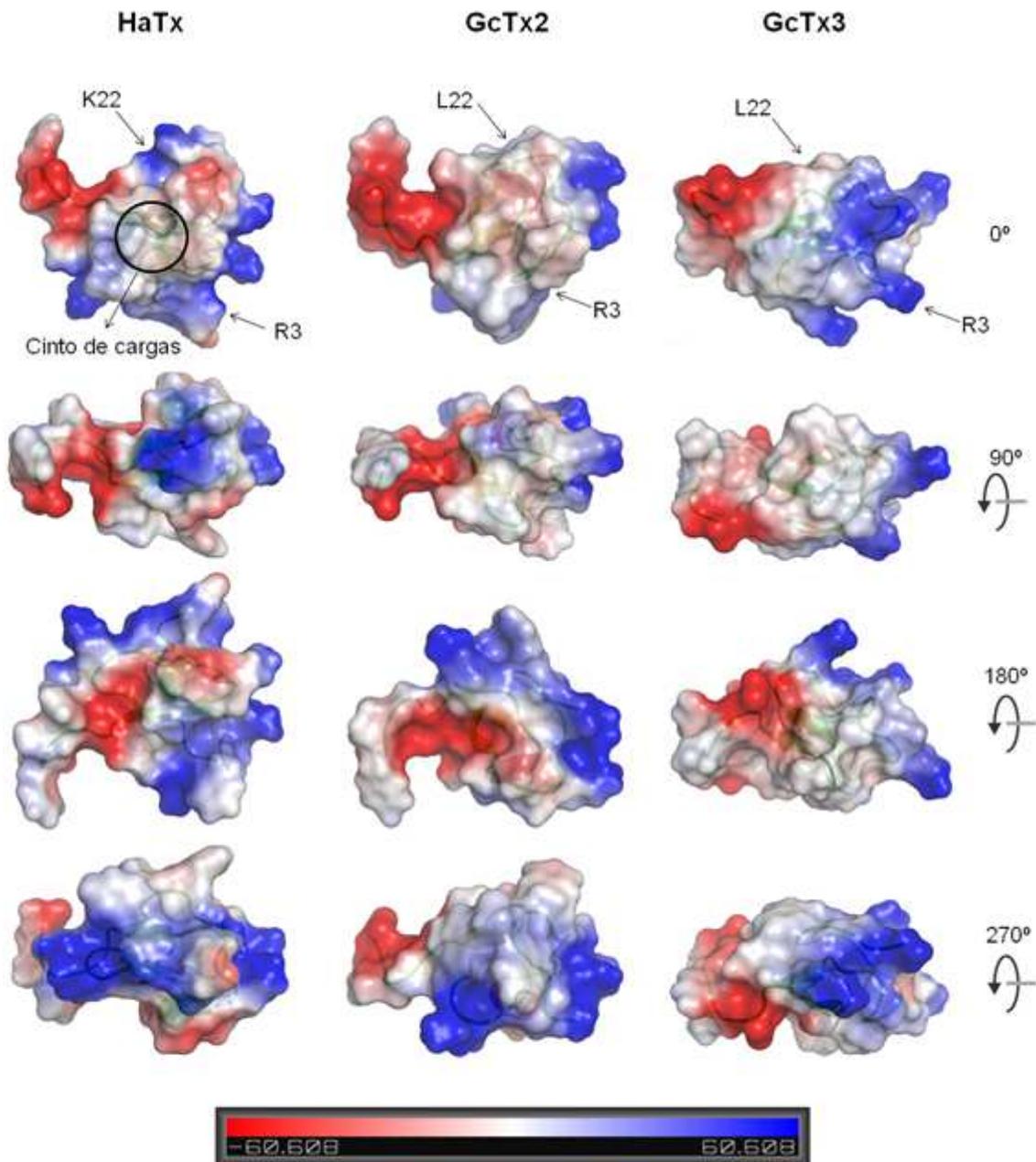


Figura 23. Comparação da superfície molecular de Hanatoxina (PBD 1D1H) e os peptídeos GcTx2 e GcTx3. As setas indicam os resíduos envolvidos na funcionalidade da hanatoxina (K22 e R3) e a substituição da lisina por leucina (L22) de GcTx2 e GcTx3. A região circundada representa o cinto de cargas. Coloração de acordo com a hidrofobicidade da molécula, em azul (apolar) e em vermelho (polar).

Os modelos de GcTx2 e 3 revelaram a alta similaridade estrutural entre esses peptídeos, diferindo apenas na região final da porção C-terminal (Figura 24).

Também foi possível observar que a primeira folha- β é formada pelos resíduos L19, A20, C21 e a segunda folha- β pelos resíduos C25, V26 e W27.

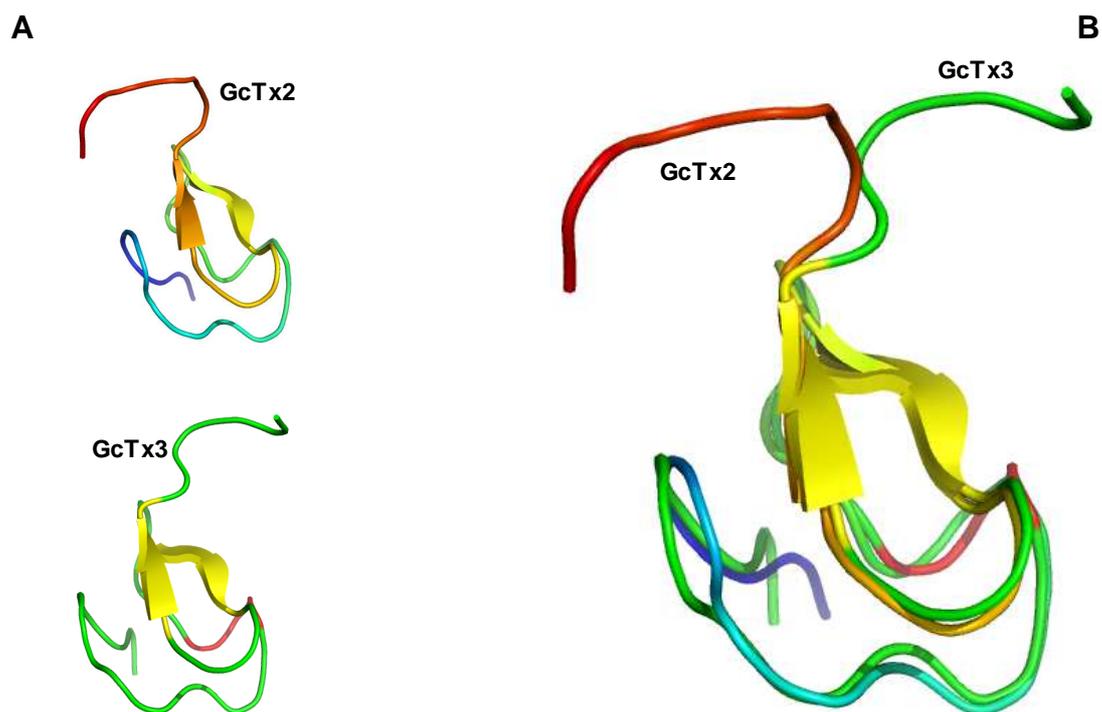


Figura 24. Modelo molecular 3D dos peptídeos GcTx2 e GcTx3. (A) Modelos 3D de GcTx2 (acima a esquerda) e GcTx3 (abaixo a esquerda) mostrando a estrutura de $\beta\beta$. (B) Sobreposição dos modelos 3D de Gc32.3 e Gc33.1 evidenciando a semelhança estrutural entre eles.

5.2.3.1. Caracterização Farmacológicas dos Peptídeos GcTx1-3

Para testar a atividade dos peptídeos GcTx1-3 foi mensurada a corrente de íons dos canais para potássio presentes nos cardiomiocitos isolados de camundongos através da técnica de *whole-cell patch clamp* na presença de 3 μM de cada peptídeo.

Os peptídeos GcTx1-3 provocaram um efeito na despolarização da membrana de canais para potássio, mas não houve ação sob a corrente no momento em que a membrana foi hiperpolarizada até -120 mV (Figura 25).

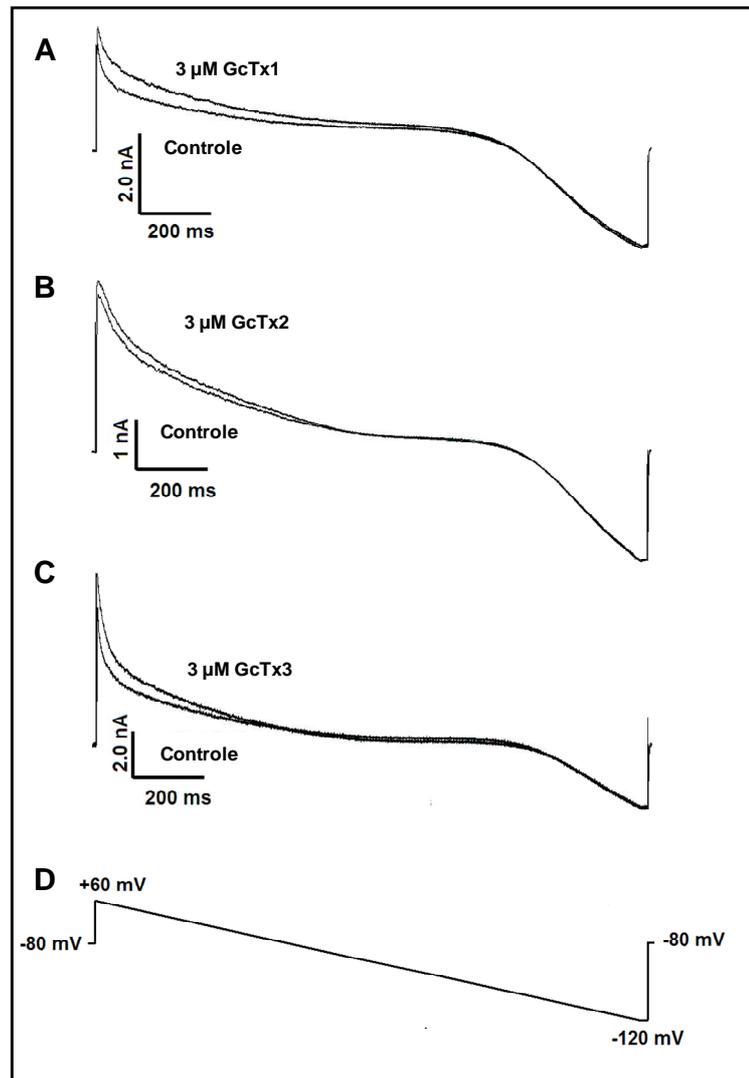


Figura 25. Efeito de GcTx1-3 sobre a corrente de potássio de acordo com a relação de voltagem. (A) GcTx1 aumentou a corrente de potássio no estado despolarizado da membrana. (B) GcTx2 aumentou a corrente de potássio no estado despolarizado. (C) GcTx3 aumentou a corrente de potássio no estado despolarizado. D. Foi usado rampas de voltagem (120 mV/s) onde as membranas celulares foram mantidas a -80 mV, despolarizadas para +60 mV e em seguida repolarizadas para -120 mV por 1.5 s.

Foi verificado o efeito das GcTx1-3 sob as correntes transitórias de potássio (I_K) em canais K_v de cardiomiocitos. De acordo com o valor máximo da corrente transitória (I_K) medida logo após o início do pulso despolarizante registradas +60 mV/s partindo de um potencial de repouso de -80mV foi observado que os peptídeos GcTx1-3 provocaram o aumento da amplitude das correntes transitórias (Figura 26).

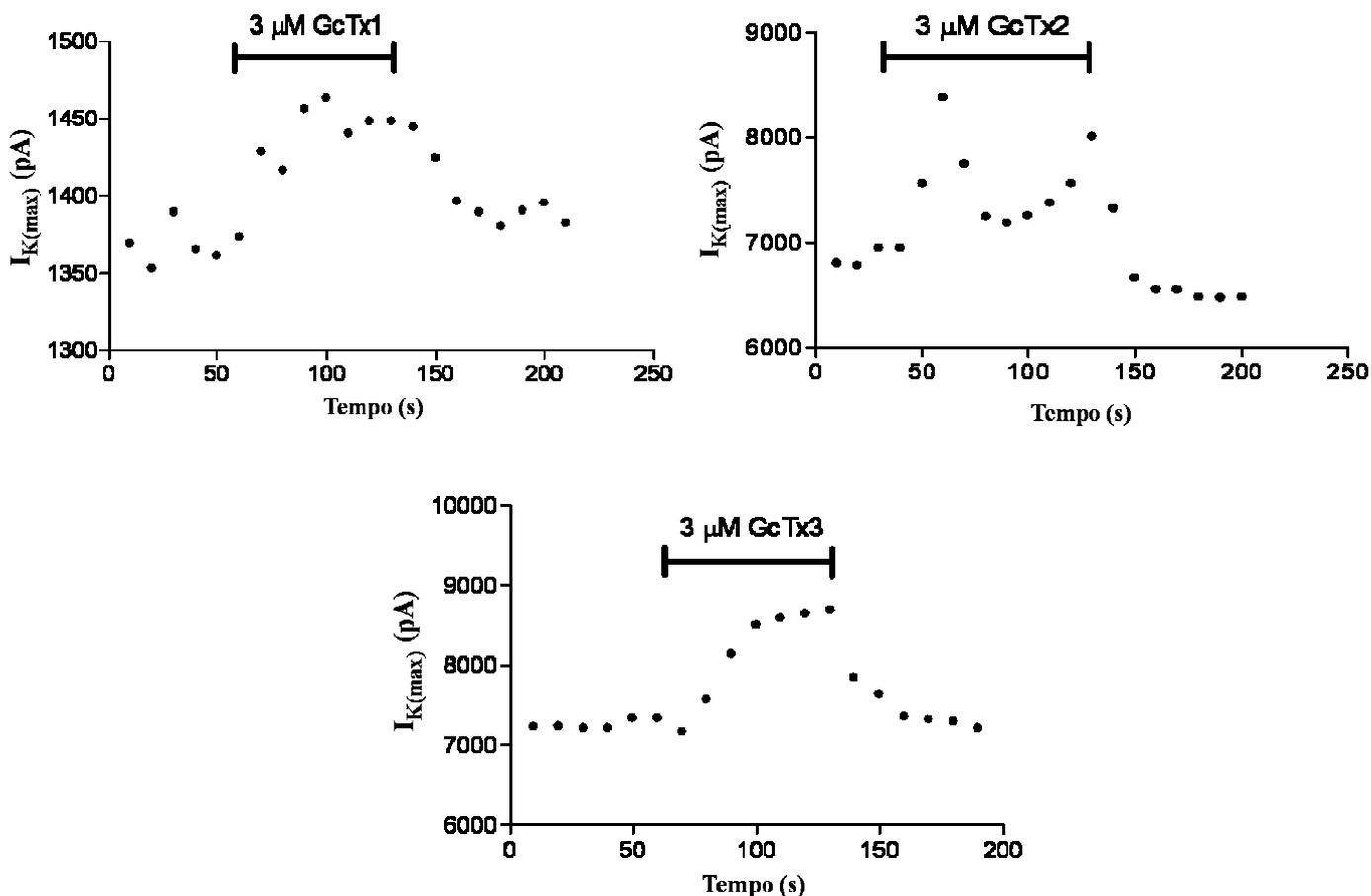


Figura 26. Efeito de GcTx1-3 sob as correntes transitórias de potássio (I_K) em canais K_v de cardiomiócitos. Valor máximo da corrente transitória (I_K) medida logo após o início do pulso despolarizante registradas em miócitos usando a técnica de *whole-cell patch-clamp*. As I_{Ks} foram obtidas por pulsos de despolarização +60 mV/s, potencial de repouso de -80mV. Os peptídeos GcTx1-3 provocaram o aumento das correntes transitórias.

Além disso, os peptídeos GcTx1-3 provocaram o aumento das correntes transitórias (I_{To}) de K_v de miócitos. Após a lavagem dos peptídeos as correntes I_{To} voltaram para o nível do controle, sendo assim o efeito mostrado pelas toxinas é reversível (Figura 27).

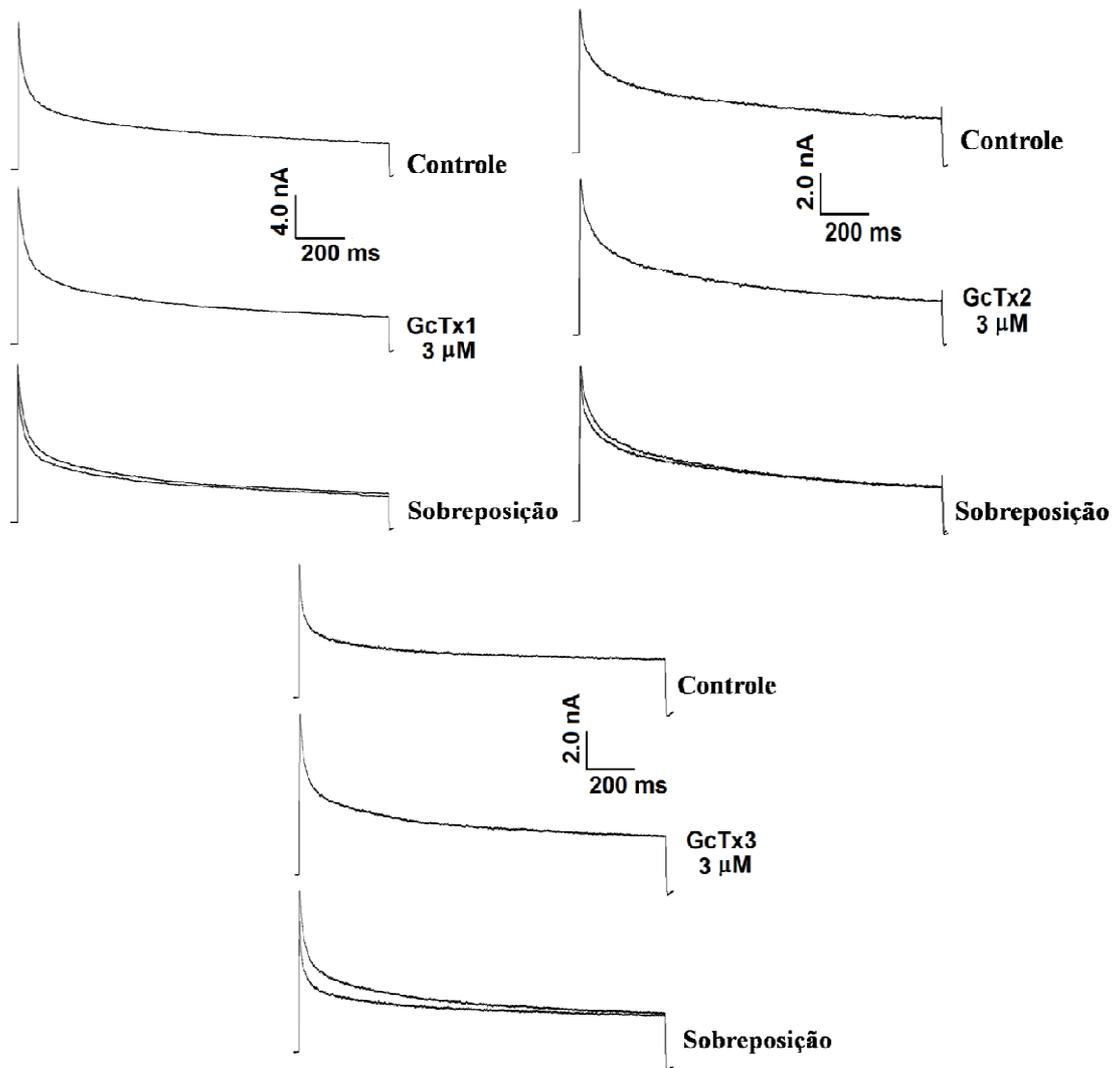


Figura 27. Efeito dos peptídeos GcTx1-3 sob o decurso para correntes de saída (I_{to}). Pulso de despolarização para +60 mV/s, pontencial de repouso -80 mV sob condições controle (acima); prolongamento do decurso para correntes de saída com 3 μ M de GcTx1-3 (ao meio) e a sobreposição da linha das correntes K^+ no controle, na presença de 3 μ M de GcTx1-3 (abaixo).

Estabelecendo uma relação comparativa entre os peptídeos, foi observado que GcTx2 gerou um aumento da corrente transiente de potássio significativamente maior do que os peptídeos GcTx1 e GcTx3 (Figura 28).

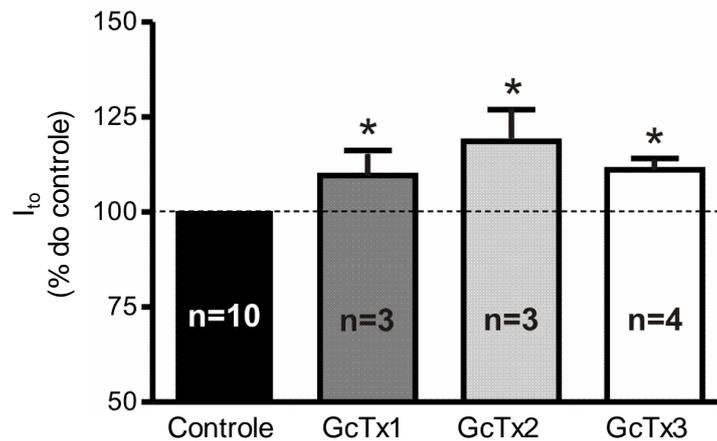


Figura 28. Comparação do efeito dos peptídeos GcTx1-3 na corrente de saída de potássio de cardiomiócitos (I_{to}). GcTx2 gerou um aumento da corrente transiente de potássio maior em relação aos peptídeos GcTx1 e GcTx3. Os asteriscos indicam que a diferença foi significativa estatisticamente, $p < 0.05$.

No estado estável das correntes de potássio (I_{kss}) é retomado o fluxo de íons observado no controle, evidenciando o efeito reversível de GcTx1-3 sob esse tipo de corrente (Figura 29).

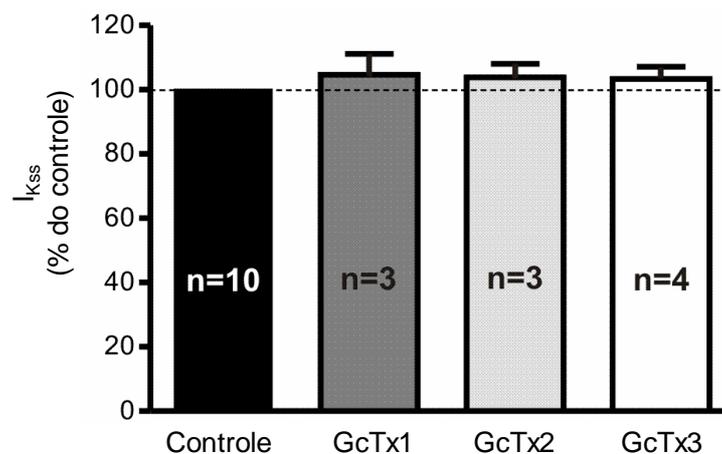


Figura 29. Comparação do efeito dos peptídeos GcTx1-3 na corrente de potássio no estado estável (I_{kss}). A corrente de potássio retoma ao fluxo do controle no estado estável, efeito reversível.

Sobre condições controladas, foi realizada uma análise da relação entre as correntes de potássio e voltagem (I/V). A perfusão de 3 μ M de GcTx1-3 não alterou as correntes de entrada de potássio nos cardiomiócitos. Por outro lado, no limiar da ativação por volta de 10 mV na direção da despolarização houve um aumento da amplitude das correntes de saída (Figura 30).

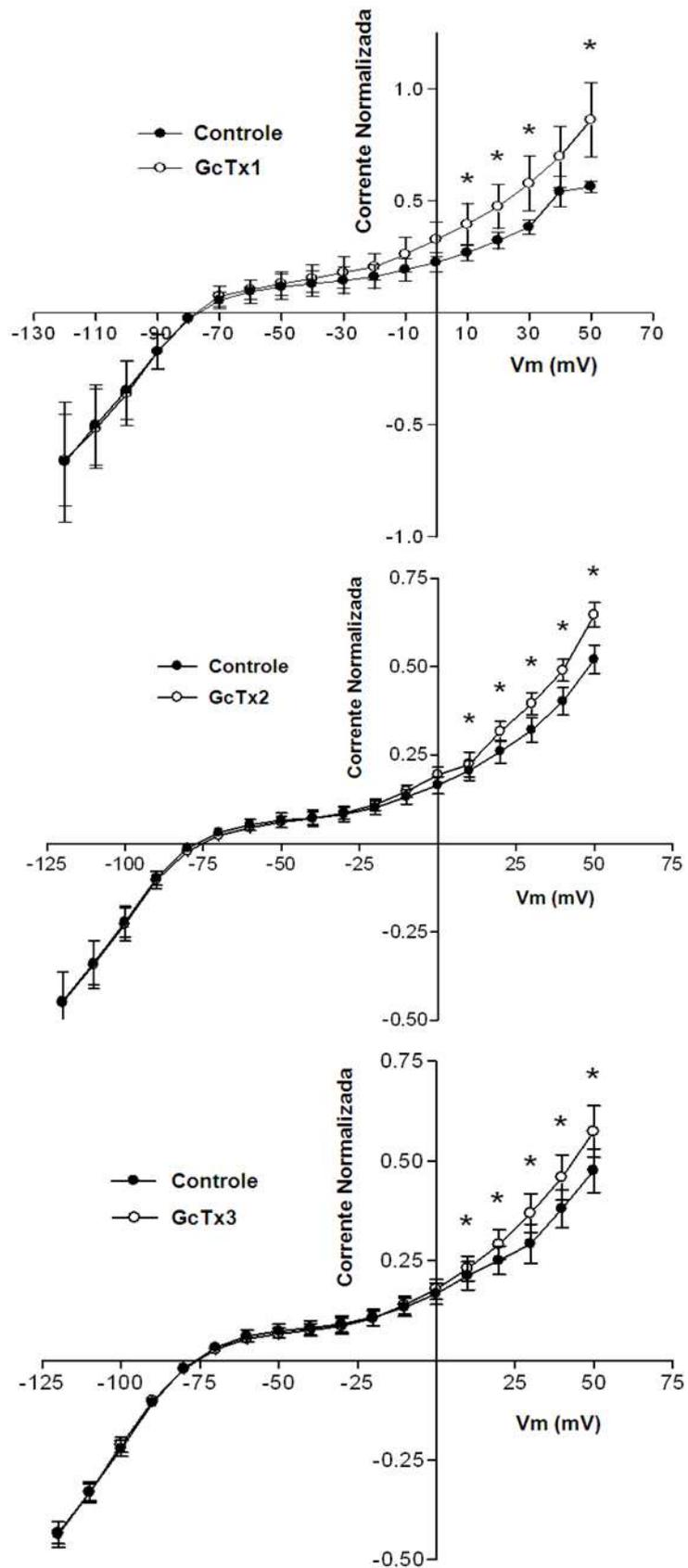


Figura 30. Relação corrente-voltagem (I/V) feita a partir dos valores de correntes medidos em passos de 10 mV, de -120 a +50 mV. Os asteriscos indicam que o efeito foi significativo estatisticamente, $p < 0.05$.

Foi possível observar que GcTx1 mostrou um efeito significativamente mais pronunciado sob as correntes transientes de potássio (I_K) em relação aos peptídeos GcTx2 e 3 (Figura 31).

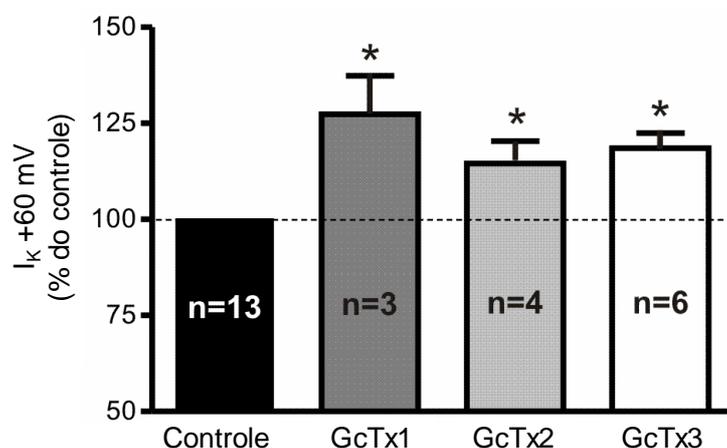


Figura 31. Comparação do efeito dos peptídeos GcTx1-3 na despolarização dos canais K_v de cardiomiócitos. GcTx1 tem um efeito maior na despolarização dos canais K_v em relação à GcTx2 e 3. Os asteriscos indicam que a diferença foi significativo estatisticamente, $p < 0.05$.

O fluxo de íons dos canais K_v é restabelecido ao nível do controle ao repolarizar (-120 mV) as membranas dos miócitos (Figura 32).

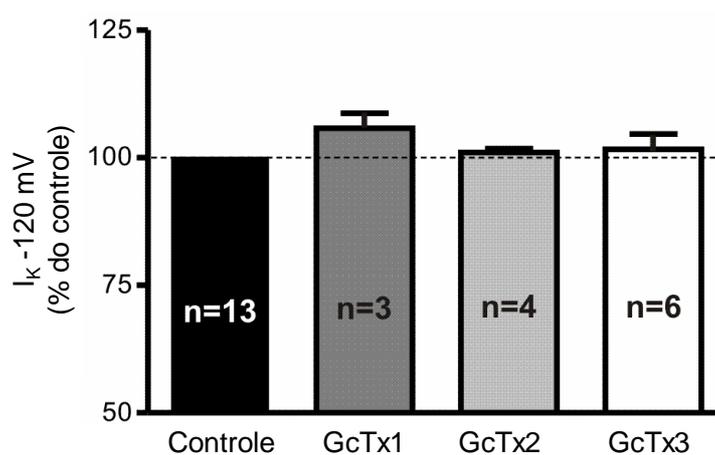


Figura 32. Comparação do efeito dos peptídeos GcTx1-3 na repolarização dos canais K_v de cardiomiócitos. As correntes de potássio na presença de GcTx1-3 retomam ao fluxo do potássio na condição controle no momento da repolarização, efeito reversível.

5.3. Atividade Hialuronidásica das Frações Gc34 e Gc35

Foi realizada a inspeção de massas moleculares na faixa de 10 – 100 kDa e ensaio enzimático para analisar a composição enzimática da peçonha de *G. cerrado*.

Foi detectada na peçonha de *G. cerrado* a atividade hialuronidásica através da digestão do ácido hialurônico, identificada como zonas claras contra o fundo corado em azul nas faixas entre 35 e 50 kDa. De acordo com o zimograma hialuronidásico as frações Gc34 e Gc35 são os componentes responsáveis por essa atividade enzimática observada na peçonha (Figura 33).

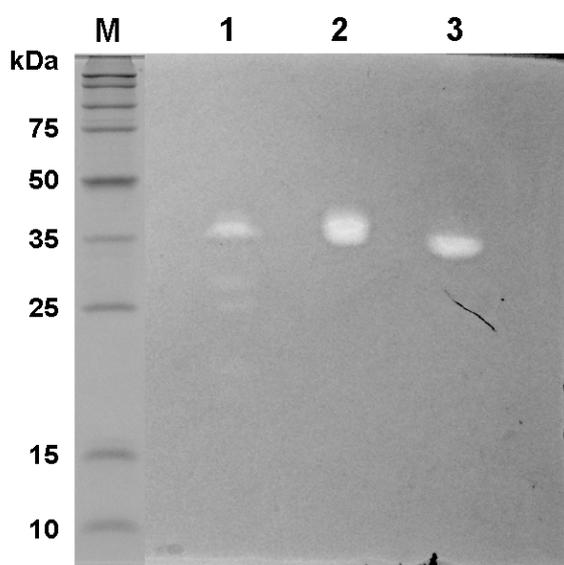


Figura 33. Zimograma hialuronidásico em SDS-PAGE 12%, ácido hialurônico 0,14% da peçonha bruta de *Guyruita cerrado*; Frações GC34 e 35. (M) Marcador de massas moleculares (Broad Range Protein Molecular Weight Markers); (1) Controle positivo – *Loxosceles gaucho*; (2) Peçonha bruta de *G. cerrado*; (3) Frações Gc34 e 35.

A espectrometria de massa por ESI/MALDI – SYNAPT revelou a massa molecular das hialuronidases (frações Gc34 e 35) isoladas da peçonha de *G. cerrado* de 42566 e 42958 Da, respectivamente (Figura 34).

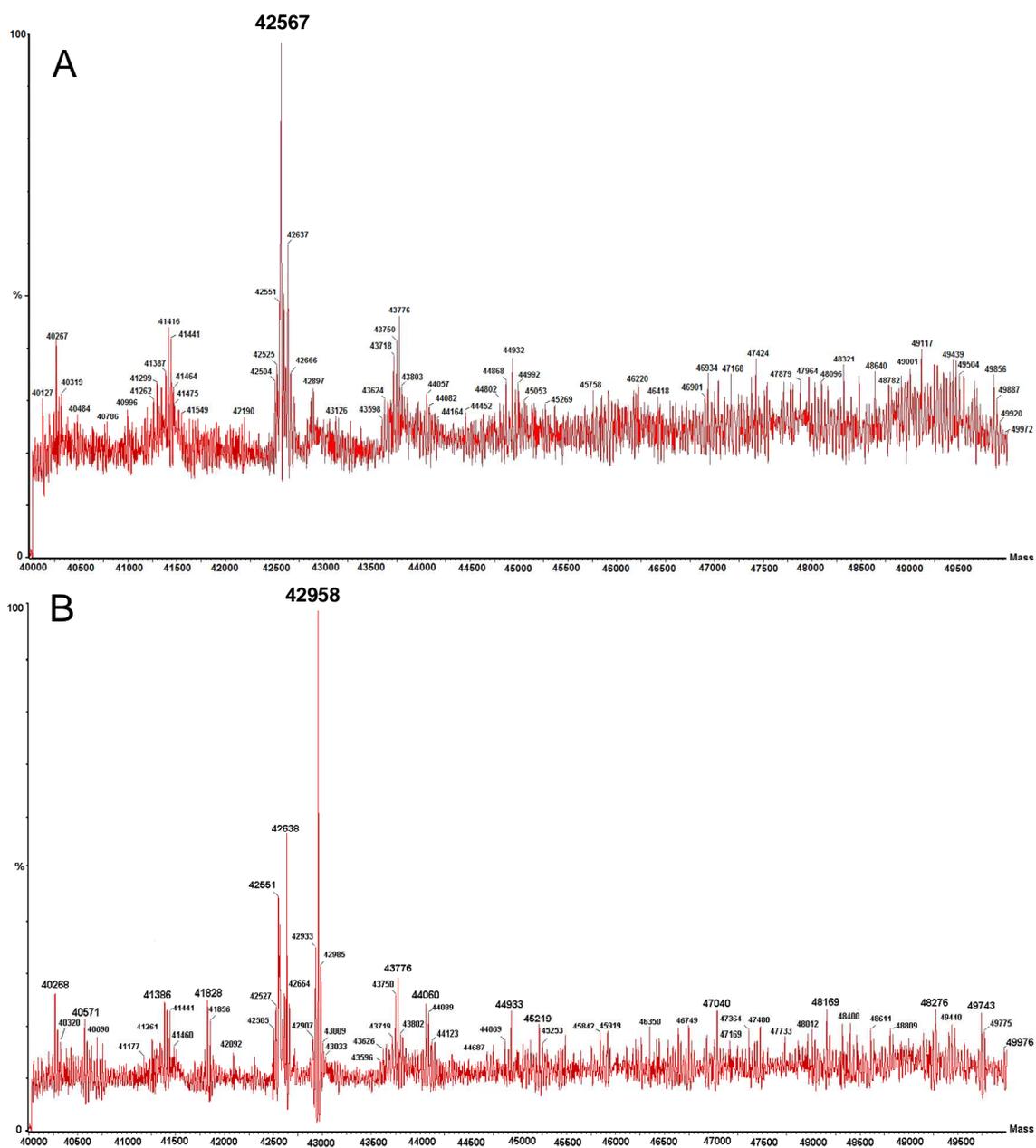


Figura 34. Espectrograma de massa das hialuronidases isoladas da peçonha de *Guyruita cerrado* obtido em sistema ESI/MALDI – SYNAPT - Waters. (A) Massa molecular monoisotópica da fração Gc34 – 42567 Da. (B) Massa molecular monoisotópica da fração Gc35 – 42958 Da.

6. Discussão

A estratégia utilizada (combinação das técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Performance e Espectrometria de massa) foi efetiva na identificação dos componentes da peçonha de *Guyruita cerrado*.

O fracionamento da peçonha bruta de macho e fêmea de *G. cerrado* produziu perfis cromatográficos reprodutivos, dos quais foi possível detectar a eluição de 28 e 38 frações, respectivamente. Através de análises em RP-HPLC e espectrometria de massa, foi possível observar que existem diferenças qualitativas e quantitativas entre os componentes moleculares dos gêneros de *G. cerrado*, visto que, foram encontrados 24 componentes de massa exclusivos da composição da peçonha de macho (Tabela 2). Essa diferença qualitativa e quantitativa detectada entre a peçonha de machos e fêmeas foi considerada significativa em estudo comparativo entre diferentes espécies de aranhas (Escoubas *et al.*, 1999). Em aranhas do gênero *Phoneutria*, a diferença entre os sexos é relativamente comum, onde os machos apresentam uma quantidade superior de componentes em relação à fêmea (Richardson *et al.*, 2006).

Os estudos subsequentes foram realizados apenas com fêmeas de *G. cerrado* devido à maior diversidade de componentes e a facilidade de obtenção de peçonha em relação aos machos.

Os componentes de massas moleculares mais abundantes da peçonha de *G. cerrado* encontram-se na faixa de massa que varia de 3000 a 4000 Da, e a frequência de íons (m/z) detectados nas frações, referindo-se a valores entre 500 e 6000 Da, foi maior na região do gradiente de acetonitrila (TFA 0,1%) que variou entre 25 e 35%. Sendo assim, é possível relatar que a peçonha de *G. cerrado* possui uma taxa pequena de componentes de caráter hidrofílico e baixa massa molecular, pois as frações que eluem no início do gradiente de acetonitrila são referentes aos componentes de baixa massa molecular, tais como as acilpoliaminas (Adams *et al.*, 1989; Skinner *et al.*, 1990; Quistad *et al.*, 1991). Além disso, a faixa de massas moleculares majoritárias encontradas na peçonha de *G. cerrado* está de acordo com os componentes de massa detectados na peçonha de outros therafosídeos (Escoubas *et al.*, 1998; Gentz *et al.*, 2009).

Foram purificados seis peptídeos da peçonha de *G. cerrado*: Gc24/25.2; Gc27.1; Gc32.1; Gc32.2; Gc32.3 e Gc33.1, além de duas proteínas com alta massa molecular Gc34 e Gc35 (42 kDa).

A sequência primária parcial e/ou completa dos peptídeos Gc24/25.2; Gc32.1; Gc32.2; Gc32.3 e Gc33.1 foi obtida a partir da combinação das técnicas de sequenciamento por Degradação de Edman e espectrometria de massa (MALDI-MSD e MALDI-PSD).

A aplicação das técnicas de separação por RP-HPLC e do uso extensivo da espectrometria de massa é considerada a principal responsável pela crescente descoberta de novas toxinas peptídicas da peçonha de aranhas (Escoubas *et al.*, 2003).

O peptídeo Gc24/25.2 possui massa molecular igual a 5043.802 Da e uma sequência primária parcial de 22 resíduos foi obtida através do método de fragmentação na fonte (MALDI-MSD) a qual apresentou similaridade com toxinas inseticidas de aranhas caranguejeiras enquanto que os peptídeos Gc32.1; Gc32.2; Gc32.3 e Gc33.1 compartilham cerca de 60% de identidade com toxinas com ação em canais para potássio. Dessa forma, os cinco peptídeos isolados da peçonha de *G. cerrado* possuem o motivo estrutural ICK (“*inhibitory cysteine knot*”) frequentemente observado em neurotoxinas de aranhas (Bosmans *et al.*, 2006; Sollod *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2000). Estudos sobre a interação de toxinas de aranhas com canais para K^+_v abrange um mapa de características requeridas para a funcionalidade das superfícies dessas moléculas (Huang *et al.*, 2007; Swartz *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos com o emprego do algoritmo FFAS03 revelou homologia estrutural entre as sequências de GcTx2 e 3 e o molde a hanatoxina 1 (HaTx1). Assim como a hanatoxina 1, o modelo dos peptídeos GcTx2 e 3 revelaram uma estrutura compacta consistindo em duas folhas β paralelas e uma α hélice ligadas por três pontes dissulfeto (Figura 24). Por outro lado, os peptídeos GcTx2 e 3 não apresentam a díade, K22 e R3, de resíduos candidatos a funcionalidade da hanatoxina 1 em canal $K_v2.1$, onde a Lisina é substituída por uma Leucina. As diferenças da composição da díade observadas entre diversas toxinas bloqueadoras de canais para K^+_v não representa um determinante único dos fatores envolvidos na interação com o canal iônico, uma vez que, os resíduos diferenciais possam favorecer uma diversidade de ligações com os segmentos dos canais iônicos (Alessandri-Haber *et al.*, 1999; Cotton *et al.*, 1997).

As superfícies hidrofóbicas de HaTx e sua homóloga SGTx1 são compostas dos resíduos Y4, L5, F6, Y27 e W30, onde os aminoácidos aromáticos (Y4, F6 e W30) estão situados em volta de L5, constituindo um cinto de cargas. Os peptídeos GcTx2 e 3 possuem uma superfície hidrofóbica composta por resíduos que são equivalentes para a formação do cinto de cargas (W4, F6 e W28) situados em volta da M5.

Foram evidenciadas em outras toxinas com ação em canais para K^+_v a presença de um anel de resíduos básicos que pode desempenhar um papel essencial na interação entre essas moléculas, por exemplo, a Pi1, Pi2 e Pi4 da peçonha do escorpião *Pandinus imperator* (Mouhat *et al.*, 2004; M'Barek *et al.*, 2003) que atuam em canais $K_v1.2$ nas quais o cinto de cargas é formado por quatro resíduos básicos (R ou L). No entanto, não se pode descartar a ocorrência de variações de resíduos que compõem o anel básico para outras toxinas. Por essa razão, estudos experimentais foram conduzidos para avaliar as implicações do anel básico no reconhecimento do canal iônico. Foi observado que mutações pontuais podem comprometer grandemente a afinidade do peptídeo com o canal ou produzir efeitos poucos significativos (Mouhat *et al.*, 2004).

O cinto de cargas presente na HaTx confere a toxina a habilidade de se comportar como uma molécula anfipática, propiciando interações com os fosfolídeos através das cargas dos resíduos e com a cadeia alquil através dos resíduos aromáticos (Li *et al.*, 2003; Li-Smerin *et al.*, 2000; Lou *et al.*, 2002; Nishizawa & Nishizawa, 2006; Shiau *et al.*, 2003; Silverman *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2000; Takeuchi *et al.*, 2002). Essa propriedade anfipática da hanatoxina aparentemente é observada para a maioria das toxinas de aranhas moduladoras de canais para K^+_v (Escoubas *et al.*, 2002; Shiau *et al.*, 2003). De acordo com o modelo de mecanismo adotado pela HaTx para atuar em canais para K^+_v , e as substituições de resíduos polares por apolares, a interação de GcTx1-3 com as subunidades transmembrânicas dos canais iônicos pode ser diferente, refletindo na afinidade e, conseqüentemente, nos efeitos desses peptídeos sobre os canais para K^+_v .

Através da técnica de *whole-cell patch clamp* foi verificada a atividade dos peptídeos GcTx1-3 sobre a corrente de íons dos canais para potássio presentes nos cardiomiócitos isolados de camundongos. GcTx1-3. Na concentração de 3 μ M, provocaram um efeito na despolarização da membrana de canais para potássio, mas não houve ação sobre as correntes, no momento em que a membrana foi hiperpolarizada até

-120 mV, voltagem na qual as correntes de potássio de canais da família de retificadores de entrada (K_{ir}) são observadas (Monsuez, 1997). Portanto, é possível supor que os peptídeos atuaram sobre os canais para K^+_v presentes em cardiomiócitos promovendo o aumento das correntes de K^+ (I_{to} e I_K). Segundo dados da literatura e o Guide of Annual of British Pharmacological Society (2010), essa ação de aumento na condutância K^+ dos subtipos $K_v4.2$, $K_v4.3$, $K_v1.4$ e $K_v1.2$ de cardiomiócitos (Tabela 3) nunca foi descrito para toxinas isoladas de peçonha de aranhas.

Tabela 3. Canais e genes correspondentes às correntes de K^+ cardíacas.

Correntes	Subunidade do Canal	Gene
I_{to-epi}	Kv4.2 subunidade α	<i>KCND2</i>
	Kv4.3 subunidade α	<i>KCND3</i>
$I_{to-endo}$	Kv1.4 subunidade α	<i>KCNA4</i>
	Kv β 1.2 subunidade β	<i>KCNAB1</i>
	HERG1 subunidade α	<i>KCNH1</i>
I_{Kr}	HERG1 b subunidade α	<i>KCNH1</i>
	MiRP1	<i>KCNE2</i>
I_{Ks}	<i>KvLQT1</i> subunidade α	<i>KCNQ1</i>
	<i>Mink</i>	<i>KCNE1</i>
I_{Kur}	Kv1.5 subunidade α	<i>KCNA5</i>

Retirado de Strauss *et al.* (2001).

As células cardíacas possuem um vasto repertório de correntes de K^+ (Snyders, 1999; Barry & Nerbonne, 1996):

- Corrente transiente de saída (I_{to}) provoca uma rápida ativação e inativação de canais para potássio voltagem dependentes (K_v). Essas correntes respondem pelo início da repolarização (Fase I);

- Correntes transientes (I_K) é uma ativação lenta ou não ativação da corrente de K^+ ativadas por voltagem responsável pela iniciação da repolarização do potencial de ação (Fase 3);

- Retificadores de correntes de entrada (I_{Ki}) passam correntes de saída (repolarização) sobre uma gama limitada de correntes de potenciais de membrana. Essas correntes desempenham um papel importante nos estágios de repolarização e no controle do potencial de repouso da membrana.

Teoricamente, componentes que são capazes de prolongar o potencial de ação cardíaco e o período refratário devem possuir a habilidade de prevenir a excitação prematura de células cardíacas e diminuir a incidência de arritmias (Wickenden, 2002). Sendo assim, o efeito dos peptídeos GcTx1-3 sobre as correntes I_K comprometeu o controle da duração do potencial de ação de canais para K^+_v presentes em cardiomiócitos de camundongos, e pode ser visto como uma possível ferramenta na investigação de agentes anti-arritmia.

Sob o aspecto biológico, o efeito de toxinas de aranhas sobre mamíferos pode ser justificado pela proteção contra ataques, resultando na homologia de moléculas-alvo entre os membros de diferentes táxons e realizando necessárias exigências estruturais para ligantes em receptores correspondentes (Vassilevski *et al.*, 2009).

A análise de mobilidade gasosa do peptídeo Gc32.1 identificou uma provável dimerização. Embora, não tenham sido realizados estudos de mobilidade gasosa para os peptídeos Gc32.2, Gc32.3 e Gc33.1 é possível sugerir que esses peptídeos possuam a capacidade de formação de dímero devido a identidade >90% de sequência primária.

Foram reportadas formações de dímeros em toxinas isoladas de serpentes, tais como: a iriditoxina da cobra d'água marrom *Boiga irregularis* e a α -cobrotoxina de *Naja kaouthia* (Osipov *et al.*, 2008; Pawlak *et al.*, 2006; Pawlak *et al.*, 2008). A iriditoxina é uma potente neurotoxina pós-sináptica, no entanto, não foi observado o efeito individual das subunidades na neurotoxicidade permanece sem elucidação (Pawlak *et al.*, 2006; Pawlak *et al.*, 2008). No caso da α -cobrotoxina, existe a hipótese de que os resíduos de cisteínas devem estar envolvidos na dimerização, uma vez que, a ligação da ponte dissulfeto no segundo “loop” foi encontrada intacta. Funcionalmente, o heterodímero da α -cobrotoxina atua em tecido muscular e não apresenta atividade citotóxica. Enquanto que o homodímero reconhece nAChR neuronal e é considerado um análogo da κ -bungarotoxina. Assim, a dimerização nestas toxinas conduz ao reconhecimento de novas zonas funcionais. No entanto, não há indícios de que esta mudança funcional possa implicar significativamente nas propriedades farmacológicas da peçonha devido a sua baixa incidência (<0,1%) (Osipov *et al.*, 2008).

Diante disso, é razoável supor que os peptídeos GcTx1-3 possuem as propriedades estruturais típicas para a interação com canais para potássio, no entanto, as diferenças na superfície dessas moléculas pode explicar o aumento das correntes de K^+

resultantes do prolongamento da ativação dos canais para K^+ , através do retardo na inativação ou no aumento da probabilidade de abertura do canal. Além disso, a formação de dímero pode estar envolvida no reconhecimento de regiões de ligação do peptídeo com o canal iônico.

No que diz respeito aos componentes de alta massa molecular encontrada na peçonha de *Gyruita cerrado*, foi detectada a presença de atividade hialuronidásica nas frações Gc34 e 35. Hialuronidases são comuns na peçonha de aranhas (Rash & Hodgson, 2002), incluindo espécies terafosídeos, e são conhecidas por possuírem a função de facilitador da difusão de toxinas da peçonha (Schanbacher *et al.*, 1973; Savel-Niemann, 1989). A análise em sistema ESI/MALDI – SYNAPT – Waters mostrou que as enzimas possuem a massa molecular de 42 kDa, que é similar as enzimas encontradas na peçonha da aranha funil *Hippasa partida* (Nagaraju *et al.*, 2007), *Loxosceles* spp. (41–44 kDa) (Barbaro *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2007), das aranhas caranguejeiras *Dugesiella hentzi* (39.6 kDa) (Schanbacher *et al.*, 1973) e *Vitalius dubius* (45 kDa) (Rocha & Silva *et al.*, 2009).

7. Conclusões

O presente trabalho avaliou a composição química da peçonha de *G. cerrado* visando à identificação de componentes bioativos. A combinação das técnicas de cromatografia líquida de alta performance e de espectrometria de massa propiciou o conhecimento sobre a diversidade da composição da peçonha através das frações cromatográficas obtidas, da inspeção das massas moleculares e da determinação das estruturas primárias.

Foram isolados sete componentes da peçonha de *G. cerrado*. Os peptídeos caracterizados quimicamente nesse trabalho possuem estrutura primária inédita e similaridade com outras toxinas presentes na peçonha de aranhas com atividade inseticida ou ação em canais para potássio. Além disso, foi descrita pela primeira vez para neurotoxinas de peçonha de aranha, um efeito de aumento da corrente K^+ em canais para K^+_v de cardiomiócitos isolados de camundongos provocada pelos peptídeos GcTx1-3 na concentração de 3 μ M. Sendo assim, se faz necessário ensaios eletrofisiológicos adicionais para determinar com quais subtipos de canais para potássio presentes em cardiomiócitos esses peptídeos interagem, bem como, estudos que forneçam subsídios para a elucidação do mecanismo de ação destes.

Os modelos moleculares e a simulação da dinâmica em ambiente solvatado de GcTx2 e 3 forneceram importantes indícios sobre a estrutura 3D que esses peptídeos adotam e das propriedades das superfícies que interagem com canais iônicos. As ferramentas de bioinformática disponíveis são interessantes na indicação dos mecanismos envolvidos nas interações intermoleculares, dessa forma simulações da dinâmica de GcTx1-3 com canais para K^+_v podem prover dados que auxiliem para experimentos *in situ*.

Foi detectada a presença de atividade hialuronidásica na peçonha de *G. cerrado* através de zimografia. Os componentes com a função de hidrolisar ácido hialurônico são duas proteínas de alta massa molecular (42 kDa). Ensaio zimográfico adicionais e outras estratégias podem ser usados para caracterização biofísica das hialuronidasas como, por exemplo, difusão celular para detectar ambientes e co-fatores envolvidos na atividade enzimática.

Portanto, é possível concluir que a caracterização química e farmacológica de componentes da peçonha de *G. cerrado* apresentou dados relevantes para a ampliação de estudos toxicológicos utilizando peçonhas de aranhas.

8. Referências Bibliográficas

- ADAMS, M. E., HEROLD, E. E., VENEMA, V. J. (1989). Two classes of channel specific toxins from funnel web spider venom. *J. Comp. Physiol.*, **164**: 333 – 342.
- ADAMS, M.E. (2004). Agatoxins: ion channel specific toxins from the American funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Toxicon*, **43**: 509–25.
- ALESSANDRI-HABER, N., LECOQ, A., GASPARINI, S., GRANGIER-MACMATH, G., JACQUET, G., HARVEY, A.L., DE MEDEIROS, C., ROWAN, E.G., GOLLA, M., MÉNEZ, A., CREST, M. (1999). Mapping the functional anatomy of BgK on K_v1.1, K_v1.2, and K_v1.3—clues to design analogs with enhanced selectivity. *J. Biol. Chem.*, **274(50)**: 35653–35661.
- ANDREU, D., RIVAS, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, **47**: 415– 433.
- BARBARO, K.C., KNYSACK, I., MARTINS, R., HOGAN, C., WINKEL, K. (2005). Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon*, **45**: 489–99.
- BARRY, D.M., NERBONNE, J.M. (1996). Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annu. Rev. Physiol.*, **58**: 363– 394.
- BOSMANS, F., SWARTZ, K.J. (2010). Targeting voltage sensors in sodium channels with spider toxins. *Trends in Pharmacol. Sciences*, **31(4)**: 175-182.
- 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. *Mol. Pharmacol.*, **69**: 419 – 429.
- BOTZKI, A., RIGDEN, D.J., BRAUNT, S., NUKUI, M., SALMENT, S., HOECHSTTER, J., BERNHARDT, G., DOVE, S., JEDRZEJAS, M.J., BUSCHAUER, A. (2004). l-Ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor, X-Ray structure and molecular modeling of enzyme–inhibitor complexes. *J. Biol. Chem.*, **279**: 45990–45997.

- BRAFF, M.H., GALLO, R.L. (2006). Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **306**: 91–110.
- BRANTON W. D., KOLTON L., JAN Y. N. AND JAN L. Y. (1987) Neurotoxins from *Plectreurys* spider venom are potent presynaptic blockers in *Drosophila*. *J. Neurosci.*, **7**: 4195–4200.
- BRUSCA, R.C., BRUSCA, G.J. (2003). **Invertebrates**. 3^o Ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 936 pp.
- BUDNIK, B. A., OLSEN, J. V., EGOV, 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*. *J. Mass Spectrom.*, **39**: 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.
- CATTERALL, W. A. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**: 493-531.
- CATTERALL, W.A, CESTÉLE, S., YAROV-YAROVOYA, V., YUA, F.H., KONOKIA K., AND SCHEUERA, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, **49**: 124-141.
- CESAR, L.M.M., TORMENA, C.F., MARQUES, M.R., SILVA, GIL V.J., MENDES, M.A., RITTNER, R., PALMA, M.S. (2005). Structure determination of hydroxytripargine: a new tetrahydro-beta-carboline toxin from the venom of the spider *Parawixia bistrriata*. *Helv. Chim. Acta*, **88**: 796–800.
- 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. *J. Chromat. A*, **1043**: 9–18.
- CORDEIRO, M.N., DINIZ, C.R., VALENTIM, A.C., EICKSTEDT, V.R.D., GILROY, J., RICHARDSON, M. (1992). The purification and amino acid sequences of four

- Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. (Keys). *FEBS Lett.*, **310**: 153-156.
- CORZO, G., ESCOUBAS, P., STANKIEWICZ, M., PELHATE, M., KRISTENSEN, C. P., NAKAJIMA, T. (2000). Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-paulatoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paradoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). *Europea J. Bioch.*, **267**: 5783 – 5795.
- CORZO, G., VILLEGAS, E., GOMEZ-LAGUNAS, F., POSSANI, L. D., BELOKONEVA, O. S., NAKAJIMA, T. (2002). Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *The J. Biol. Chem.*, **277**: 23627 – 23637.
- CORZO, G., ESCOUBAS, P. (2003). Pharmacologically active spider peptide toxins. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, **60**: 2409-2426.
- CORZO, G., DIEGO-GARCÍA, E., CLEMENT, H., PEIGNEUR, S., ODELL, G., TYTGAT, J., POSSANI, L.D., ALAGÓN A. (2008). An insecticidal peptide from the theraphosid *Brachypelma smithi* spider venom reveals common molecular features among spider species from different genera. *Peptides*, **29(11)**: 1901-8.
- CORZO, G., BERNARD, C., CLEMENT, H., VILLEGAS, E., BOSMANS, F., TYTGAT, J., POSSANI, L. D., DARBON, H., ALAGÓN, A. (2009). Insecticidal peptides from the theraphosid spider *Brachypelma albiceps*: an NMR-based model of Ba2. *Bioch. et Bioph, Acta, 1794(8)*: 1190 – 1196.
- COTTON, J., CREST, M., BOUET, F., ALESSANDRI, N., GOLA, M., FOREST, E., KARLSSON, E., CASTANEDA, O., HARVEY, A.L., VITA, C., MÉNEZ, A. (1997). A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, an inhibitor for K_v1 channels Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. *Eur. J. Biochem.*, **244(1)**: 192–202.
- DA SILVEIRA, R.B., PIGOZZO, R.B., CHAIM, O.M., APPEL, M.H., DREYFUSS, L.J., TOMA, L., MANGILI, O.C., GREMSKI, W., DIETRICH, C.P., NADER, H.B., VEIGA, S.S. (2006). Molecular cloning and functional characterization of

- two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. *Biochimie*, **88**: 1241–1253.
- DA SILVEIRA, R.B.D., CHAIMA, O.M., MANGILIC, O.C., GREMSKI, W., DIETRICH, C.P., NADER, H.B., VEIGA, S.S. (2007). Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom are endo- β -N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon*, **49**: 758–768.
- DeLano, W.L (2002). The pymol molecular graphics system 0.9 edit. **DeLano Scientific, San Carlos.**
- DEVARAJA, S., NAGARAJU, S., MAHADESWARASWAMY, Y. H., GIRISH, K. S., KEMPARAJU, K. (2008). A low molecular weight serine protease: Purification and characterization from *Hippasa agelenoides* (funnel web) spider venom gland extract. *Toxicon*, **52**: 130 – 138.
- DIOCHOT, S., DRICI, M. D., MOINIER, D., FINK, M., LAZDUNSKI, M. 1999. Effects of phrixotoxins on the K_v4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis. *British J. of Pharmacol.*, **126**: 251 – 263.
- DUBOVSKII, P. V., VOLYNSKY, P. E., POLYANSKY, A. A., CHUPIN, V. V., EFREMOV, R. G., ARSENIIEV, A. S. (2006). Spatial Structure and Activity Mechanism of a Novel Spider Antimicrobial Peptide. *Biochemistry*, **45**: 10759 – 10767.
- EBBINGHAUS, J., LEGROS, C., NOLTING, A., GUETTE, C., CELERIER, M. L., PONGS, O., BAHRING, R. (2004). Modulation of K_v4.2 channels by a peptide isolated from the venom of the giant bird-eating tarantula *Theraphosa leblondi*. *Toxicon*, **43**: 923 – 932.
- EL-SAFORY, N.S., FAZARY, A.E., LEE, C.K. (2010). Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers*, **81**: 165–181.
- EPAND, R.M., VOGEL, H.J. (1999). Diversity of antimicrobials peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**: 11 – 28.

- ESCOUBAS, P., WHITELEY, B. J., KRISTENSEN, C. P., CÉLÉRIER, M. L., CORZO, G., NAKAJIMA, T. (1998). Multidimensional peptide fingerprinting by High Performance Liquid Chromatography, Capillary Zone Electrophoresis and Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry for the identification of tarantula venom samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **12**: 1075 – 1084.
- ESCOUBAS, P., CORZO, G., WHITELEY, B. J., CÉLÉRIER, M. L., NAKAJIMA, T. (1999). HPLC and MALDI-TOF-MS study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms. *Proceedings of the 5th Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins*, 37.
- ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CORZO, G. (2000). Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochemistry*, **82**: 893-907.
- ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CELERIER, M.L., NAKAJIMA, T., LAZDUNSKI, M. (2002). Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the K_v2 and K_v4 subfamilies. *Mol. Pharmacol.*, **62**: 48-57.
- ESCOUBAS, P., RASH, L. (2004). Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, **43**: 555 – 574.
- ESCOUBAS, P., SOLLOD, B., KING, G. F. (2006). Venom landscapes: Mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*, **47**: 650 – 663.
- ESTRADA, G., VILLEGAS, E., CORZO, G. (2007). Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Nat. Prod. Rep.*, **24**: 145-161.
- FRY, B.G., VIDAL, N., NORMAN, J.A., VONK, F.J., SCHEIB, H., RAMJAN, S.F., KURUPPU, S., FUNG, K., HEDGES, S.B., RICHARDSON, M.K., HODGSON, W.C., IGNJATOVIC, V., SUMMERHAYES, E. AND KOCHVA, E. (2006). Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*, **439**: 584–588.
- GENTZ, M.C., JONES, A., CLEMENT, H., KING, G.F. (2009). Comparison of the peptidome and insecticidal activity of venom from a taxonomically diverse group of theraphosid spiders. *Toxicon*, **53**: 496 – 502.

- GERSCHMAN de PIKELIN, B.S. and Schiapelli, R.D. (1973). La subfamilia "Ischnocolinae" (Araneae: Theraphosidae). *Rev. Mus. Cienc. Nat. Buenos Aires*, **4(2)**: 43-77.
- GINALSKI, K., ELOFSSON, A., FISCHER, D., RYCHLEWSKI, L. (2003). 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinfo*, **19**: 1015–1018.
- GOMEZ, M.V., KALAPOTHAKIS, E., GUATIMOSIM, C., PRADO, M.A. (2002). *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol.*, **22**: 579–88.
- GOMES, P.C., SOUZA, B.M., DIAS, N.B., CESAR-TOGNOLI, L.M.M., SILVA-FILHO, L.C., TORMENA, C.F., RITTNER, R. RICHARDSON, M., CORDEIRO, M.N., PALMA, M. (2010). Nigriventrine: A low molecular mass neuroactive compound from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, **57(2)**: 266-74.
- GIRISK, KS, KEMPARAJU, K. (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.*, **80**: 921–43.
- GUADANUCCI, J.P.L., LUCAS, S.M., INDICATTI, R. P., YAMAMOTO, F.U. (2007). Description of *Guyruita* gen.n. and two new species (Ischnocolinae, Theraphosidae). *Rev. Brasil. de Zool.*, **24**: 991-996.
- Guide of Annual of British Pharmacological Society – Ionic Channel. (2010). Disponível em: <http://www.brjpharmacol.org/view/0/index.html>.
- HAEBERLI, S., KUHN-NENTWIG, L., SCHALLER, J., NENTWIG, W. (2000). Characterization of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Toxicon*, **38**: 373–380.
- HAUPT, J. (2003). The Mesothelae – a monograph of an exceptional group of spiders (Araneae: Mesothelae). *Zool. (Stuttgart)*, **154**: 1-101.
- HERRINGTON, J., ZHOU, Y.P., BUGIANESI, R.M., DULSKI, P.M., FENG, Y., WARREN, V.A., *et al.*, (2006). Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic beta-cells enhance glucose-dependent insulin secretion. *Diabetes*, **55**: 1034–1042.

- HILLE, B. (2001). **Ion Channels of Excitable Membranes**, Third ed. Sinauer, Sunderland, pp. 131–160, 611–614.
- HUANG, P.T., SHIAU, Y.S., LOU, K.L. (2007). The interaction of spider gating modifier peptides with voltage-gated potassium channels. *Toxicon*, **49**: 285–292.
- HUANG, P.T., CHEN, T.Y., TSENG, L.J., LOU, K.L., LIOU, H.H., LIN, T.B., SPATZ, H.C., SHIAU, Y.Y. (2002). Structural influence of hanatoxin binding on the carboxyl terminus of S3 segment in voltage-gated K(+) -channel K_v2.1. *Recept. Channel.*, **8**: 79–85.
- HUNT, D. F. *et al.* (1986). Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 6233–6237.
- JAROSZEWSKI, L., RYCHLEWSKI, L., LI, Z., LI, W., GODZIK, A. (2005). FFAS03: a server for profile-profile sequence alignments. *Nucleic Acids Res.*, **33**: 284–288.
- JIANG, Y., LEE, A., CHEN, J., RUTA, V., CADENE, M., CHAIT, B.T., MACKINNON, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **423**: 33–41.
- ISBISTER, G.K., WHITE, J. (2004). Clinical consequences of spider bite: recent advances in our understanding. *Toxicon*, **43**: 477–492.
- KAISER, I.I., GRIFFIN, P.R., AIRD, S.D., HUDIBURG, S., SHABANOWITZ, J., FRANCIS, B., JOHN, T.R., HUNT, D.F., ODELL, G.V. (1994). Primary structures of two proteins from the venom of the Mexican red knee tarantula (*Brachypelma smithii*). *Toxicon*, **32**: 1083-1093.
- KIM, J. I., KONISHI, S., IWAI, H., KOHNO, T., GOUDA, H., SHIMADA, I., SATO, K., ARATA, Y. (1995). Three-dimensional Solution Structure of the Calcium Channel Antagonist [omega]-Agatoxin IVA: Consensus Molecular Folding of Calcium Channel Blockers. *J. Mol. Biol.*, **250**: 659 – 671.
- KING, G.F., TEDFORD, H.W., MAGGIO, F. (2002). Structure and function of insecticidal neurotoxins from Australian funnel-web spiders. *J. Toxicol. Toxin Rev.*, **21**: 359–389.

- KING, G.F. (2004). The wonderful world of spiders: preface to the special toxicon issue on spider venoms. *Toxicon* **43**: 471–476.
- KING ,G.F., ESCOUBAS, P., NICHOLSON, G.M. (2008). Peptide toxins that selectively target insect Na(V) and Ca(V) channels. *Channels (Austin)*, **2(2)**: 100–116.
- KUHN-NENTWIG, L. (2003). Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell. and Mol. Life Science*, **60(12)**: 2651 – 2668.
- KREIL, G., (1995). Hyaluronidases- a group of neglected enzymes. *Prot. Sci.*, **4**: 1666–1669.
- KUHN-NENTWIG, L., MULLER, J., SCHALLER, J., WALZ, A., DATHE, M. and NENTWIG, W. (2002) Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *J. Biol. Chem.*, **277**: 11208–11216.
- LAMPE, R.A. (1999). Analgesic peptides from the venom of *Grammostola spatulata* and use thereof. *US Patent*, **5**: 877-026.
- LAURENT, T.C. and FRASER, J.R.E. (1986). The properties and turnover of hyaluronan. In: Evered, D., Whelan, J. (Eds.). *Functions of the Proteoglycans*. Wiley, London.
- LEE, H.C., WANG, J.M., SWARTZ, K.J. (2003). Interaction between extracellular Hanatoxin and the resting conformation of the voltage-sensor paddle in K_v channels. *Neuron*, **40**: 527–536.
- LEE, S., LYNCH, K.R. (2005). Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochemistry J.*, **391**: 317–323.
- LEE, S.Y., MACKINNON, R. (2004). A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom. *Nature*, **430**: 232–235.
- LEIGH, W., RANJAN, A., ZHANG, H., MONZAVI, H., BOYKO, R.F.B., SYKES, B.D., WISHART, D.S. (2003). VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res*, **31**: 3316–3319.

- 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*. *FEBS Lett.*, **555**: 616–622.
- LI-SMERIN, Y., SWARTZ, K.J. (1998). Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca²⁺ and K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 8585–8589.
- LI-SMERIN, Y., SWARTZ, K.J. (2000). Localization and molecular determinants of the Hanatoxin receptors on the voltage-sensing domains of a K(+) channel. *J. Gen. Physiol.*, **115**: 673–684.
- LIANG, S. (2004). An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)]. *Toxicon*, **43**: 575–85.
- LIAO, Z., CAO, J., LI, S., YAN, X., HU, W., HE, Q., CHEN, J., TANG, J., XIE, J., LIANG, S. (2007). Proteomic and peptidomic analysis of the venom from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Proteomics*, **7**: 1892-1907.
- LIMA, M.E., FIGUEIREDO, S.G., PIMENTA A.M.C., SANTOS, D.M., BORGES, M.H., CORDEIRO, M.N., RICHARDSON, M., OLIVEIRA, L.C., STANKIEWICZ, M., PELHATE, M. (2007). Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Compar. Biochem. Physiol.*, **Part C** **146**: 264–279.
- LOU, K.L., HUANG, P.T., SHIAU, Y.S., SHIAU, Y.Y. (2002). Molecular determinants of the hanatoxin binding in voltage-gated K⁺-channel drk1. *J. Mol. Recognit.*, **15**: 175–179.
- MARQUES, M.R., MENDES, M.A., TORMENA, C.F., SOUZA, B.M., CÉSAR, L.M.M., RITTNER, R., PALMA, M.S. (2005). Structure determination of a tetrahydro-b-carboline of arthropod origin: a novel alkaloid toxin subclass from the web of spider *Nephila Clavipes*. *Chem. Biodivers.*, **2**: 525–534.
- MARVIN, L., DE E., COSETTE, P., GAGNON, J., MOLLE, G., LANGE, C. (1999). Isolation, amino acid sequence and functional assays of SGTx1. The first toxin

- purified from the venom of the spider *Scodra griseipes*. *Eur. J. Biochem.*, **265**: 572-579.
- M'BAREK, S., MOSBAH, A., SANDOZ, G., FAJLOUN, Z., OLAMENDI-PORTUGAL, T., ROCHAT, H., SAMPIERI, F., GUIJARRO, J.I., MANSUELLE, P., DELEPIERRE, M., DE WAARD, M., SABATIER, J.M. (2003). Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* **270(17)**: 3583–3592.
- McCORMICK, K.D., MEINWALD, J. (1993). Neurotoxic acylpoliamines from spider venom. *J. Chem. Ecol.* **19**: 2411-2451.
- MEBS, D. (2002). **Venomous and Poisonous Animals: A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists**, Medpharm.
- MIDDLETON, R.E., WARREN, V.A., KRAUS, R.L., HWANG, J.C., LIU, C.J., DAI, G., BROCHU, R.M., KOHLER, M.G., GAO, Y.D., GARSKY, V.M., BOGUSKY, M.J., MEHL, J.T., COHEN, C.J., SMITH, M.M. (2002). Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. *Biochemistry* 41: 14734–14747.
- MIURA, R. O., YAMAGATA, S., MIURA, Y., HARADA, T., YAMAGATA, T. (1995). Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). *Analytical Biochemistry*, **225**: 333 – 340.
- MOUHAT, S., JOUIROB., B., MOSBAH, A., WAARD, M., SABATIER, J.M. (2004). Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.*, **378**: 717–726.
- MONSUEZ, J.J. (1997). Cardiac potassium currents and channels Part I: Basic science aspects. *Internat. J. Cardiol.* **61**: 209–219
- MURAKAMI, M.T., FERNANDES-PEDROSA, M.F., TAMBOURGI, D.V., ARNI, R.K. (2005). Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J. Biol. Chem.* **280**: 13658-13664.
- MURAD, A.M., RECH, E.L. (2010). Molecular dynamics simulations of the minor ampullate spideroin modular amino acid sequence from *Parawixia bistriatra*: insights

into silk tertiary structure and fibre formation. *J. Mol. Model.* DOI 10.1007/s00894-010-0823-4.

NAGARAJU, S., MAHADESWARASWAMY, K.S. GIRISH, KEMPARAJU, K. (2007). Venom from spiders of the genus *Hippasa*: Biochemical and pharmacological studies. *Comparat. Biochem. and Physiol.*, **Part C 144**: 1-9.

NICHOLSON, M. G. (2006). Spider venom peptides. In: Ed. Kastin, A.J. **Handbook of Biologically Active Peptides**. Academic Press is an imprint of Elsevier p.1641.

NISHIZAWA, M., NISHIZAWA, K. (2006). Interaction between K(+) channel gate modifier hanatoxin and lipid bilayer membranes analyzed by molecular dynamics simulation. *Eur. Biophys. J.*, **35**: 373–381.

OLIVEIRA, F.A., GUATIMOSIM, S., CASTRO, C.H., GALAN, D.T., LAUTON-SANTOS, S., RIBEIRO, A.M., ALMEIDA, A.P., CRUZ, J.S. (2007). Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiaminedeficient rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293(1)**: H394–401.

OSIPOV, A.V., KASHEVEROV, I.E., MAKAROVA, Y.V., STARKOV, V.G., VORONTSOVA, O.V., ZIGANSHIN, R.K., ANDREEVA, T.V., SEREBRYAKOVA, M.V., BENOIT, A., HOGG, R.C., BERTRAND, D., TSETLIN, V.I., UTKIN, Y.N. (2008). Naturally occurring disulphide-bound dimers of three-fingered toxins: a paradigm for biological activity diversification. *J. Biol. Chem.*, **283**: 14571–14580.

PALMA, M.S., NAKAJIMA, T. (2005). A natural combinatorial chemistry strategy in acylpolyamine toxins in nephilinae orb-web-spiders. *J. Toxicol. Toxin. Rev.*, **24(2)**: 209–234.

PAWLAK, J., MACKESSY, S.P., FRY, B.G., BHATIA, M., MOURIER, G., FRUCHART-GAILLARD, C., SERVENT, D., MENEZ, R., STURA, E., MENEZ, A., KINI, R.M. (2006). Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (Mangrove Catsnake) with bird-specific activity. *J. Biol. Chem.*, **281**: 29030–29041.

PAWLAK, J., MACKESSY, S.P., SIXBERRY, N.M., STURA, E.A., LE DU, M.H., MENEZ, R., FOO, C.S., MENEZ, A., NIRTHANAN, S., KINI, R.M. (2008).

- Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxonspecific neurotoxicity. *FASEB J.*, **23**: 534–545.
- PENG, K., SHU, Q., LIU, Z., LIANG, S. (2002). Function and solution structure of huwentoxin-IV, a potent neuronal tetrodotoxin (TTX)-sensitive sodium channel antagonist from chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J. Biol. Chem.*, **277**: 47564 – 47571.
- PLATNICK, N.I. (2010). **The world spider catalog, version 11.0**. American Museum of Natural History, New York. Online em <http://research.amnh.org/entomology/spider/catalog/index.html> - em 20/12/2010.
- QUISTAD, G.B., REUTER, C.C., SKINNER, W.S., DENNIS, P.A., SUWANRUMPHA, S., FU, E.W. (1991). Paralytic and insecticidal toxins from the funnel web spider, *Hololena curta*. *Toxicon*, **29**: 329 – 336.
- QUISTAD, G.B., LAM, W.W., CASIDA, J.E. (1993). Identification of bis(agmatine) oxalamine in venom from the primitive hunting spider *Plectreuris tristis* (Simon). *Toxicon*, **31**: 920–924.
- RASH, L.D., HODGSON, W.C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, **40**: 225-254.
- RAVEN, R.J. (1985). The spider intraorder Mygalomorphae (Araneae). Cladistics and systematics. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, **182**: 1-180.
- RICHARDSON, M., PIMENTA, A. M. C., BEMQUERER, M. P., SANTORO, M. M., BEIRAO, P. S. L., LIMA, M. E., FIGUEIREDO, S. G., BLOCH Jr, C., VASCONCELOS, E. A. R., CAMPOS, F. A. P., GOMES, P. C., CORDEIRO, M. N. (2006). Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comp. Biochem. and Physiol., Part C*, **142**: 173 – 187.
- ROCHA-E-SILVA, T.A.A., SUTTI, R., HYSLOP, S. (2009). Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon*, **53**: 153–161.

- ROGOZA, L. N., SALAKHUTDINOV, N. F., TOLSTIKOV, G. A. (2005). Polymethyleneamine Alkaloids of Animal Origin: II. Polyamine Neurotoxins. *R. J. of Bioorg. Chem.*, **32(1)**: 23–36.
- RUTA, V., JIANG, Y., LEE, A., CHEN, J., MACKINNON, R. (2003). Functional analysis of an archaebacterial voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **422**: 180–185.
- SAIDEMBERG, D.M., MARCO, A., FERREIRA, M.A.B., TAKAHASHI, T.N., GOMES, P.C., CESAR-TOGNOLI, L.M.M., DA SILVA-FILHO, L.C., TORMENA, C.F., DA SILVA, G.V. J., PALMA, M.S. (2009). Monoamine oxidase inhibitory activities of indolylalkaloid toxins from the venom of the colonial spider *Parawixia bistrriata*: functional characterization of PwTX-I. *Toxicon*, **54(6)**: 717–724.
- SANGUINETTI, M.C., JOHNSON, J.H., HAMMERLAND, L.G., KELBAUGH, P.R., VOLKMANN, R.A., SACCOMANO, N.A., ET AL. (1997). Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block K_v4.2 potassium channels. *Mol. Pharmacol.*, **51**: 491–498.
- SAVEL-NIEMANN, A. (1989). Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multicomponent system. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **370**: 485–498.
- SCHANBACHER, F.L., LEE, C.K., WILSON, I.B., HOWELL, D.E., ODELL, G.V. (1973). Purification and characterization of tarantula, *Dugesiella hentzi* (Girard) venom hyaluronidase. *Comp. Biochem. Physiol.*, **44B**: 389–396.
- SCHMALHOFER, W.A, CALHOUN, J., BURROWS, R., BAILEY, T., KOHLER, M.G., WEINGLASS, A.B., KACZOROWSKI, G.J., GARCIA, M.L., KOLTZENBURG, M., PRIEST, B.T. (2008). ProTx-II, a selective inhibitor of Na^v1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors. *Mol. Pharmacol.* **74**: 1476–1484
- SENFF-RIBEIRO, A., DA SILVA, P.H., CHAIM, O.M., GREMSKI, L.H., PALUDO, K.S., DA SILVEIRA, R.B., GREMSKI, W., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S. (2008). Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnol. Adv.*, **26**: 210–218.

- SHIAU, Y.S., HUANG, P.T., LIOU, H.H., LIAW, Y.C., SHIAU, Y.Y., LOU, K.L. (2003). Structural basis of binding and inhibition of novel tarantula toxins in mammalian voltage-dependent potassium channels. *Chem. Res. Toxicol.*, **16**: 1217–1225.
- SHIOYA, T. (2007). A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. *J. Physiol. Sciences*, **57 (6)**: 327–335.
- SHUSTER S, FROST GI, CSOKA AB, FORMBY B, STERN R. (2002). Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. *Int J Cancer.*, **102**: 192–7.
- 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.
- SILVERMAN, W.R., BANNISTER, J.P., PAPAZIAN, D.M. (2004). Binding site in eag voltage sensor accommodates a variety of ions and is accessible in closed channel. *Biophys. J.*, **87**: 3110–3121.
- SKINNER, W.S., ADAMS, M.E., QUISTAD, G.B., KATAOKA, H., CESARIN, B.J., ENDERLIN, F.E., SCHOOLEY, D.A. (1989). Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider *Agelenopsis aperta*. *J. Biol. Chem.*, **264**: 2150-2155
- SKINNER, W. S., DENNIS, P. A., LUI, A., CARNEY, R. L., QUISTAD, G. B. (1990). Chemical characterization of acylpolyamine toxins from venom of a trap-door spider and two tarantulas. *Toxicon*, **28**: 541 – 546.
- SMITH, J.J., CUMMINS, T.R., ALPHY, S., BLUMENTHAL, K.M. (2007). Molecular interactions of the gating modifier toxin ProTx-II with Na_v 1.5: implied existence of a novel toxin binding site coupled to activation. *J. Biol. Chem.*, **282**: 12687–12697.
- SNYDERS, D.J. (1999). Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.*, **42**: 377– 390.
- SOLLOD, B.L., WILSON, D., ZHAXYBAYEVA, O., GOGARTEN, J.P., DRINKWATER, R. (2005). Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides*, **261**: 131–139.

- 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*. *J. Biol. Chem.*, **265**: 2054-2059.
- STRAUSS, C.H., MORALES, M.J., WANG, S., BRAHMAJOTHI, M.V., DONALD L. CAMPBELL, D.I. (2001). Voltage-Dependent K⁺ Channel. In: **Heart Physiology and Pathophysiology**, Fourth Edition, Elsevier Inc. Edited by: Sperelakis, N., Kurachi, Y., Terzic, A., Michael V. Cohen, M.V.
- SWARTZ, K.J., MACKINNON, R. (1995). An inhibitor of the K_v2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron*, **15**: 941-949.
- SWARTZ, K.J., MACKINNON, R. (1997a). Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. *Neuron*, **18**: 665–673.
- SWARTZ, K.J., MACKINNON, R. (1997b). Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage- dependent K⁺ channels. *Neuron*, **18**: 675–682.
- SWARTZ, K.J. (2007). Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon*, **49**: 213–230.
- USHKARYOV, Y.A., VOLYNSKI, K.E., ASHTON, A.C. (2004). The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon*, **43**: 527–42.
- TAGGI, A.E., MEINWALD, J., SCHROEDER, F.C. (2004). A new approach to natural products discovery exemplified by the identification of sulfated nucleosides in spider venom. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**: 0364–10369.
- TAKEUCHI, K., KIM, J.I., TAKAHASHI, H., SWARTZ, K., SHIMADA, I., (2002). Solution structure of w-grammotoxin SIA, a gating modifier of P/Q and N type calcium channels. *J. Mol. Biol.*, **321**: 517–526.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research.*, **22**: 4673 – 4680.

- TAKAHASHI, H., KIM, J. I., MIN, H. J., SATO, K., SWARTZ, J. K., SHIMADA, I. (2000). Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels: common surface features of gating modifier toxins. *J. Mol. Biol.*, **297**(3): 771 – 780.
- TEDFORD, H.W., SOLLOD, B.L., MAGGIO, F., KING, G.F. (2004). Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. *Toxicon*, **43**: 601–18.
- VAN DER SPOEL, D., LINDAHL, E., HESS, B., GROENHOF, G., MARK, A.E, BERENDSEN, H.J. (2005). Gromacs: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.*, **26**: 1701–1718.
- VASSILEVSKI, A. A., KOZLOV, S. A., GRISHIN, E. V. (2009). Molecular Diversity of Spider Venom. *Biochemistry*, **74** (13): 1505-1534.
- VETTER, R. S., ISBISTER, G. K. (2008). Medical aspects of spider bites. *Annual Review of Entomology*, **53**: 409 – 429.
- VILLEGAS, E., CORZO, G. (2005). Pore forming peptides from Spiders. *Toxin Reviews*, **24**: 347 – 359.
- WANG, X. H., CONNOR, M., WILSON, D., WILSON, H. I., NICHOLSON, G. M., SMITH, R., SHAW, D., MACKAY, J. P., ALEWOOD, P. F., CHRISTIE, M. J., KING, G. F. (2001). Discovery a structure of a potent and highly specific blocker of insect calcium channels. *J. of B. Chem.*, **276**: 40306 – 40312.
- WICKENDEN, A.D. (2002). K⁺ channels as therapeutic drug targets. *Pharmacology & Therapeutics*, **94**: 157– 182
- WINTERFIELD, J.R., SWARTZ, K.J. (2000). A hot spot for the interaction of gating modifier toxins with voltage-dependent ion channels. *J. Gen. Physiol.*, **116**: 637– 644.
- XU, K., JI, Y., QU, X. (1989). Purification an characterisation of an antimicrobial peptide from venom *Lycosa singoriensis*. *Acta Zool. Sin.*, **35**: 300-305.
- YAN, L., ADAMS, M.E. (1998). Lycotoxins, Antimicrobial Peptides from Venom of the Wolf Spider *Lycosa carolinensis*. *The J. Biol. Chem.*, **273**: 2059–2066.

YUAN, C-H., HE, Q-Y., PENG, K., DIAO, J-B., JIANG, L.P., TANG, X., LIANG, S-P. (2008). Discovery of a Distinct Superfamily of Kunitz-Type Toxin (KTT) from Tarantulas. *PLoS ONE*, **3(10)**: e3414.

ZARAYSKIY, V.V., BALASUBRAMANIAN, G., BONDARENKO, V.E., MORALES, M.J. (2005). Heteropoda toxin 2 is a gating modifier toxin specific for voltage-gated K⁺ channels of the K_v4 family. *Toxicon.*, **45(4)**: 431-42.