



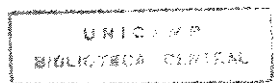
Caracterização bioquímica e farmacológica de polipeptídeos do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

9611702
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Antonio Carlos Bento e aprovada pela Comissão Julgadora.

22/05/96

Aluno - Antonio Carlos Bento
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Biologia - UNICAMP
Orientador - Prof. Dr. Gilberto de Nucci
Departamento de Farmacologia
Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP
Campinas - SP



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

B446c

Bento, Antonio Carlos

Caracterização bioquímica e farmacológica de polipeptídeos do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* / Antonio Carlos Bento -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Gilberto de Nucci.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Aranha-Veneno. 2. *Phoneutria nigriventer*.
3. Calicreína. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência.
I. Nucci, Gilberto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

| | |
|-------------|---|
| UNIDADE | BC |
| N.º CHAMADA | T/Unicamp |
| | B446c |
| V.º | 6728173 |
| DATA | 667/96 |
| | <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/> X |
| PREÇO | 8811,00 |
| DATA | 10/08/96 |
| N.º CPD | 0.000.91.436-1 |

LOCAL E DATA: Campinas, 22 de maio de 1996

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci
(orientador)



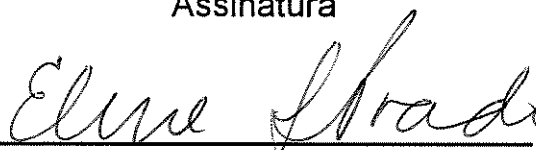
Assinatura

Profa. Dra. Regina Célia Spadari



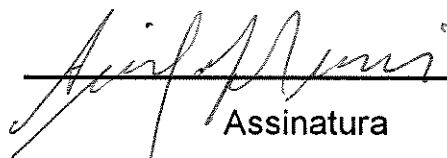
Assinatura

Profa. Dra. Eline S. Prado



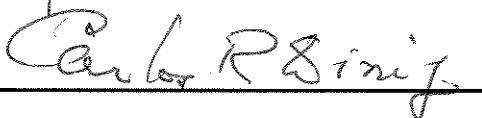
Assinatura

Prof. Dr. Anibal E. Vercesi



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Ribeiro Diniz



Assinatura

SUPLENTES:

Profa Dra. Vera von Eickstedt

Assinatura

Pro. Dr. Antonio Carlos Boschero

Assinatura

Aos meus pais, Lázaro Bento e

Antonia Kitazawa Bento.

À minha noiva Sueli Baena Alcalde.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci por sua dedicação, ensinamentos e acima de tudo por sua amizade.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, por sua inestimável colaboração no desenvolvimento desta tese.

Aos Profs. Drs. Benedito de Oliveira, Sérgio Marangoni, José Camillo Novello, pela acolhida no Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP.

Aos docentes, colegas pós-graduandos e funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, pela colaboração e amizade.

Ao pós-graduando Evandro José Lima Rego pela sua colaboração.

AGRADECEMOS TAMBÉM

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro.

| | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE DE ABREVIACÕES | 7 |
| ÍNDICE DE ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDOS | 9 |
| ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES | 10 |
| RESUMO | 11 |
| SUMMARY | 13 |
| INTRODUÇÃO | 15 |
| OBJETIVOS | 22 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| RESULTADOS | 32 |
| DISCUSSÃO | 52 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |

ABREVIACÕES

| | |
|-------------|---|
| ATZ | Anilinoiazolinona |
| DTT | Ditiotreitol |
| HIST | Histamina |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta pressão |
| kDa | Kilodalton |
| PITC | Fenilisocianato |
| PNV | Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i> |
| PNVd | Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i> dializado |
| PTH | Feniltioidantoína |
| PTH-S-CMCYs | Feniltioidantoína-S-carboximetil cisteína |
| RbCC | Corpo cavernoso de coelho |
| RbMesV | Veia mesentérica de coelho |
| RbPA | Artéria pulmonar de coelho |
| RbVC | Veia cava de coelho |
| SBTI | Inibidor de tripsina de soja |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |

| | |
|------|--------------------------------|
| TFA | Ácido trifluoro acético |
| TMA | Trimetilamina |
| TRIS | Tris-hidroximetil amino metano |

ABREVIÇÕES PARA AMINOÁCIDOS

| Aminoácidos | Abreviação (três letras) | Símbolo (uma letra) |
|-----------------|--------------------------|---------------------|
| Alanina | Ala | A |
| Arginina | Arg | R |
| Asparagina | Asn | N |
| Ácido aspártico | Asp | D |
| Cisteína | Cys | C |
| Glutamina | Gln | Q |
| Ácido glutâmico | Glu | E |
| Glicina | Gly | G |
| Histidina | His | H |
| Isoleucina | Ile | I |
| Leucina | Leu | L |
| Lisina | Lys | K |
| Meteonina | Met | M |
| Fenilalanina | Phe | F |
| Prolina | Pro | P |
| Serina | Ser | S |
| Treonina | Thr | T |
| Triptofano | Trp | W |
| Tirosina | Tyr | Y |
| Valina | Val | V |

| ILUSTRAÇÃO | Página |
|---|---------------|
| Figura 1: Fracionamento do PNV em Sephadex G-10. | 37 |
| Figura 2: Cromatografia por troca iônica da fração ativa S ₁ | 38 |
| Figura 3: Aumento da permeabilidade vascular induzido pela fração C-XIII em pele de coelho. | 39 |
| Figura 4: Esquema de superfusão de músculo liso em cascata. | 40 |
| Figura 5: Cromatograma por fase reversa da fração C-VII+VIII | 41 |
| Figura 6: Atividade espasmogênica do PNV1 . | 42 |
| Figura 7: Eletroforese do PNV1 em gel de SDS-poliacrilamida. | 43 |
| Figura 8: Cromatograma por fase reversa da fração C-X+XI. | 44 |
| Figura 9: Atividade espasmogênica do PNV2 . | 45 |
| Figura 10: Cromatograma por fase reversa da fração C-XIII. | 46 |
| Figura 11: Eletroforese do PNV3 em gel de SDS-poliacrilamida. | 47 |
| Tabela I: Composição de aminoácidos do polipeptídeo PNV1 . | 48 |
| Tabela II: Composição de aminoácidos do polipeptídeo PNV2 . | 49 |
| Tabela III: Composição de aminoácidos do polipeptídeo PNV3 . | 50 |
| Tabela IV: Homologia seqüencial da região amino terminal de 14 polipeptídeos isolados do veneno de <i>P. nigriventer</i> . | 51 |

Nesta tese, caracterizamos bioquímica e farmacologicamente três polipeptídeos do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. Após o fracionamento parcial do veneno através da filtração em gel de Sephadex G-10 e cromatografia de troca iônica, obtivemos oito frações com atividade espasmogênica em tecidos arteriais e venosos de coelho e uma fração com atividade edematogênica em pele de coelho. Duas das frações com atividade sobre o músculo liso vascular foram selecionadas para purificação em HPLC e caracterização bioquímica através de eletroforese, determinação da composição de aminoácidos e seqüenciamento da região N-terminal dos polipeptídeos, denominados **PNV1** e **PNV2**. A fração com atividade edematogênica em pele de coelho foi também purificada e o polipeptídeo responsável por esta atividade caracterizado bioquimicamente e denominado **PNV3**. A atividade espasmogênica do **PNV1**, **PNV2** e das frações provenientes das várias etapas de purificação, foi testada num sistema de cascata. Os coelhos anestesiados, foram exsanguinados e os vasos sanguíneos (artéria pulmonar e veias cava e mesentérica) foram removidos, cortados em espiral e montados para registro isotônico das contrações. O **PNV1**, **PNV2** e as frações obtidas após purificação por

HPLC foram liofilizadas, ressuspensas em H₂O deionizada e injetadas na forma de "bolus" sobre os tecidos. A atividade edematogênica do **PNV3** e das frações provenientes das várias etapas de purificação, foi testada em coelhos anestesiados e injetados com uma mistura de azul de Evans (0,5 ml/kg, 2,5%) e ¹²⁵I-albumina (1,5 µCi/kg). As substâncias testadas foram injetadas intradermicamente no dorso dos animais. Após 30 minutos, foi coletado o sangue e o animal sacrificado. A pele dorsal foi removida e os sítios cortados para contagem de radioatividade acumulada. O **PNV1**, **PNV2** e **PNV3** possuem massa molecular de 13,9 kDa, 12,1 kDa e 14,5 kDa, com 125, 102 e 132 resíduos, respectivamente. A seqüência N-terminal para os três polipeptídeos foi a seguinte: **EAFPGQST**, **LAKRADICQPGKTSQRACET** e **AVFAIQDQPC**, respectivamente. A purificação e caracterização bioquímica destes peptídeos se constitui em ferramentas úteis não apenas para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos decorrentes do envenenamento humano por *Phoneutria nigriventer* mas também para a compreensão do papel do sistema caliceína tissular-cininogênio-cinina, tendo em vista que nossos resultados sugerem fortemente que o **PNV3** é capaz de ativar este sistema.

SUMMARY

This thesis describes the biochemical and pharmacological characterization of three polypeptides from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. The fractionation of *Phoneutria nigriventer* venom by gel filtration on Sephadex G-10-120 provided eight peaks (S-I to S-VIII) of which only the first (S-I) was investigated further. Ion-exchange chromatography of S-I on CM-cellulose-52 yielded 16 fractions (C-I to C-XVI). Of these, Fractions C-VII + VIII and C-X + XI were further purified by reverse phase HPLC to yield two polypeptides (PNV1 and PNV2) with contractile activity. Similar purification of Fraction C-XIII by HPLC resulted in the isolation of the polypeptide with oedematogenic activity (PNV3). All three proteins were single chain polypeptides (as shown by SDS-PAGE under reducing conditions) with global amino acid compositions (excluding Trp) of 125, 102 and 132 residues corresponding to molecular weights of 13,900, 12,100 and 14,500 for PNV1, PNV2 and PNV3, respectively. The N-terminal amino acid sequences of PNV1, PNV2 and PNV3 were: EAFPGQST, LAKRADICQPGKTSQRACET, and AVFAIQDQPC. The contractile activity of PNV1 and PNV2 was examined using rabbit arterial and venous vessels. The vessels were mounted in a cascade system and perfused with warm (37 °C) and oxygenated (95% O₂ + 5% CO₂ Krebs' solution. Since the spasmogenic effect of whole *Phoneutria nigriventer* venom in rabbit vascular smooth muscle is not affected by tetrodotoxin, it is unlikely that sodium channel activation plays a role in these tissues, as it does in both rat phrenic-diaphragm muscle-nerve preparation and guinea-pig isolated atria. Furthermore, the finding that the α -adrenoceptor antagonist phenoxybenzamine does not affect PNV-induced contractions excludes the possibility that *Phoneutria*

nigriventer venom induces endogenous noradrenaline release from autonomic nerve endings present in the vascular walls, as occurs in guinea pig auricles. *Phoneutria* envenomation is mainly characterized by severe local pain, but it may be accompanied by vascular disturbances such as lung oedema and priapism. Whether these peptides with vascular smooth muscle spasmogenic activity are responsible for the mentioned permeability alterations, it remains to be further investigated. The oedema formation induced by PNV3 was investigated in rabbit skin as the local accumulation of ^{125}I -human serum albumin. Our results showed that PNV3 significantly increased the vascular permeability in the rabbit skin. The increased microvascular permeability induced by whole *Phoneutria nigriventer* venom in rabbit skin involves local kinin synthesis in response to the activation of tissue (but not plasma) kallikrein-kininogen-kinin system. The biochemical identification of the peptide responsible for this activity in *Phoneutria* venom might provide a useful tool to further understand the role of tissue kallikrein-kinin system.

A *Phoneutria nigriventer* é conhecida popularmente como aranha armadeira devido ao fato de que, quando exposta ao perigo, arma o seu bote apoiando-se sobre as patas traseiras e erguendo as dianteiras, procurando picar sua vítima (Bucherl, 1971; Lucas, 1988). As aranhas do gênero *Phoneutria* habitam folhagens como palmeiras e bananeiras, sendo por isto, também conhecidas como aranha das bananas. As aranhas do gênero *Phoneutria* são solitárias, errantes, crepusculares e noturnas (Bucherl, 1971).

Estes aracnídeos pertencem à ordem Araneida, subordem Labidognatha, família Ctenidae e subfamília Phoneutriinae. As aranhas do gênero *Phoneutria* distribuem-se essencialmente na América do Sul, havendo relatos de casos esporádicos de acidentes por estes aracnídeos na América Central (Costa Rica), provavelmente por migração da espécie colombiana (Trejós *et al.*, 1971). No Brasil, o gênero *Phoneutria* está distribuído em diversas regiões e são conhecidas 5 espécies (Eickstedt, 1994):

- *Phoneutria fera* - Amazonas (Alto Rio Negro).
- *Phoneutria nigriventer* - Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

- *Phoneutria reidy* - Amazonas, Pará e Roraima.
- *Phoneutria keiserling* - Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.
- *Phoneutria pertyi* - conhecida apenas no Rio de Janeiro.

Na região Centro-Sul, encontram-se principalmente as espécies *Phoneutria nigriventer* e *Phoneutria keiserling* (Lucas, 1988).

A *Phoneutria nigriventer* é responsável por 71% dos acidentes de araneísmo no Brasil (Ministério da Saúde, 1989), que ocorrem principalmente nas regiões centro-oeste e sul do Brasil (Lucas, 1988). Nos acidentes provocados pela picada de *Phoneutria nigriventer* são relatados, na maioria das vezes, apenas sinais e sintomas locais, acompanhados de alterações sistêmicas como dor, que é o sintoma mais freqüente e geralmente surge logo após a picada (Vital Brazil & Vellard, 1926 a, b; Diniz, 1963). A dor provocada pelo veneno é intensa e irradia-se para o segmento proximal à picada, sendo acompanhada por fasciculações musculares locais, câimbras, hiperestesia, paralisia espástica, convulsões tônicas, sialorréia, hipersecreção nasal e brônquica, sudorese fria, taquicardia, arritmias cardíacas, hipertensão e/ou hipotensão arterial, hipotermia, vômitos, perturbações da acuidade visual, lacrimejamento, priapismo e, mais raramente, diarréia, retenção urinária e constipação (Vital Brazil & Vellard, 1926 a, b; Schenberg & Pereira Lima, 1962, 1971, 1978;

Lucas, 1988). Em 1925, Vital-Brazil & Vellard observaram hemorragia alveolar, ocular (coelhos) e hepática (ratos).

A peçonha de *Phoneutria nigriventer* difere de outras peçonhas de aranhas como, por exemplo, a do gênero *Loxosceles*, (Heineken and Lowe, 1835, apud Lucas, 1988; Schenone & Letonja, 1975; Cardoso *et al.*, 1990) por não produzir edema local, necrose, coagulação sanguínea ou hemólise. Difere também das peçonhas de escorpiões por não provocar convulsão em camundongos (Vital-Brazil & Vellard, 1925).

As principais complicações do envenenamento humano são caracterizadas por choque neurogênico, priapismo, edema pulmonar, parada cardiorespiratória e, eventualmente, morte que acomete frequentemente crianças abaixo de 10 anos (Schenberg & Pereira Lima, 1962, 1971, 1978; Bucarechi *et al.*, 1987).

Efeitos farmacológicos causados pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*

Em músculo esquelético de ratos, Barrio (1955) relatou o aparecimento de fibrilações e espasmos musculares, paralisia e asfixia. Estes efeitos foram atribuídos à presença de duas frações do veneno, separadas, isoladas e caracterizadas por eletroforese em papel Whatman. Posteriormente, foram isolados dois polipeptídeos

através de eletroforese e cromatografia em papel de filtro Whatman, que possuíam a capacidade de contrair o íleo isolado de cobaio e útero de rata (Diniz, 1963).

Em preparações neuromusculares de fêmur de gafanhoto, o veneno de *Phoneutria nigriventer* provoca o aparecimento de potencial de ação repetitivo no nervo crural e fasciculações musculares sendo tais efeitos decorrentes da presença de um polipeptídeo (5.5 a 5.9 kDa) que contém grande quantidade de cisteína (Entwistle *et al.*, 1982).

A injeção intraneural desse veneno em ratos induz o aparecimento de potencial de ação repetitivo das fibras nervosas causando subseqüentemente o bloqueio de condução das mesmas; tais distúrbios fisiopatológicos são associados com edema transitório do axoplasma nodal de Ranvier (Cruz-Höfling *et al.*, 1986; Love & Cruz-Höfling 1986) e formação de vacúolos no espaço periaxonal das fibras nervosas mielinizadas (Cruz-Höfling *et al.*, 1985).

Em preparações neuromusculares de nervo frênico-diafragma de rato, o veneno de *Phoneutria nigriventer* causa despolarizações não uniformes das membranas musculares e aumento na freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura. Estes efeitos são abolidos na presença de tetrodotoxina ou com redução da concentração do sódio no meio nutritivo, indicando que o veneno de

Phoneutria nigriventer ativa o canal de sódio voltagem-dependente da membrana de fibras nervosas e musculares (Fontana & Vital Brazil, 1985; Vital Brazil, 1987).

Em aurículas isoladas de cobaia, o veneno induz efeitos inotrópicos e cronotrópicos negativos, seguidos de aumento na frequência e tensão das contrações espontâneas. A tetrodotoxina abole o cronotropismo e inotropismo sugerindo que tais efeitos sejam decorrentes da liberação de acetilcolina e noradrenalina das terminações nervosas autonômicas consequentes da ativação de canais de sódio nos terminais nervosos (Vital Brazil *et al.*, 1988).

Este veneno contém ainda quatro polipeptídeos neurotóxicos sendo que a neurotoxina Tx1 (8 kDa), foi purificada e sua estrutura primária definida; esta neurotoxina apresenta uma concentração de 14 meia-cistinas (Diniz *et al.*, 1990). Recentemente, foram isoladas do veneno de *Phoneutria nigriventer*, através de filtração em gel e cromatografia de fase reversa, três frações neurotóxicas, letais em camundongos, e diferentes entre si com relação à massa molecular (6 a 9 kDa), composição de aminoácidos e seqüência do N-terminal (Rezende Jr. *et al.*, 1991).

O veneno de *Phoneutria nigriventer* apresenta atividade espasmogênica em músculo liso vascular de coelho (Antunes *et al.*, 1990; 1993a). Esta atividade contrátil não é devida à presença de

serotonina e/ou histamina, visto não ter sido reduzida com metisergida, mepiramina e diálise do veneno bruto, sugerindo a presença de outras substâncias responsáveis pela contração do tecido vascular do coelho (Borges, 1992). Estas substâncias apresentaram termoestabilidade e sensibilidade à tripsina, sugerindo que possuam natureza peptídica. Após purificação parcial (Sephadex G-10 e cromatografia de troca iônica) do veneno de *Phoneutria nigriventer*, Borges (1992) obteve três frações que apresentaram atividade espasmogênica em músculo liso vascular as quais apresentaram algumas bandas eletroforéticas com massa molecular acima de 12 kDa em eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

Este veneno quando injetado na pele de ratos e/ou coelhos causa aumento de permeabilidade vascular, detectado pela extravasamento de albumina marcada (Antunes *et al.*, 1992). Este aumento de permeabilidade está presente quando o veneno é dializado e quando o animal é tratado com mepiramina e metisergida, indicando que o mesmo é devido a presença de outras substâncias, provavelmente peptídeos.

Os resultados com o veneno de *Phoneutria nigriventer* obtidos em nossos laboratórios, demonstraram que o aumento da permeabilidade vascular em pele de coelho, é devido principalmente à ativação de calicreínas teciduais (Marangoni *et al.* 1993a). Lopes-

Martins *et al.* (1994), utilizando o mesmo veneno, demonstraram que a liberação de NO é o passo final da via pela qual as calicreínas tissulares relaxam o corpo cavernoso isolado de coelho. Por outro lado, através da cromatografia líquida de alta pressão (Rego *et al.*, *in press*), obtivemos uma fração a qual induz o relaxamento do corpo cavernoso isolado de coelho, assim como o aumento da permeabilidade vascular. Este resultado está consistente com aqueles obtidos com o veneno dializado e, sugere fortemente que nesta fração esta (ão) presente (s) peptídeo (s) capaz (es) de ativar as calicreínas tissulares os quais poderão ser uma ferramenta útil na compreensão do papel fisiológico do sistema calicreína tissular-cininogênio-cinina.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

I - purificar através de cromatografia líquida de alta pressão as frações obtidas por Sephadex e cromatografia de troca iônica e testar as mesmas em tecido vascular de coelho.

II - uma vez confirmada a atividade biológica e grau de pureza dos peptídeos, analisar a composição de aminoácidos e sequenciar o N-terminal dos mesmos.

Fracionamento em Sephadex G-10

Uma amostra do veneno de *Phoneutria nigriventer* (900 mg do veneno dessecado) foi suspensa em 4 ml de ácido acético a 2% (v/v) em temperatura ambiente (20-25°C) e centrifugada a 2000 r.p.m. por 10 min. Foi obtido um resíduo insolúvel, cinza escuro, da ordem de 30 mg. A solução sobrenadante, amarelo marron (caramelo), foi esfriada a 5°C e submetida à filtração em uma coluna de Sephadex G-10-120 (2,5 x 190 cm; 40-120 mM Sigma Chem. Co.), equilibrada com ácido acético a 2% e com um fluxo de 13 ml/h. Foram coletadas amostras de 10 ml até o tubo 28, e de 5 ml a partir do tubo 29. Conforme ilustrado na figura 1 (Marangoni *et al.*, 1993b), foram obtidas oito frações (S-I a S-VIII) as quais foram liofilizadas e testadas em músculo liso vascular e pele de coelho.

Cromatografia da Fração S1 por troca iônica

A fração ativa S-I do veneno de *Phoneutria nigriventer* com massa de 450 mg foi equilibrada com 3,5 ml de tampão acetato de amônio 0,05 M, pH 5,0, clarificada por centrifugação e cromatografada em CM-Celulose 52 microgranular Whatman (figura 2; Marangoni *et al.*, 1993b). A coluna (2,5 x 55 cm) foi previamente equilibrada com o

mesmo tampão, a um fluxo de 20 ml/hr e temperatura de 5°C. A seguir, realizou-se uma eluição por etapas com concentrações crescentes do tampão acetato de amônio (0,1 M - 3 M), pH 5, iniciada a partir de volume efluente igual a 150 ml. Cada nova fração assim obtida foi liofilizada, redissolvida em ácido acético a 2% (v/v) e dessalificada à 5°C numa coluna de Sephadex G-10-120 (2 x 200 cm) equilibrada com o mesmo solvente, e novamente liofilizada. Foram obtidas 16 frações C-I a C-XVI, coletadas à 5°C, num volume de 5 ml/tubo. As frações C-I a C-III foram dessalificadas por liofilização direta. A fração C-V, insolúvel em ácido acético, foi dessalificada em hidróxido de amônio 0,05 M.

Cromatografia líquida de alta pressão

Utilizamos para a purificação das frações ativas do veneno de *Phoneutria nigriventer*, provenientes da cromatografia por troca iônica, equipamentos Waters HPLC modelo PDA-991, equipado com duas bombas Waters modelo 510. Utilizamos, também, um injetor automático de amostra Waters modelo U6K e coluna analítica μ Bondapak C18 nas dimensões 0,39 x 30 cm, previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 2,5 (solvente A). As frações foram dissolvidas em 0,1% de ácido trifluoro acético e após centrifugação, uma alíquota de 200 μ l foi aplicada ao topo da coluna. A Cromatografia

reversa usou um gradiente linear de 0 a 100% de acetonitrilo 66% em ácido trifluoroacético 0,1%, pH 2,5 (solvente B) a um fluxo de 1 ml por minuto durante 60 minutos, sendo o eluato monitorado a 220 nm. Frações foram coletadas utilizando-se coletor automático Waters o qual separa as frações por "slope". As repurificações foram realizadas no mesmo sistema utilizando porém, um gradiente linear descontínuo de 44 a 48% do solvente B, com incrementos de 2% a cada 10 minutos, para o **PNV2** e de 50 a 65% do solvente B, com incrementos de 5% a cada 10 minutos, para o **PNV3**. Após a coleta, as frações foram liofilizadas, reconstituídas em salina e analisadas através de ensaio biológico em cascata de musculatura lisa vascular, corpo cavernoso e em pele de coelho.

A avaliação dos cromatogramas, com referência ao grau de pureza dos picos, foi realizada através da equação de resolução:

$$R = \frac{V_2 - V_1}{1/2 \cdot (W_1 + W_2)}$$

onde V é o volume da fase móvel (tempo ou distância no papel de registro) que passa desde o ponto de aplicação até o ápice do pico de interesse e, W é a largura da base dos picos. Nos registros apresentados, a velocidade do papel foi de 0,5 cm por minuto.

Análise da composição de aminoácidos

A análise de aminoácidos dos peptídeos isolados e purificados por cromatografia líquida de alta pressão foi feita utilizando-se um analisador de aminoácidos Pico-Tag (Waters System) como descrito por Henriksen and Meredith (1984). As amostras foram hidrolisadas por 24 horas à 105 °C por vapores de HCl 6M em atmosfera N₂ (Superseco-SS, White Martins). O material foi lavado com 20 µl de solução de metanol: água: trietilamina (1: 1: 1, v/v/v), para a remoção de sais e solventes adsorvidos nos aminoácidos, centrifugado e seco a vácuo. A amostra, foi derivatizada com uma solução de metanol: trietilamina: água: fenilisotiocianato (7: 1: 1: 1, v/v/v/v), por trinta minutos à temperatura ambiente e seca a vácuo para a completa remoção do fenilisotiocianato (PITC). A seguir, a mesma foi dissolvida em 50 µl de acetonitrilo 5% em fosfato de sódio 0,4 M titulado por ácido fosfórico 10% até pH 7,4. Os derivados de feniltiocarbamil (PTC) dos aminoácidos foram aplicados no analisador e separados por HPLC em coluna µBondapak C-18 de fase reversa, sob um gradiente linear de 0 a 100% de acetonitrilo a 66% em TFA a 0,1%, durante 20,5 minutos. A identificação e quantificação de cada aminoácido foram feitas por comparação com uma corrida padrão de PTC-aminoácidos.

Sequenciamento do peptídeo

O seqüenciador automático de proteínas e peptídeos, utiliza a técnica de degradação de Edman (Edman & Begg, 1967) para remover e identificar aminoácidos a partir da porção N-terminal de um polipeptídeo. Um seqüenciador modelo 477 A, acoplado a um sistema de HPLC modelo 120 A, ambos da Applied Biosystem, executou automaticamente todas as reações do método. Os reagentes e solventes são transferidos para a câmara de reação e conversão por controle automático através de um micro processador, permitindo seqüências automáticas de alta sensibilidade (10 - 500 picomoles de proteína ou peptídeos).

Sessenta picomoles da amostra dissolvida em acetonitrilo 66% e TFA a 0,1%, foram aplicados sobre um filtro de papel e fibra de vidro, previamente tratado com um agente hidrofóbico (BioBrene). A proteína é hidrofobicamente unida a este suporte que, em seguida, é colocado na câmara de reação do seqüenciador, onde ocorre o acoplamento fenilisotiocianato (PITC) ao aminoácido N-terminal, que é clivado sob a forma derivada de anilintiazolinona (ATZ), deixando um novo aminoácido terminal pronto para o próximo ciclo de acoplamento e clivagem. O ATZ aminoácido é automaticamente transferido para uma segunda câmara de reação, onde ocorre a conversão para um derivado mais estável, na forma de feniltioidantoína do correspondente

aminoácido (PTH). O PTH aminoácido é transferido para um sistema de cromatografia líquida de alta pressão, onde a identificação é realizada por comparação ao perfil cromatográfico de uma mistura padrão de PTH aminoácidos.

Os reagentes utilizados foram: R1 [5% fenilisocianato (PITC) em n-heptano]; R2 [12.5% trimetilamina (TMA) em água]; R3 [ácido trifluoroacético (TFA), com 0.002% de DTT]; R4 [25% TFA em água com 0.01 DTT]; R5 [acetonitrila, com 0.001% DTT]; S1 [n-heptano]; S2 [etilacetato]; S3 [1-clorobutano]; S4 [20% acetonitrila em água].

Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida-tricina

Utilizamos o método descrito por Shagger & Jagow (1987). Foi utilizado um sistema Mighty Small II SE 250 (géis 16 x 10 cm), acoplado a um banho de circulação refrigerada RCB-300. A partir de uma solução estoque de acrilamida 46,5% (P/V) e bisacrilamida 3% (P/V), foram obtidos géis de separação de 16,5%, sobrepostos por uma camada de gel (2 cm) à 10% e um gel de concentração à 4%. Foram utilizados dois tampões de corrida; o tampão anódico (0,2 M pH 8,9) Tris-HCl e o tampão catódico (0,1 M) Tris, (0,1 M) Tricina, (0,1%) SDS. As amostras entre 20-50 mg foram dissolvidas em 20 ml de tampão Tris-HCl (62,5 mM, pH 6,8), contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,001% de azul de bromofenol. O gel foi corado em prata

segundo método descrito por Merrill *et al.*(1984). Coloração do Gel: O gel foi fixado em 40% de metanol e 10% de ácido acético (V/V), durante 30 minutos e posteriormente foi fixado utilizando-se uma mistura contendo 10% de etanol e 5% de ácido acético (V/V) durante 15 minutos. Após a fixação, o gel foi oxidado durante 3 minutos com dicromato de potássio (3,4 mM) e lavado com água deionizada. A coloração do gel foi realizada utilizando-se nitrato de prata (12 mM) durante 15 minutos, lavado em água deionizada e, posteriormente, revelado com carbonato de sódio (0,28 M) durante aproximadamente 15 segundos. Para bloquear a reação, foi utilizado 5% de ácido acético (V/V) durante 5 minutos.

Permeabilidade vascular em pele de rato e coelho

Coelhos machos (2-3 kg) New Zealand foram anestesiados com pentobarbital sódico (Sagatal[®], 30-40 mg/kg, via endovenosa). A seguir, foram injetados endovenosamente com uma mistura de solução de azul de Evans (0,5 ml/kg, 2,5%) e albumina marcada (1,5 mCi/Kg¹²⁵ I-albumina). As substâncias a serem testadas foram preparadas em salina e injetadas intradermicamente (0,1 ml) no dorso dos animais (previamente depilado) em doses repetidas (4-6 sítios por dose). Após 30 minutos, foram coletados 5 ml de sangue do coelho

através de punção cardíaca, em presença de heparina e o mesmo foi sacrificado, injetando-se endovenosamente sobredose de Sagatal®.

A seguir, a pele dorsal foi removida e os sítios injetados foram recortados (diâmetro de 15 mm) para contagem da radioatividade acumulada (125 I-albumina), usando-se um contador gama. Os resultados foram expressos como o volume de plasma extravasado a partir dos valores encontrados em 1 ml de plasma (Williams, 1979; Brain & Williams, 1985).

A composição da solução de Tyrode (mM) foi a seguinte: NaCl 137, KCl 2,7, MgCl₂ 0,5, NaH₂PO₄ 0,4, NaHCO₃ 1,2 e glicose 5,6.

Superfusão de músculo liso vascular em cascata

Coelhos machos (2-3 kg), albinos (New Zealand) foram anestesiados com pentobarbital sódico (Sagatal®, 40mg/kg, i.v.) e exsanguinados via artéria carótida. Após laparotomia, os vasos sanguíneos (artéria pulmonar e veias cava e mesentérica) foram removidos e colocados em solução tampão Krebs-Ringer. O tecido endotelial de cada vaso foi removido através da inserção de um cateter de polietileno na luz do mesmo. Os vasos foram cortados em espiral, montados em cascata (Vane, 1964) e superfundidos com solução de Krebs (95%O₂/5%CO₂), a um fluxo constante de 5ml/min (figura 4). Os tecidos foram ligados a alavancas auxotônicas

conectadas a transdutores isotônicos para músculo liso (Harvard) e as respostas foram registradas em um polígrafo Watanabe (Model WTR 381) de seis canais. As frações obtidas após a purificação pela cromatografia líquida de alta pressão foram liofilizadas e injetadas na forma de "bolus" sobre os tecidos.

RESULTADOS

A figura 1 mostra o fracionamento do veneno bruto de *Phoneutria nigriventer* (900 mg) em Sephadex G-10 (Marangoni *et al.*, 1993b). Todas as frações (3-30 μ g) apresentaram atividade espasmogênica tanto em artéria pulmonar como em veia mesentérica de coelho. A atividade espasmogênica da fração S-VII foi abolida com o pré-tratamento dos tecidos vasculares com o antagonista de serotonina, metisergida (5 μ M).

A fração S-I, devido à sua massa (450 mg), foi selecionada para purificação e identificação dos componentes responsáveis pelas atividades espasmogênica no músculo liso vascular de coelho e edematogênica em pele de rato e coelho. Assim, a fração S-I foi submetida a uma cromatografia por troca iônica em CM-celulose 52 resultando em dezesseis novas frações (figura 2). Estas frações foram liofilizadas e dessalificadas como descrito em materiais e métodos. As frações C-I a C-VI e C-XV não apresentaram atividade em nenhum dos tecidos vasculares testados. As frações C-VII+VIII, C-IX e C-X+XI (3 μ g) e as frações C-XII, XIII, XIV e XVI (30 μ g), apresentaram atividade espasmogênica em ambos os tecidos, artéria pulmonar e veia mesentérica de coelho. Apenas a fração C-XIII apresentou

atividade sobre a permeabilidade vascular em pele de coelho (figura 3). As frações frações C-VII+VIII, C-X+XI e C-XIII foram selecionadas para purificação em HPLC e caracterização dos polipeptídeos responsáveis pela atividade espasmogênica (frações C-VII+VIII, C-X+XI) e atividade sobre a permeabilidade vascular em pele de coelho (fração C-XIII, figura 3).

Resolução da fração C-VII+VIII

A resolução da fração C-VII+VIII foi obtida por meio da HPLC (figura 5). A atividade espasmogênica em artéria pulmonar, veia cava e veia mesentérica de coelho, foi identificada no pico indicado pela seta como **PNV1** (figuras 5 e 6). Assim como no veneno de *Phoneutria nigriventer* total, a atividade contrátil presente neste pico foi dose-dependente. Nenhuma atividade espasmogênica foi detectada em outros picos.

Os resultados obtidos com o sequenciamento do N-terminal nos permite supor que o **PNV1** representa um polipeptídeo puro constituído por uma única cadeia. A composição e seqüência dos aminoácidos terminais do **PNV1** estão representadas nas tabelas I e IV, respectivamente. A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida-tricina (figura 7) mostrou que o **PNV1** apresenta uma mobilidade eletroforética compatível com o peso molecular calculado de 13,89

kDa. A análise de aminoácidos do **PNV1** indicou também a presença de duas pontes de dissulfeto, grande conteúdo de Asx e Glx (27%) e a presença de 125 resíduos (tabela I).

Resolução da fração C-X+XI

A resolução da fração C-X+XII foi obtida por meio da HPLC e a atividade espasmogênica em artéria pulmonar, veia cava e veia mesentérica de coelho foi identificada no pico indicado pela seta (figura 8 e 9). Assim como no PNV total, a atividade contrátil presente neste pico foi dose dependente. Nenhuma atividade espasmogênica foi detectada em outros picos.

A repurificação do pico ativo pela HPLC usando um gradiente descontínuo linear entre 40-48% do tampão B revelou a presença de dois outros picos ("inset" da figura 8), onde apenas o segundo pico (denominado **PNV2**) apresentou atividade espasmogênica sobre os tecidos vasculares.

A composição e sequência dos aminoácidos terminais do **PNV2** estão representadas nas tabelas II e IV, respectivamente. Os resultados obtidos com o sequenciamento do N-terminal nos permite supor que o **PNV2** representa um polipeptídeo puro constituído por uma única cadeia. A análise de aminoácidos indicou a presença de quatro pontes de dissulfeto, grande conteúdo de Lys (14%), Glx (11%),

e ausência de His. A composição global dos aminoácidos indica a presença de 102 resíduos (Trp não incluído) e um peso molecular calculado de 12,11 kDa.

Resolução da fração C-XIII

Como indicado pela figura 3, apenas a fração C-XIII apresentou atividade espasmogênica em pele de coelho. A resolução da fração C-XIII foi obtida por meio da HPLC (figura 10). A atividade sobre permeabilidade vascular em pele de coelho foi identificada nos picos indicados I, II e III (figura 10) na dose de 30 µg/sítio, co-injetados com PGE₁ (14,7 ± 1,4 µl, 44,2 ± 3,9 µl, 76 ± 6,0 µl e 69 ± 3,3 µl, de extravasamento induzido pela PGE₁ apenas, picos I, II e III, respectivamente). Nenhuma atividade sobre permeabilidade vascular foi detectada em outros picos. O pico III foi denominado **PNV3** e caracterizado bioquimicamente.

A composição dos aminoácidos do **PNV3** estão representadas na tabela III. Os resultados obtidos com o sequenciamento da região N-terminal do **PNV3** indicam que este é um polipeptídeo puro constituído por uma única cadeia (tabela IV). A análise de aminoácidos da fração **PNV3**, mostrou a presença de seis pontes de dissulfeto, alto conteúdo de Glx (20%) e apenas um resíduo dos aminoácidos His e Met. A

composição global de aminoácidos indicou a presença de 132 resíduos (Trp não incluído) e um peso molecular calculado de 14,47 kDa. A eletroforese do **PNV3** em gel de SDS-poliacrilamida-tricina nas formas nativa e reduzida (figura 11) mostraram apenas uma banda e uma mobilidade eletroforética compatível com um peso molecular próximo a 14,0 kDa (quando comparado aos marcadores lisosima 14,3 kDa e a b-lactoglobulina 18,4 kDa).

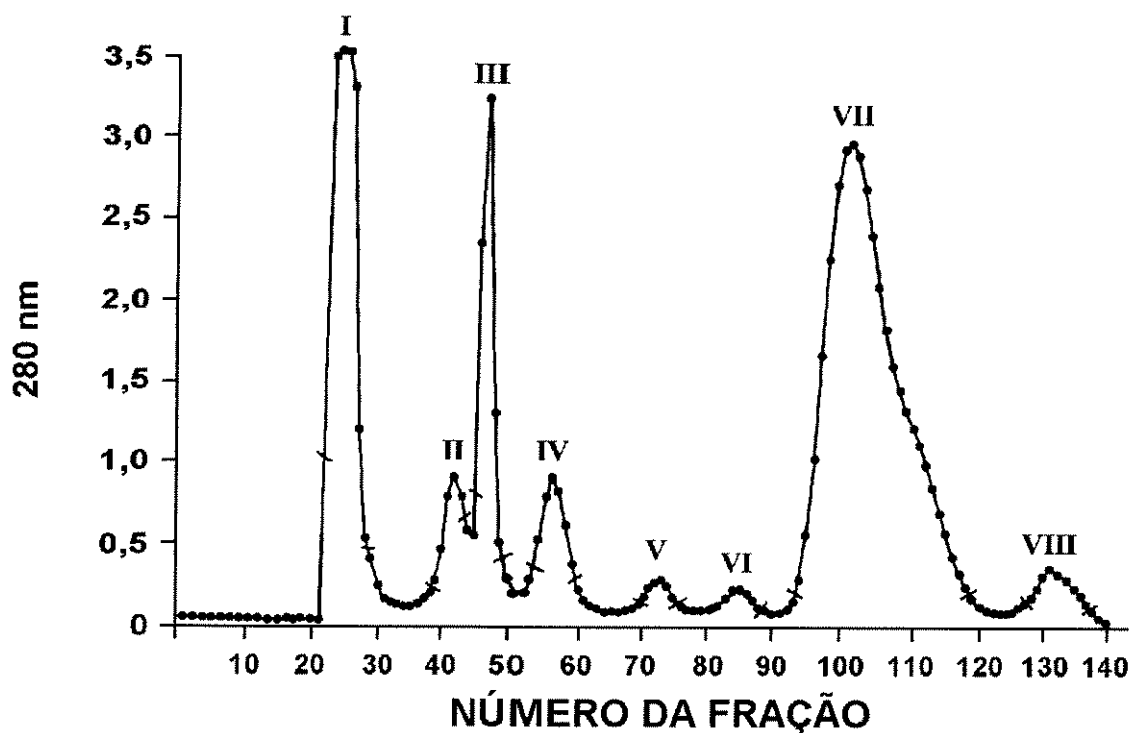


FIGURA 1: Fracionamento do veneno de *Phoneutria nigriventer* em Sephadex G-10. A coluna (2,5 x 190 cm) foi equilibrada com ácido acético a 2% (v/v). A amostra do veneno foi diluída em ácido acético a 2% e fracionada a um fluxo de 13 ml por hora. As frações foram coletadas a 5 °C em um volume de 5 ml por tubo (Marangoni et al. 1993b).

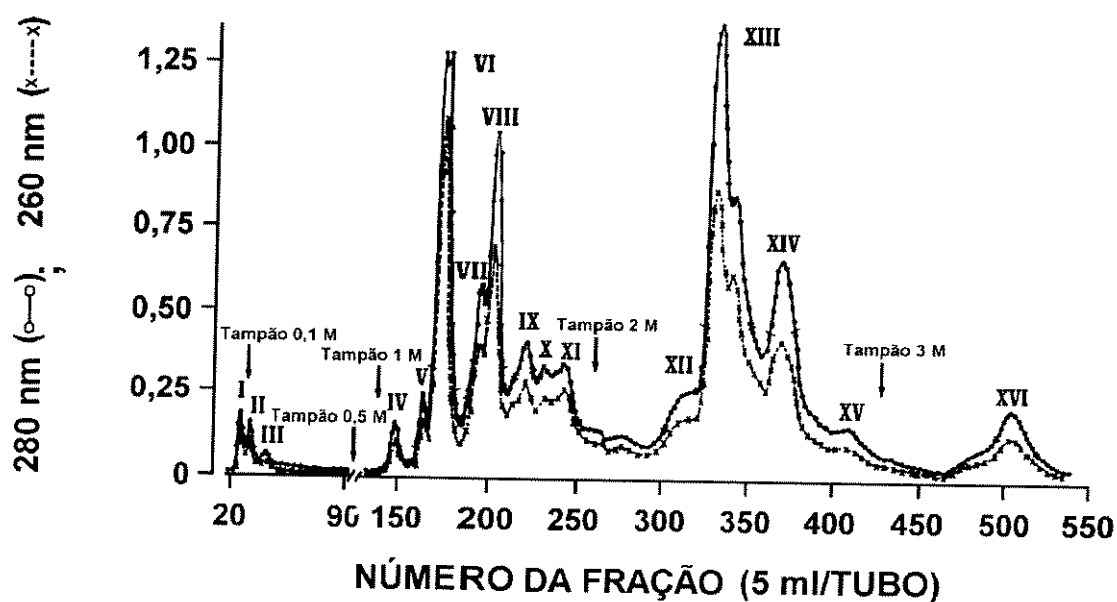


FIGURA 2: Cromatografia por troca iônica da fração ativa S-I, proveniente da separação do veneno de *Phoneutria nigriventer* por Sephadex G-10. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M, pH 5, a um fluxo de 20 ml por hora. A seguir foi feita a eluição em concentrações crescentes do tampão (0,1 à 3 M) com pH 5. As frações foram coletadas à 5 °C, 5 ml por tubo (Marangoni et al. 1993b).

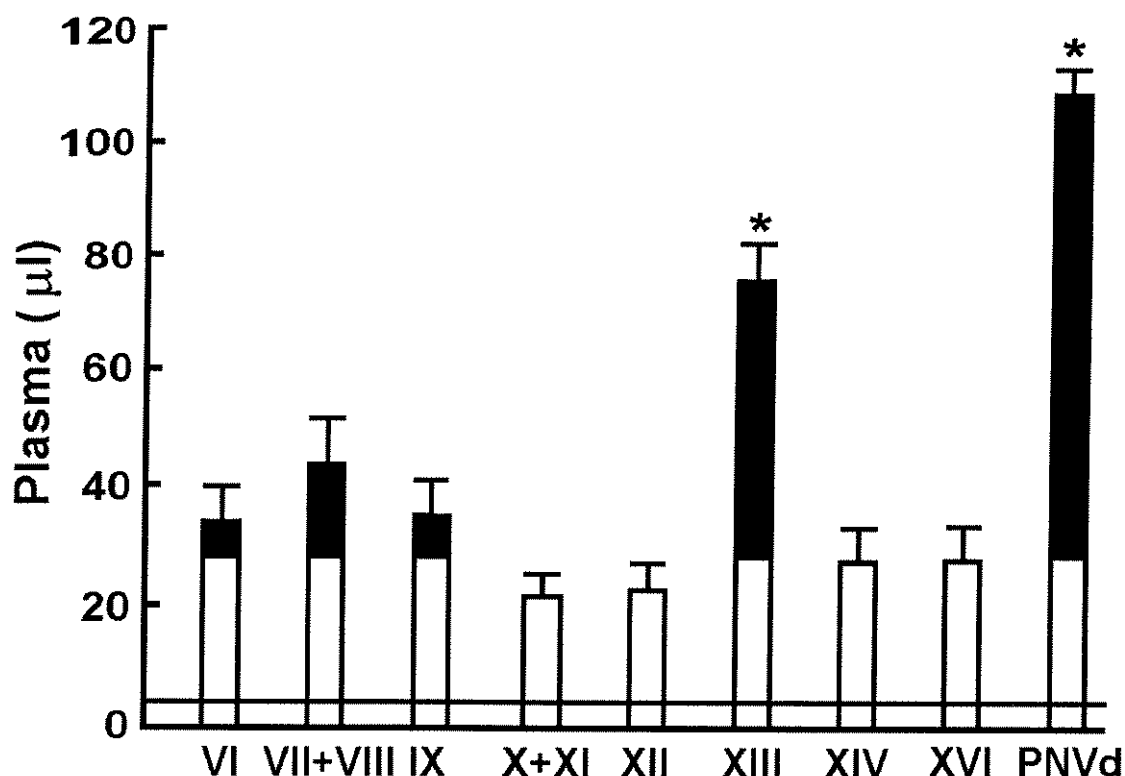


FIGURA 3: Aumento da permeabilidade vascular induzido pela fração C-XIII em pele de coelho. A fração C-XIII foi obtida por cromatografia por troca iônica da fração ativa S-I, proveniente da separação do veneno de *Phoneutria nigriventer* por Sephadex G-10. Nesta figura podemos observar as respostas edematogênicas induzidas pelas frações C-VI à C-XVI (3 µl/sítio) co-injetadas com PGE₁ (0,1 nmol/sítio). As frações C-I à C-V e C-XV não foram testadas devido à pequena quantidade obtida após o fracionamento pela cromatografia por troca iônica. A linha acima do eixo horizontal representa a resposta induzida apenas pela salina e a parte aberta das barras e acima desta linha representa o edema induzido pela PGE₁ apenas. A parte fechada das barras representa o edema induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* dializado e suas frações. Estes resultados representam a média de quatro experimentos \pm o desvio padrão da média e *p < 0,05 comparados com os sítios injetados apenas com PGE₁ (Antunes *et al.*, 1993b).

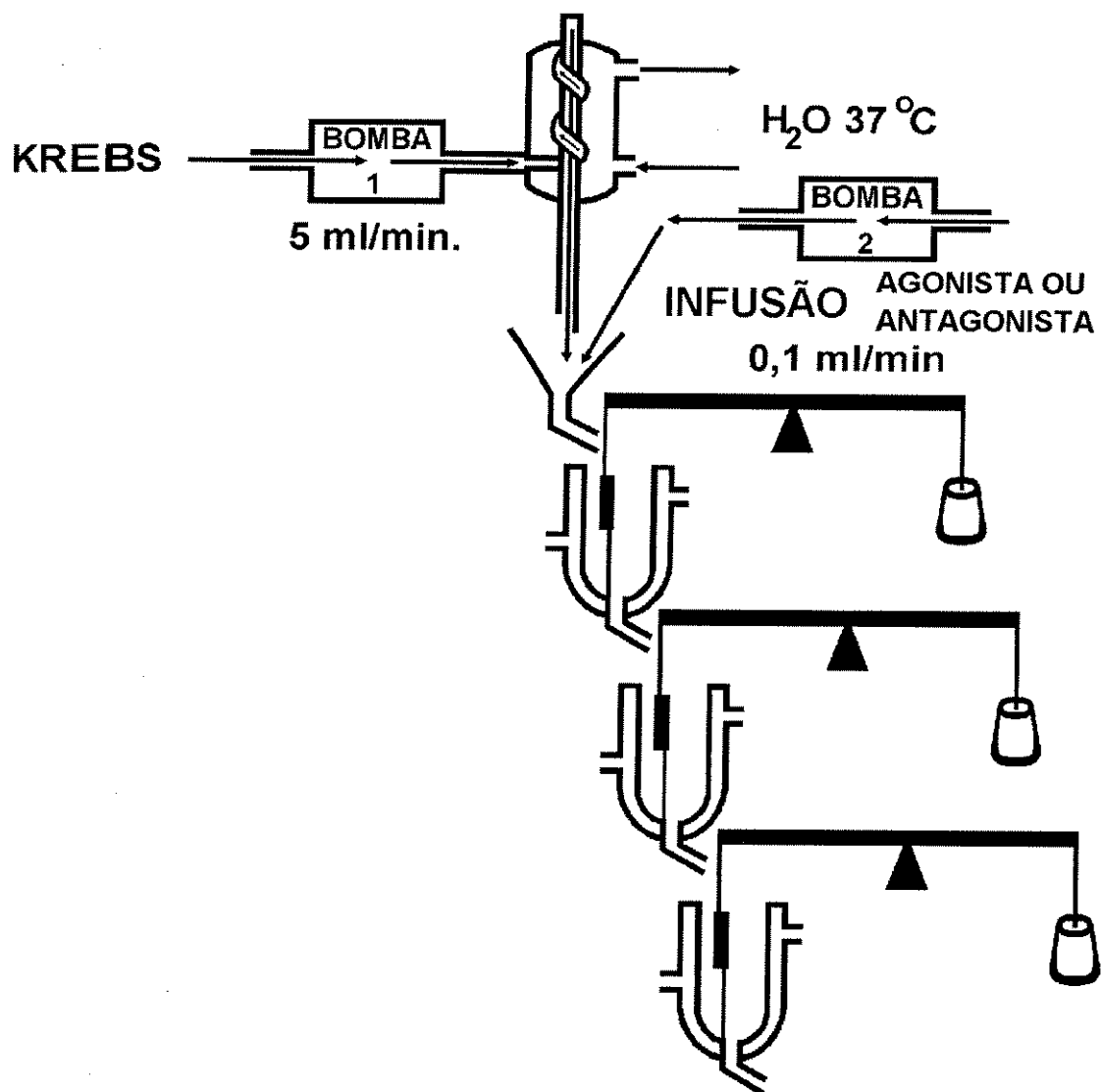


FIGURA 4: Esquema de superfusão de músculo liso em cascata. Os vasos foram preparados segundo Vane (1964) em tiras helicoidais e montadas para registro isotônico das contrações. A bomba 1 superfunde, a um fluxo de 5 ml/min, uma solução de Krebs borbulhada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 . A bomba 2 superfunde a um fluxo de 0,1 ml/min, indometacina ($5 \mu M$). As frações obtidas após purificação em HPLC foram liofilizadas, resuspendidas em água deionizada e injetadas sob a forma de "bolus" sobre os tecidos.

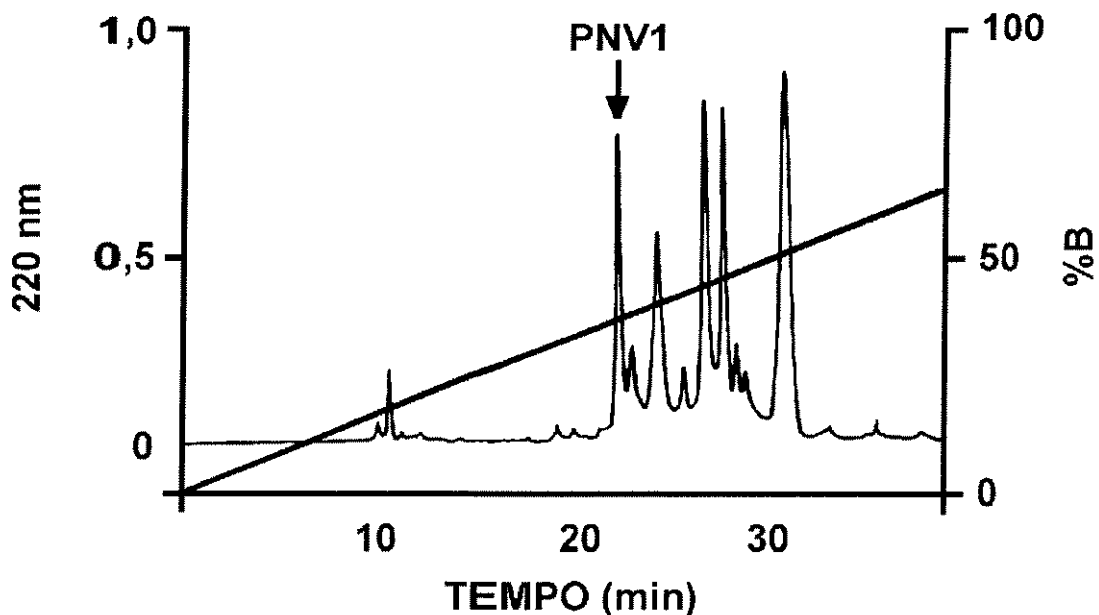


FIGURA 5: Perfil cromatográfico da fração C-VII+VIII obtido pela purificação através da cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa. Utilizamos uma coluna analítica μ Bondapack C18 de 0,39 x 30 cm. A eluição foi feita com um gradiente linear de 0-66% de acetonitrila em 0,1% de TFA. A fração com atividade espasmogênica (indicada pela seta) foi denominada **PNV1**.

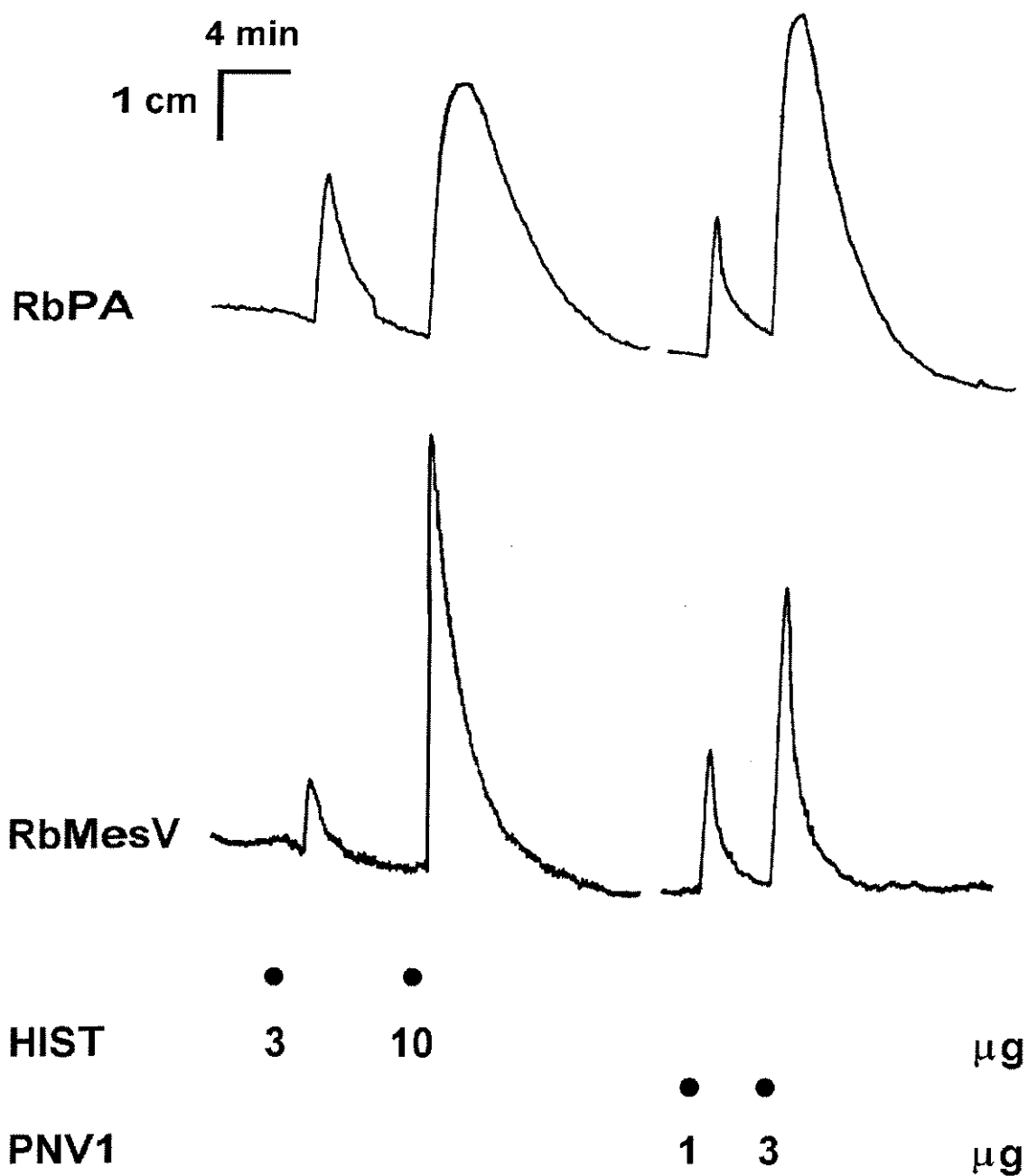


FIGURA 6: Atividade espasmogênica do **PNV1** na artéria pulmonar (RbPA) e veia mesentérica (RbMesV) de coelho. Os tecidos vasculares sem o endotélio foram superfundidos em cascata. A histamina e o **PNV1** foram administrados sob a forma de “bolus” sobre os tecidos.

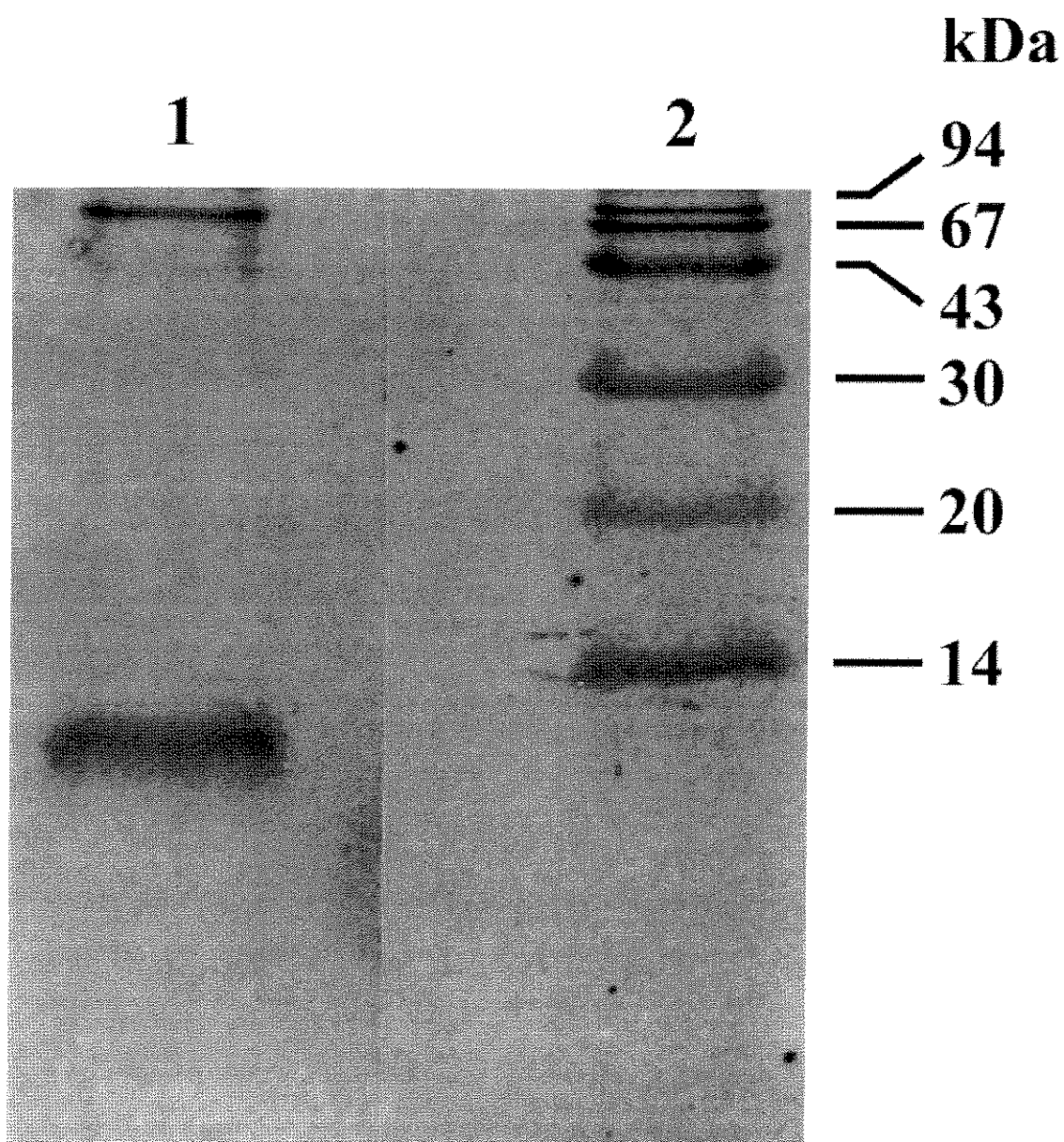


FIGURA 7: Eletroforese do PNV1 em gel de SDS-poliacrilamida-tricina. Em 1: **PNV1** purificado por HPLC de fase reversa. Em 2, de cima para baixo: fosforilase B, albumina bovina, ovalbumina, anidrase carbônica e α -lactoglobulina.

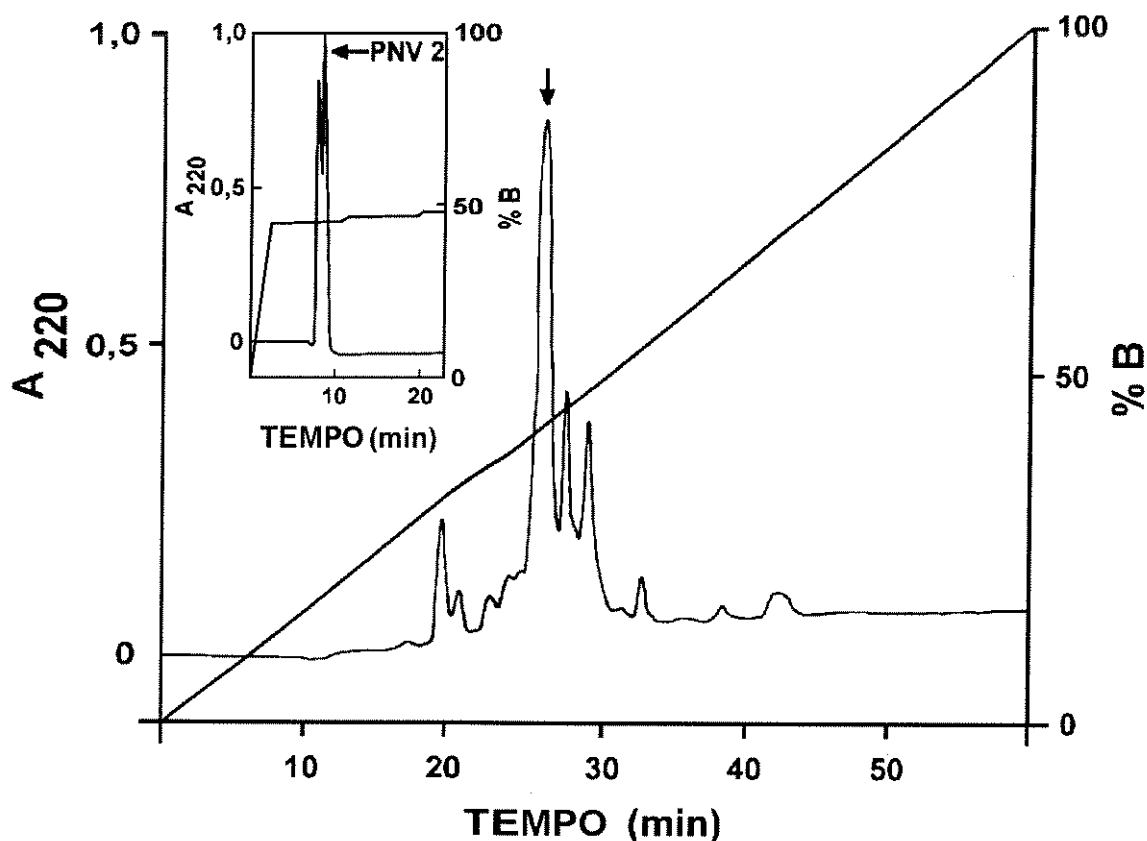


FIGURA 8: Perfil cromatográfico da fração C-X+XI obtido pela purificação através da cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa. Utilizamos uma coluna analítica μ Bondapack C18 de 0,39 x 30 cm. A eluição foi feita com um gradiente linear de 0-66% de acetonitrila em 0,1% de TFA. A fração com atividade espasmogênica (indicada pela seta) foi repurificada por HPLC apresentando duas outras frações ("inset"), sendo a segunda a responsável pela atividade contrátil e denominada **PNV2**.

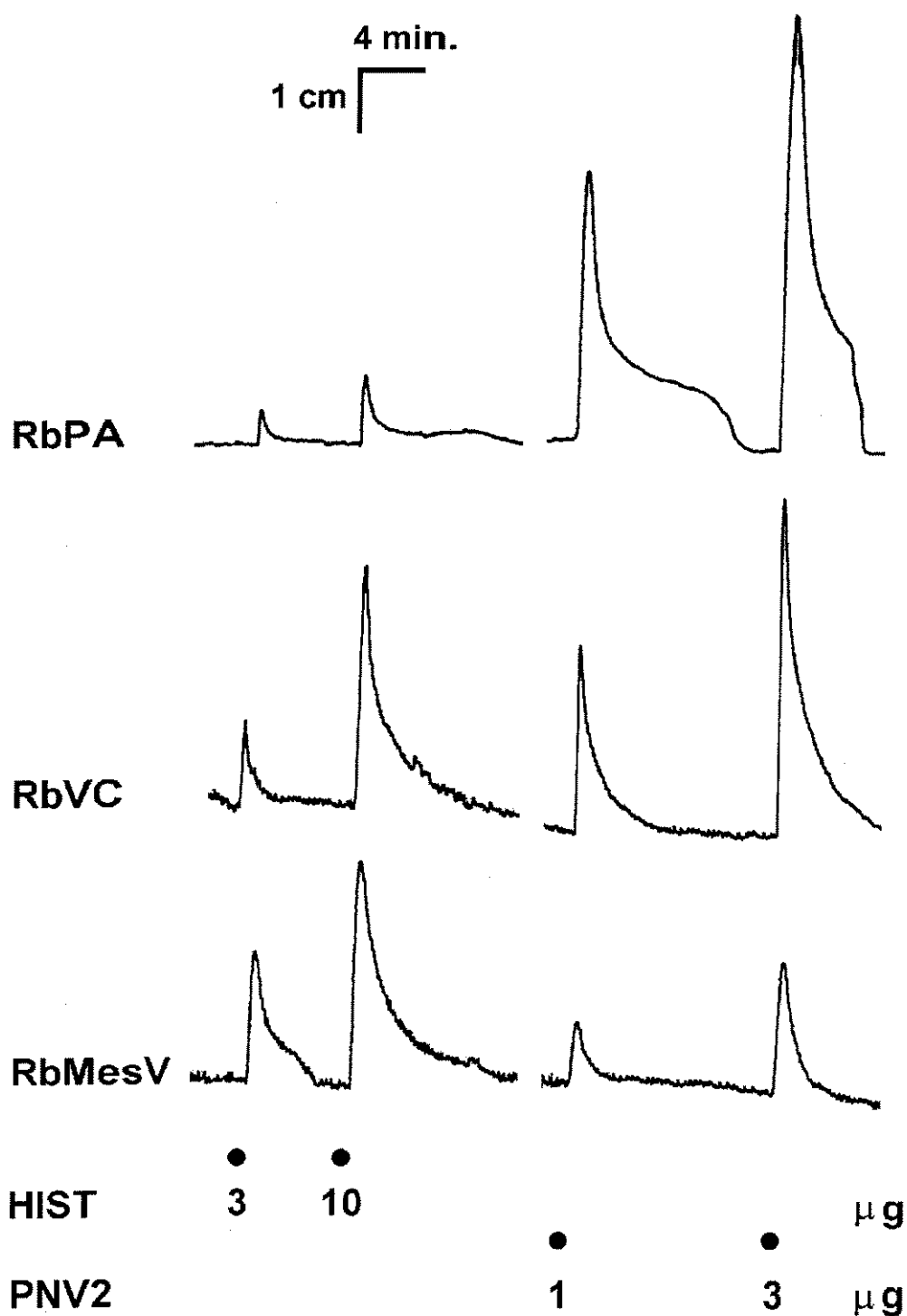


FIGURA 9: Atividade espasmogênica do **PNV2** na artéria pulmonar (RbPA), veia cava (RbVC) e veia mesentérica (RbMesV) de coelho. Os tecidos vasculares sem o endotélio foram superfundidos em cascata. A histamina e o **PNV2** foram administrados sob a forma de "bolus" sobre os tecidos.

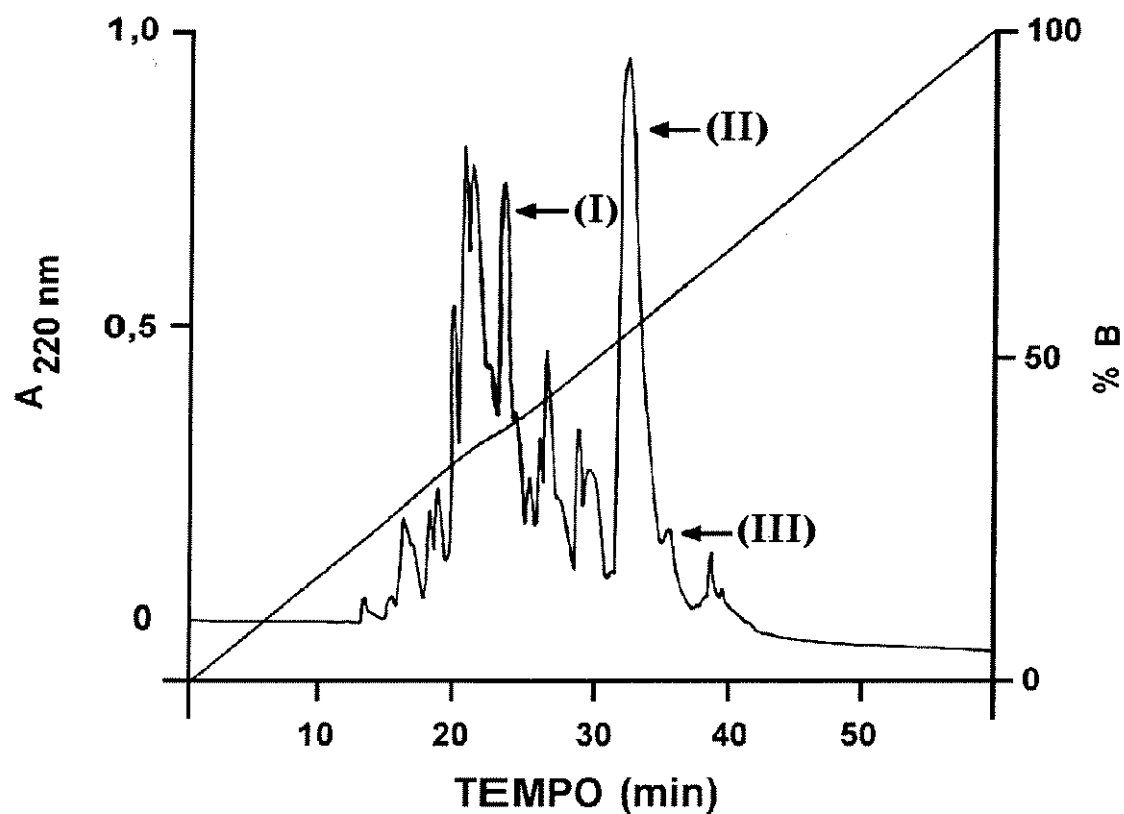


FIGURA 10: Perfil cromatográfico da fração C-XIII obtido pela purificação através da cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa. Utilizamos uma coluna analítica μ Bondapack C18 de 0,39 x 30 cm. A eluição foi feita com um gradiente linear de 0-66% de acetonitrilo em 0,1% de TFA. A subfração III com atividade sobre a permeabilidade vascular em pele de coelho (indicado na figura) foi repurificada por HPLC utilizando um gradiente linear descontínuo de 50-65% do solvente B. O polipeptídeo purificado foi denominado **PNV3**.

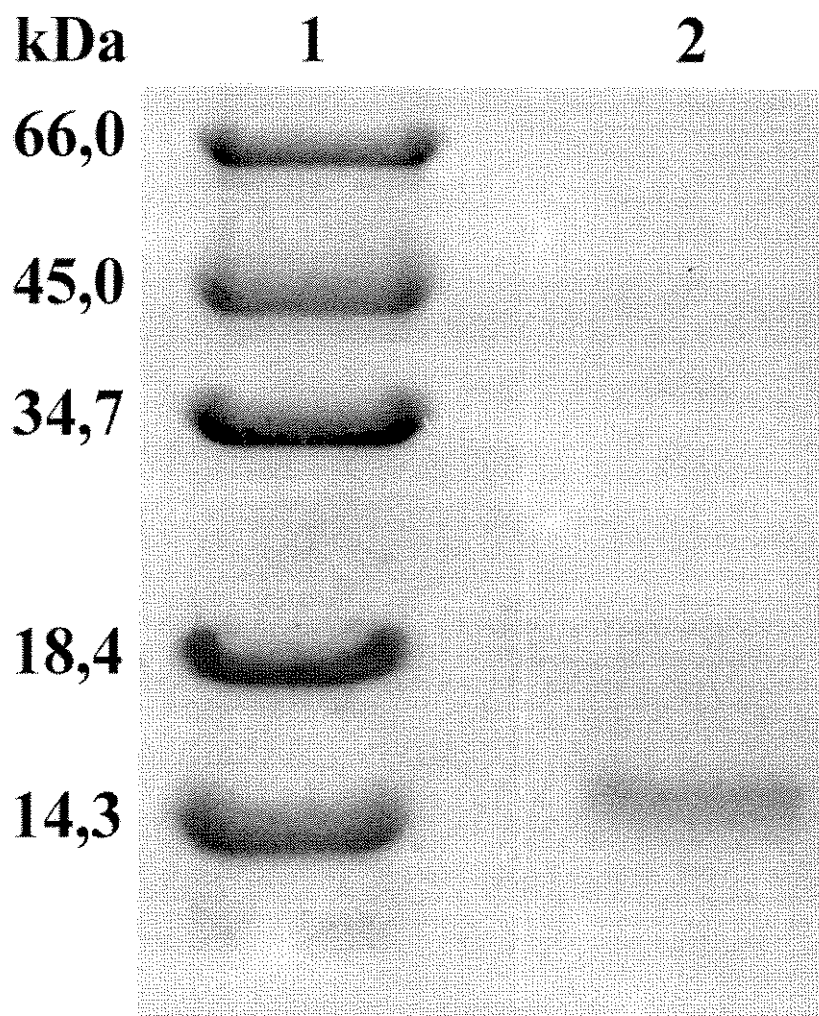


FIGURA 11: Eletroforese do **PNV3** em gel de SDS-poliacrilamida-tricina. Em 1: Marcadores albumina bovina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), pepsina (37,0 kDa), β -lactoglobulina (18.4 kDa) e lisosima (14.3 kDa). Em 2: **PNV3** purificado por HPLC de fase reversa.

TABELA I - Composição de aminoácidos do peptídeo **PNV1** purificada do veneno de *Phoneutria nigriventer*.

| Amino acid | PNV1 |
|------------|------------|
| Asx | 12.68 (13) |
| Glx | 20.27 (20) |
| Ser | 7.98 (8) |
| Gly | 8.95 (9) |
| His | 2.15 (2) |
| Arg | 7.43 (7) |
| Thr | 6.02 (6) |
| Ala | 9.64 (10) |
| Pro | 7.86 (8) |
| Tyr | 4.37 (4) |
| Val | 6.72 (7) |
| Met | 2.65 (3) |
| 1/2 Cys | 3.54 (4) |
| Ile | 5.13 (5) |
| Leu | 8.23 (8) |
| Phe | 4.87 (5) |
| Lys | 5.79 (6) |
| Trp | n.d. |

Total 124.28 (125) + Trp

n.d. - não determinado

Número entre parênteses representa a integral mais próxima.

TABELA II - Composição de aminoácidos do peptídeo PNV2
 purificada do veneno de *Phoneutria nigriventer*.

| Aminoácido | PNV2 |
|------------|------------|
| Asx | 8.12 (8) |
| Glx | 10.80 (11) |
| Ser | 7.18 (7) |
| Gly | 10.35 (10) |
| His | 0 |
| Arg | 3.85 (4) |
| Thr | 7.70 (8) |
| Ala | 11.34 (11) |
| Pro | 2.48 (2) |
| Tyr | 3.22 (3) |
| Val | 2.51 (3) |
| Met | 2.72 (3) |
| 1/2 Cys | 7.85 (8) |
| Ile | 2.63 (3) |
| Leu | 0.88 (1) |
| Phe | 5.89 (6) |
| Lys | 14.09 (14) |
| Trp | n.d. |

Total 101.61 (102) + Trp

n.d. - não determinado

Número entre parênteses representa a integral mais próxima.

TABELA III. Composição dos aminoácidos do **PNV3** purificado à partir do veneno de *Phoneutria nigriventer*.

| Amino acid | PNV3 |
|------------|------------|
| Asp | 12.20 (12) |
| Glu | 27.39 (27) |
| Ser | 1.55 (2) |
| Gly | 16.64 (17) |
| His | 1.23 (1) |
| Arg | 5.89 (6) |
| Thr | 5.30 (5) |
| Ala | 9.76 (10) |
| Pro | 5.48 (5) |
| Tyr | 7.00 (7) |
| Val | 2.52 (3) |
| Met | 1.00 (1) |
| 1/2 Cys | 12.37 (12) |
| Ile | 4.68 (5) |
| Leu | 4.75 (5) |
| Phe | 3.64 (4) |
| Lys | 9.62 (10) |
| Trp | n.d. |
| Total | 132+Trp |

n.d. - não determinado

a - Número entre parênteses representa a integral mais próxima.

b - determinado como ácido cisteico

TABELA IV: Homologia seqüencial da região amino terminal de 14 polipeptídeos isolados do veneno de *Phoneutria nigriventer*. O alinhamento da estrutura primária foi realizado de acordo com os resíduos de meia-cistina. Os “gaps” foram introduzidos para maximizar o grau de homologia. **PNV1** (Marangoni *et al.*, 1993b), **PNV2** (Bento *et al.*, 1993) **PNV3** (Bento *et al.*, 1995), **PNV4** (Rego *et al.*, *in press*), Tx1 (Diniz *et al.*, 1990), Tx2-1, Tx2-5, Tx2-6, Tx2-9, (Cordeiro *et al.*, 1992), Tx3-1, Tx3-2, Tx3-3, Tx3-4, Tx3-5, Tx3-6 (cordeiro *et al.*, 1993).

| | |
|-------|--------------------------------------|
| PNV1 | EAFPGQST |
| PNV2 | LAKRADICQP-----GKTSQRACET |
| PNV3 | AVFAIQDQPC |
| PNV4 | AELTSCFPVGHECDGDASNCNCCGDDVYCGCGWG-R |
| TX1 | AELTSCFPVGHECDGDASNCNCCGDDVYCGCGWG-R |
| TX2.1 | ATCAGQDKPCKE---TCDCCGERGECVCA-L-S |
| TX2.5 | ATCAGQDQTCKV---TCDCCGERGECVCG-G-P |
| TX2.6 | ATCAGQDQPCKE---TCDCCGERGECVCG-G-P |
| TX2.9 | SFCIP-FKPCKS---DENCC-KKFKCKTTGI |
| TX3.1 | AECAAYYERCGK--GYKRCCEERP-CKCNIVMD |
| TX3.2 | ACAGLYKKCGK--GASPCCEDRP-CKCDLAMG |
| TX3.3 | GCANAYKSCNG---PHTCC--WGYNGYKKA |
| TX3.4 | SCINVGDFCDGKKDCCQCDRDNFCSCSVIFG |
| TX3.5 | GCIGRNESCKF--DRHGCCWPWS-CSCWNK |
| TX3.6 | ACIPRGEICTD---DCECCGCDNQCYPGG-S |

Os primeiros trabalhos com veneno de *Phoneutria nigriventer*, envolvendo purificação e atividade biológica, foram realizados por Barrio (1955), seguido por Diniz (1963) e Schenberg e Pereira-Lima (1962; 1966; 1971 e 1978). Entretanto, somente em 1982 um polipeptídeo puro foi isolado deste veneno e sua atividade biológica determinada (Entwistle *et al.*, 1982). Estes autores purificaram um polipeptídeo neutro (5.5-5.9 kDa) com quatro pontes de dissulfeto, responsável por potenciais de ação repetitivos em músculo esquelético de gafanhoto.

Diniz *et al.*, (1990) purificaram e seqüenciaram um polipeptídeo, o qual foi denominado Tx1, com 77 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 8,1 kDa, com atividade neurotóxica e letal para ratos. Este polipeptídeo, quando comparado com outras toxinas animais apresentou alta concentração de meia-cistina. Rezende *et al.* (1991) purificaram outras três frações com atividade neurotóxica, PhTx-1, PhTx-2 e PhTx-3, sendo que a fração PhTx-1 mostrou ser o polipeptídeo Tx1, purificado anteriormente por Diniz *et al.* (1990). Posteriormente, a fração PhTx-2 foi purificada por fase reversa e quatro polipeptídeos, Tx2-1, Tx2-5, Tx2-6 e Tx2-9, foram isolados. Estes quatro polipeptídeos conservaram a atividade neurotóxica em

ratos. A caracterização por SDS-PAGE, composição de aminoácidos e seqüenciamento total, mostrou que se tratavam de polipeptídeos distintos com massa molecular entre 3,7 e 5,9 kDa e ricos em metionina (Cordeiro *et al.*, 1992).

Recentemente, Sverzut (1994) estudou o efeito das frações PhTx-1 e PhTx-2 (Rezende *et al.*, 1991) sobre a fisiologia e a morfologia de nervos frênico-periféricos e músculo esquelético de camundongos "*in vitro*". O estudo morfológico mostrou que a fração PhTx-1 produz vacualizações das fibras musculares e desorganização das miofibrilas, sugerindo atividade miotóxica. Por outro lado, o estudo eletrofisiológico revelou que esta fração não produz alterações nos potenciais de repouso e de placa terminal em miniatura, indicando que a fração PhTx-1 não é capaz de ativar canais de sódio. Entretanto, a fração PhTx-2 ativa os canais de sódio voltagem-dependentes, promovendo a elevação da pressão osmótica e influxo de líquido intersticial em preparações neuro-musculares, produzindo a desorganização dos neurofilamentos, microtúbulos, axoplasma e alterações mitocondriais.

Neste trabalho, apresentamos três peptídeos (**PNV1**, **PNV2** e **PNV3**) com um peso molecular de 13,89 kDa, 12,11kDa e 14,47 kDa, respectivamente, que apresentam atividade espasmogênica (**PNV1** e

PNV2) em tecidos vasculares de coelhos, e atividade edematogênica (**PNV3**) em pele de coelho.

A composição global dos aminoácidos mostrou que o **PNV1** possui 125 resíduos e massa molecular calculada de 13,89 kDa, alta concentração de Asx + Glx (27%), além de 10 resíduos de alanina, 9 resíduos de glicina, 3 resíduos de metionina, 4 resíduos de meia-cistina e ausência de histidina (tabela I).

A análise de aminoácidos indicou também a presença de duas pontes de dissulfeto. Entretanto, deve-se observar que estes resultados não permitem excluir a possibilidade da presença de grupos sulfidrila livres o que reduziria o número de pontes de dissulfeto.

A eletroforese do **PNV1** em gel de poliacrilamida com SDS (figura 7), em condições nativa e reduzida, mostrou apenas uma banda proteica confirmando a pureza do material e indicando que o **PNV1** é um polipeptídeo de cadeia única com massa molecular de 13,9 kDa (Marangoni, S. *et al.*, 1993b).

Embora não tenha sido possível realizar a eletroforese do **PNV2** em gel de poliacrilamida SDS, devido à escassez do material, os resultados obtidos com a purificação e seqüenciamento da região N-terminal, nos permite supor que o **PNV2** é um peptídeo puro constituído por uma única cadeia.

A composição global de aminoácidos do **PNV2** (tabela II) indica a presença de 102 resíduos e massa molecular calculada de 12,11 kDa, alta concentração de Glx (11%) e Lys (14%), além de 10 resíduos de glicina, 11 resíduos de alanina, 8 resíduos de meia-cistina, ausência de histidina e a presença de 4 pontes de dissulfeto (Bento *et al.*, 1993). Entretanto, deve-se novamente observar que estes resultados não permitem excluir a possibilidade da presença de grupos sulfidríla livres, o que reduziria o número de pontes de dissulfeto.

Tendo em vista que a atividade espasmogênica do veneno de *Phoneutria nigriventer* total em tecidos vasculares de coelhos não é afetada pela tetrodotoxina (Antunes *et al.*, 1993a), é pouco provável que tal atividade seja decorrente da ativação dos canais de sódio, diferentemente do que ocorre nas preparações de nervo-frênico diafragma de ratos (Fontana & Vital Brasil, 1985) e átrio isolado de cobaias (Vital Brasil *et al.*, 1988). Além disto, a observação de que a fenoxibenzamina não afeta as contrações induzidas pelo PNV (Antunes *et al.*, 1993a) exclui a possibilidade de que este veneno promova a liberação de noradrenalina endógena das terminações nervosas presentes na parede vascular, como ocorre em átrios isolados de cobaias (Vital Brasil *et al.*, 1988). O envenenamento por *Phoneutria nigriventer* caracteriza-se principalmente por intensa dor local, e que pode ser acompanhada por distúrbios vasculares como

edema pulmonar e priapismo (Vital Brasil & Vellard, 1925; Schenberg & Pereira-Lima, 1971). A possibilidade destes peptídeos com atividade espasmogênica serem responsáveis por tais sinais clínicos deverá ser futuramente investigada.

O aumento da permeabilidade vascular induzida pelo PNV em pele de ratos e coelhos (Antunes *et al.*, 1992) depende da síntese local de cininas em resposta à ativação do sistema de calicreína tissular, mas não do sistema de calicreína plasmática (Marangoni R.A. *et al.*, 1993a). Isto foi baseado em resultados mostrando que o trasilol (inibidor de proteases), mas não o SBTI (inibidor de calicreína plasmática), reduz significativamente a exudação induzida pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*. Por outro lado, a exudação causada por este veneno é significativamente reduzida na presença de HOE-140, antagonista seletivo B₂. Além disto, o captopril (inibidor de cininase II) é capaz de potenciar a exudação induzida pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*, sugerindo fortemente que este efeito é mediado pelo sistema de calicreína tissular e formação local de cininas, levando à formação do edema pela ativação dos receptores B₂ (Marangoni, R. A. *et al.*, 1993a). A fração presente no veneno (fração C-XIII), responsável pela ativação deste sistema foi recentemente purificada (Antunes *et al.*, 1993b). Neste trabalho apresentamos o

polipeptídeo purificado à partir da fração C-XIII, responsável pelo aumento da permeabilidade vascular em pele de coelho.

Como descrito anteriormente, a resolução da fração C-XIII foi obtida por meio da HPLC. A atividade sobre permeabilidade vascular em pele de coelho foi identificada nos picos indicados I, II e III (figura 10). O pico III foi então denominado **PNV3** e caracterizado bioquimicamente.

A composição global de aminoácidos mostrou que o **PNV3** possui 132 resíduos e massa molecular calculada de 14,475 kDa, alta concentração de Glx (20%), além de 17 resíduos de glicina, 10 resíduos de alanina, apenas um resíduo de histidina e metionina, 12 resíduos de meia-cistina e a presença de 12 pontes de dissulfeto (tabela III).

A eletroforese do **PNV3** em gel de poliacrilamida-SDS, nas condições nativa e reduzida, mostrou apenas uma banda proteica confirmando assim a pureza do material e indicando que o **PNV3** é um polipeptídeo de cadeia única com mobilidade eletroforética compatível com uma massa molecular próximo a 14,5 kDa (figura 10).

A sequência dos aminoácidos do **PNV1**, **PNV2** e **PNV3** foi comparada com a de outros 12 polipeptídeos obtidos à partir do veneno de *Phoneutria nigriventer* (tabela IV), dentre os quais as neurotoxinas Tx1, Tx2 e Tx3 (Diniz *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992,

1993) e o **PNV4** (Rego *et al*, *in press*). Esta comparação revelou a similaridade do PNV3 com as sequências dos N-terminais das neurotoxinas Tx2.1, Tx2.5 e Tx2.6 (60, 60 e 70% de identidade, respectivamente), descritos por Cordeiro *et al.* (1993).

O veneno de *Phoneutria nigriventer* relaxa o corpo cavernoso de coelho devido à ativação do sistema de calicreína tissular (Lopes-Martins *et al.*, 1994). Recentemente, desenvolvemos uma metodologia de purificação por cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa (Rego *et al.*, *in press*), através da qual isolamos do veneno bruto de *Phoneutria nigriventer*, dois outros peptídeos. O primeiro, com atividade edematogênica em pele de coelhos e ratos e atividade relaxante no corpo cavernoso de coelho. O segundo, o qual foi caracterizado bioquimicamente e denominado **PNV4** (Rego *et al.*, *in press*) com atividade relaxante em corpo cavernoso de coelho

Este resultado está consistente com aqueles obtidos com o veneno dializado e, sugere fortemente que nesta fração esta (ão) presente (s) peptídeo (s) capaz (es) de ativar as calicreínas teciduais os quais poderão ser uma ferramenta útil na compreensão do papel do sistema calicreína tissular-cininogênio-cinina tecidual. Entretanto, a tabela IV nos mostra que o **PNV4**, cuja massa molecular é de 16,6 kDa, apresenta uma região N-terminal homologa a Tx1. Esta toxina,

isolada por Diniz *et al.* (1993), possui uma massa molecular de 8,1 kDa, valor correspondente à metade daquele calculado para o **PNV4**, a partir da análise da eletroforese em gel de poliacrilamida e da composição global de aminoácidos.

A atividade destacada do **PNV4** é a indução do relaxamento do corpo cavernoso de coelho, um dos principais fatores que promove a ereção. Quando esta ereção é prolongada e dolorosa se constitui no priapismo, importante sintoma indicador da picada por *Phoneutria nigriventer*. Contudo, este sinal clínico não foi observado quando a Tx1, descrita como neurotóxica e letal para ratos (Diniz *et al.*, 1990), foi injetada intracerebroventricularmente em ratos (Rezende *et al.*, 1991),

Os estudos de homologia seqüencial apontam para a possibilidade de **PNV4** e TX1, serem resultado de um processamento diferencial do RNA mensageiro de um mesmo gene.

Sabe-se que a maioria dos genes dos eucariontes são descontínuos, sendo constituídos por regiões codificantes, os exons, intercalados por regiões não codificadoras, os íntrons. A transcrição se dá produzindo um transcrito primário, incluindo íntrons e exons, que é posteriormente processado resultando no RNA mensageiro maduro. A possibilidade de se produzir RNAs mensageiros de diferentes

tamanhos, permite a síntese de proteínas distintas a partir de um mesmo gene.

Um processamento diferencial de RNA mensageiro explicaria não só a existência de proteínas como o **PNV4** e a Tx1, mas pode ter sido uma importante estratégia evolutiva que permitiria compreender a diversidade das toxinas animais. Se este processo está relacionado com a presença do **PNV4** no veneno *Phoneutria nigriventer* não temos elementos para afirmar. Entretanto, a ocorrência de processamento pós síntese de proteínas de veneno de aranhas é relatado para a toxina ω -aga IA de *Agelenopsis aperta* (Santos *et al.*, 1992) e para a toxina Tx1 de *Phoneutria nigriventer* (Diniz *et al.*, 1993). Estas proteínas são sintetizadas na forma de pré-protóxina e maturadas geneticamente pela clivagem de domínios da molécula.

As calicreínas são um grupo de serina proteases encontradas em células glandulares, neutrófilos e fluidos biológicos. As calicreínas são divididas em dois grandes grupos: plasmáticas e tissulares (Fiedler, 1979; Movat, 1979). Ambos os grupos diferem quanto ao peso molecular, ponto isoelétrico, especificidade de substrato, características imunológicas, tipo de cinina liberada e importância funcional (Bhoola *et al.*, 1992). As calicreínas tissulares apresentam um peso molecular entre 25.000-43.000 (Bhoola *et al.*, 1992). Assim, é pouco provável que a ativação do sistema de calicreínas tissulares

seja devido à presença de caliceína no veneno de *Phoneutria nigriventer*, tendo em vista que o peptídeo por nós isolado possui um peso molecular em torno de 15.000, o qual está bem abaixo do peso molecular das caliceínas tissulares (Antunes *et al.*, 1993b).

As caliceínas teciduais atuam especificamente em cininogênio de baixo peso molecular, formando o decapeptídeo calidina (lis-bradicinina), o qual produz seus efeitos ativando principalmente os receptores bradicininérgicos do subtipo B₂ (de Nucci *et al.*, 1988; D'Orleans-Juste *et al.*, 1989; Regoli *et al.*, 1990). O papel fisiológico da calidina ainda não está bem estabelecido. Entretanto, em traumas como picada de aracnídeos é provável que cininas geradas extravascularmente (como a calidina) possam ser moduladores mais importantes da permeabilidade vascular e da dor do que as cininas geradas intravascularmente (como a bradicinina). Neste contexto, seria interessante investigar o uso clínico do trasilol no alívio dos sintomas do envenenamento causado pela *Phoneutria nigriventer*.

É sabido que venenos de vespa e formigas contêm cininas (Piek, 1991). Entretanto, até o presente momento, nenhum ativador de caliceína tissular foi descrito em venenos. A identificação bioquímica do(s) peptídeo(s) responsável(is) por esta atividade, poderá ser uma ferramenta útil na compreensão do papel do sistema caliceína tissular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES E, MARANGONI RA, BORGES NCC, HYSLOP S, FONTANA MD and DE NUCCI G. Effect of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. Braz. J. Med. Biol. Res. 26: 81-91, 1993a.

ANTUNES E, MARANGONI RA, BRAIN SD and DE NUCCI G. Activation of tissue kallikrein-kininogen-kinin system by a component present in the *Phoneutria nigriventer* venom. Toxicon 31: 1385-1391, 1993b.

ANTUNES E, MARANGONI RA, BRAIN SD and DE NUCCI G. *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin in vivo. Toxicon 30: 1011-1016, 1992.

ANTUNES, E., MARANGONI, R.A., BORGES, N.C.C., FONTANA, M.D. & DE NUCCI, G. Pharmacological profile of *Phoneutria*

nigriventer venom on rabbit vascular smooth muscle. Br. J. Pharmacol. 101: 508P, 1990.

BARRIO, A. Spastic action of the venom of the spider *Phoneutria fera*. Acta Physiol. Latinoamer. 5: 132-143, 1955.

BENTO AC, NOVELLO JC, MARANGONI S, ANTUNES E, GIGLIO JR, OLIVEIRA B and DE NUCCI G. Identification of a new vascular smooth muscle contracting polypeptide in the *Phoneutria nigriventer* spider venom. Biochem. Pharmacol. 46: 1092-1095, 1993.

BENTO AC, REGO E, MARIANI-PEDROSO SR, GIGLIO JR, NOVELLO JC, MARANGONI S, OLIVEIRA B, ANTUNES E and DE NUCCI G. Isolation of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom responsible for the increase in vascular permeability in the rabbit skin. Toxicon 33: 171-178, 1985.

BHoola KD, FIGUEROA CD and WORTHY K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. Pharmacol. Rev. 44: 4-80, 1992.

BORGES, N.C.C. Ação do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* em músculo liso vascular de coelho. Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP. 1992

BRAIN, S.D., WILLIAMS, T.J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. Br. J. Pharmacol. 86: 855-60, 1985.

BUCARETCHI, F., ZAMBRONE, F.A.D., VIEIRA, R.J. & BUENO, L.H.I. Acidentes por *Phoneutria* sp: Estudo retrospectivo de 41 casos. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Pediatria, São-Paulo, tema livre 37: 1987.

BUCHERL, W. Acúleos que matam. No mundo dos animais peçonhentos. 1^a ed., Melhoramentos. São Paulo, 35-54, 1971.

CARDOSO, J.L.C., WEN, F.H., FRANÇA, F.O.S., WARRELL, D.A. & THEAKSTON, R.D.G. Detection by enzyme immunossay of *Loxosceles gaucho* venom in necrotic skin lesions caused by spider bites in Brazil. Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hygiene 84: 608-609, 1990.

CORDEIRO MDN, FIGUEIREDO SG, VALENTIM ADC, DINIZ CR, VON EICKSTEDT VRD, GILROY J and RICHARDSON M. Purification and amino acid sequences of six TX3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* (Keys.). Toxicon 31: 35-42, 1993.

CORDEIRO MDN, VALENTIM ADC, DINIZ CR, VON EICKSTEDT VRD, GILROY J and RICHARDSON M, Purification and complete amino acid sequences of four Tx2 types neurotoxins from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* (Keys.). FEBS Lett. 310: 153-156, 1992.

CRUZ-HÖFLING, M. A., LOVE, S., DUCHEN, L.W. Morphological abnormalities in myelinated nerve fibres caused by *Leiures*, *Centruroides*, and *Phoneutria* venoms and their prevention by tetrodotoxin. Quart. J. Exp. Physiol. 71: 115-122, 1986.

CRUZ-HÖFLING, M.A., LOVE, S., BROOK, G. & DUCHEN, L.W. Effects of *Phoneutria nigriventer* spider venom on mouse peripheral nerve. Quart. J. Exp. Physiol. 70: 623-640, 1985.

D' ORLEANS-JUSTE, P., DE NUCCI, G., VANE, J.R. Kinins act on B₁ or B₂ receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. Br. J. Pharmacol. 96: 920-26, 1989.

DE NUCCI, G., GRYGLEWSKI, R.G., WARNER, T.D., VANE, J.R. The receptor-mediated release of EDRF and PGI₂ from bovine aortic endothelial cells is coupled. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2334-38, 1988.

DINIZ CR, CORDEIRO MN, JUNIOR LR, KELLY P, FISCHER S, REIMAN F, OLIVEIRA EB and RICHARDSON M. The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. FEBS Lett 263: 251-253, 1990.

DINIZ MRV, PAINE MJI, DINIZ CR, THEAKSTON DG and CRAMPTON JM, Sequence of the cDNA coding for the lethal neurotoxin Tx1 from the Brazilian "Armed Spider" *Phoneutria nigriventer* predicts the synthesis and processing of a preprotoxin. J. Biol. Chem. 268: 15340-15342, 1993.

DINIZ, C.R. Separação de proteínas e caracterização de substâncias ativas em venenos de aranhas do Brasil. An. Acad. Brasileira de Ciências 35: 283-291, 1963.

EDMAN, P. & BEGG, G. A protein sequenator. Eur.J.Biochem. 1: 80-91, 1967.

EICKSTEDT, V. R. VON Aspectos biológicos dos animais peçonhentos: Aranhas de importância médica no Brasil. *In: Venenos Animais: uma visão integrada*. Editora Publicações Científicas, São Paulo; Cap.11, 151-172, 1994.

ENTWISTLE ID, JOHNSTONE RAW, MEDZIHRADESKY D and MAY TE. Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. Toxicon 20: 1059-1067, 1982.

FIEDLER, F. Enzimology of glandular kallikreins. *in* Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, ed. by E. G. Erdös, pp. 103-161, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1979.

FONTANA MD and VITAL-BRAZIL O, Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. Braz. J. Med. Biol. Res. 18: 557-565, 1985.

HEINRIKSEN, R. L. & MEREDITH, S. H. Amino acid analysis by reverse-phase high performance liquid Chromatography: Pre column derivatization with phenylisothiocyanate. Anal. Biochem. 136: 65, 1984

LOPES-MARTINS R. A. B., ANTUNES, E., MARIA LUIZA V. OLIVA, SAMPAIO, C. A. M., BURTON, J. & DE NUCCI, G. Pharmacological characterization of rabbit corpus carvernosum relaxation mediated tissue kallikrein-kinin system. Br. J. Pharmacol. 113: 81-86 1994.

LOVE, S. & CRUZ-HÖFLING, M.A. Acute swelling of nodes of Ranvier caused by venoms with slow inactivation of sodium channels. Acta Neuropathol. 70: 1-9, 1986.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. Toxicon 26: 759-772, 1988.

MARANGONI RA, ANTUNES E, BRAIN SD and DE NUCCI G. Activation by *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom of

tissue-kallikrein-kinin system in rabbit skin *in vivo*. Br. J. Pharmacol. 109: 539-543, 1993a.

MARANGONI S, BORGES NCC, MARANGONI RA, ANTUNES E, VIEIRA CA, NOVELLO JC, DOMONT GB, GIGLIO JR, OLIVEIRA B and DE NUCCI G. Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. Toxicon 31: 377-384, 1993b.

MERRIL, C. R., GOLDMAN, D. and VAN KEUREN, M. I. Gel protein stains: silverstain. Meth. Enzimol. 104: 441-447, 1984.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes araneídicos: contribuição ao estudo da morbidade. Boletim 22, 1989.

MOVAT, H. Z. The plasma kallikrein-kinin system and its interrelationship with other components of blood. *in* Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, ed. by E. G. Erdös, pp. 1-89, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1979.

PIEK, T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. Toxicon 29: 139-49, 1991.

REGO, E., BENTO A. C., LOPES-MARTINS, R. A. B., ANTUNE, E., NOVELLO, J. C., GIGLIO, J. R., OLIVEIRA, B. and DE NUCCI, G. isolation and partial characterization of a polypeptide from *phoneutria nigriventer* spider venom that relaxes rabbit corpus cavernosum *in vitro*. Toxicon: in press.

REGOLI, D., RHALEB, N-E., DION, S., DRAPEAU, G. New selective bradykinin receptor antagonists and bradykinin B₂ receptor characterization. Trends in Pharmacol. Sci. 11: 156-61, 1990.

REZENDE-JR L, CORDEIRO MN, OLIVEIRA EB and DINIZ CR. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "armed spider" *Phoneutria nigriventer*. Toxicon 29: 1225-1233, 1991.

SANTOS, W. F. Bioquímica dos venenos: Venenos aracnídeos: bioquímica e farmacologia. *In: Venenos animais: uma visão integrada.* Editores Publicações científicas. Cap. 16: 243-249, 1994

SCHAGGER, H. & JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379, 1987.

SCHENBERG S and PEREIRA-LIMA FA. Pharmacology of the polypeptides from the venom of the spider *Phoneutria fera*. Mem. Inst. Butantan 33: 627-638, 1966.

SCHENBERG S and PEREIRA-LIMA FA. *Phoneutria nigriventer* venom. Pharmacology and biochemistry of its components. In *Venomous Animals and their Venoms*, vol.3. New York, Academic Press, pp 279-297, 1971

SCHENBERG, S. & PEREIRA LIMA, F.A. Estudo farmacológico do veneno de *Phoneutria fera*. Ciência e Cultura 14: 237, 1962.

SCHENBERG, S. & PEREIRA LIMA, F.A. Venoms of the Ctenidae. In *Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 48*. ed. Heffter - Heuber New Series. pp. 217 - 244. Berlin: Springer-Verlag, 1978.

SCHENONE, H. & LETONJA, T. Notas sobre la biología y distribución geográfica de las arañas del género *Loxosceles*. Bol. Chil. Parasit. 30: 27-29, 1975.

SVERZUT, A. C. M. Estudo eletrofisiológico morfológico da ação das toxinas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* sobre o músculo esquelético de camundongos. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1994.

TREJÓS, A., TREJÓS, R. & ZELDÓN, R. Aracnidismo por *Phoneutria* em Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 19: 241-249, 1971.

VANE, J.R. The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. Br. J. Pharmacol. 23: 360-373, 1964.

VITAL BRAZIL, O. & VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. I. Mem. Inst. Butantan 2: 5-77, 1925.

VITAL BRAZIL, O. & VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas .II. Mem. Inst. Butantan 3: 3-77, 1926a.

VITAL BRAZIL, O. & VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas .III. Mem. Inst. Butantan 3: 243-294, 1926b.

VITAL BRAZIL, O., LEITE, G.B. & FONTANA, M.D. Modo de ação da peçonha da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaia. Ciência e Cultura 40: 181-185, 1988.

VITAL BRAZIL.,O. Spider venoms acting on the sodium channel. Mem. Inst. Butantan 49: 25-33, 1987.

WILLIAMS, T.J. Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and the vascular changes of inflammation. Br. J. Pharmacol. 65: 517-24, 1979.

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A VASCULAR SMOOTH MUSCLE CONTRACTING POLYPEPTIDE PURIFIED FROM *PHONEUTRIA NIGRIVENTER* (ARMED SPIDER) VENOM

S. MARANGONI,¹ N. C. C. BORGES,² R. A. MARANGONI,² E. ANTUNES,² C. A. VIEIRA,³
J. C. NOVELLO,¹ G. B. DOMONT,^{4*} J. R. GIGLIO,³ B. OLIVEIRA¹ and G. DE NUCCI^{2†}

Departments of ¹Biochemistry and ²Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6111, 13081, Campinas, SP, Brazil; ³Department of Biochemistry, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 14049, Ribeirão Preto, SP, Brazil; and ⁴Department of Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, 21910, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

(Received 15 June 1992; accepted 29 October 1992)

S. MARANGONI, N. C. C. BORGES, R. A. MARANGONI, E. ANTUNES, C. A. VIEIRA, J. C. NOVELLO, G. B. DOMONT, J. R. GIGLIO, B. OLIVEIRA and G. DE NUCCI. Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. *Toxicon* 31, 377-384, 1993.—Crude *Phoneutria nigriventer* venom was fractionated by Sephadex, ion-exchange and reverse-phase high performance liquid chromatography. One protein (PNV1) with spasmogenic activity in rabbit vascular smooth muscle was isolated and biochemically characterized. PNV1 has 125 amino acid residues and a calculated mol. wt of 13,899. Special features of the amino acid composition of PNV1 are the presence of two disulfide bridges and the high percentage (27%) of Asx and Glx. The N-terminal amino acid sequence indicates that PNV1 is different from other polypeptides isolated from *Phoneutria nigriventer* venom.

INTRODUCTION

Phoneutria nigriventer, an aggressive wandering solitary spider from South America, is responsible for most human accidents of spider bites in the centre, east and south of Brazil (LUCAS, 1988). The bite of this spider causes immediate, intense and irradiating local pain, neurogenic shock and cardiac disturbances characterized by tachycardia and arrhythmia (SCHENBERG and PEREIRA-LIMA, 1971).

Phoneutria nigriventer venom (PNV) contains neurotoxin(s) which activate sodium channels, leading to neuromuscular blockade of the phrenic nerve-diaphragm muscle preparation (FONTANA and VITAL-BRAZIL, 1985). Release of acetylcholine and norepinephrine by autonomic nerve endings in guinea-pig atria has also been described (VITAL-BRAZIL *et al.*, 1988). In addition, PNV contracts rabbit vascular smooth muscle (ANTUNES

* Present address: Department of Biochemistry, University of Campinas, PO Box 6111, 13081, Campinas, SP, Brazil.

† Author to whom correspondence should be addressed.

et al., 1990) and increases vascular permeability in rat and rabbit skin (ANTUNES *et al.*, 1992). This paper reports the biochemical characterization of a polypeptide responsible for the spasmogenic activity on the rabbit vascular smooth muscle.

MATERIALS AND METHODS

Venom and reagents

Phoneutria nigriventer venom was obtained by electrical stimulation of spiders maintained by the Arthropods Section, Institute Butantan, São Paulo (SP, Brazil). All chemicals and solvents were of HPLC grade purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, U.S.A.) or Aldrich Chemicals Co (Milwaukee, U.S.A.). Reverse phase chromatography was performed using a Waters (991-PDA) system. The composition of the Krebs solution was (mM): NaCl 118, NaHCO₃ 25, glucose 5.6, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄·7H₂O 1.17, and CaCl₂·6H₂O 2.5.

Fractionation of Phoneutria nigriventer venom

Desiccated *Phoneutria nigriventer* venom (900 mg) was dissolved in 4 ml of 2% (v/v) acetic acid at room temperature (20–25°C) and centrifuged for 10 min to remove insoluble material (30 mg). The brownish-yellow, clear supernatant was gel filtrated at 5°C on a 2.5 cm × 190 cm column of Sephadex G-10-120, equilibrated with 2% acetic acid. The eight fractions (S_I–S_{VIII}) obtained were lyophilized and bioassayed on isolated arterial and venous tissues from rabbits.

Fractionation of S_I by ion-exchange chromatography

Fraction S_I (450 mg) was dissolved in 3.5 ml of 0.05 M ammonium acetate buffer, pH 5.0, cleared by centrifugation and chromatographed on microgranular CM-cellulose-52 (Whatman). The column (2.5 cm × 55 cm) was previously equilibrated with this buffer at flow rate of 20 ml/hr (5°C), the sample applied and a stepwise elution (0.1 M to 3.0 M buffer, pH 5.0) was started at an effluent volume of 150 ml. Each new fraction (5 ml/tube) obtained was lyophilized, redissolved in 2% acetic acid and desalted at 5°C on a 2 cm × 200 cm column of Sephadex G-10-120, equilibrated with the same solvent, followed by lyophilization. Fractions C_I–C_{III} were lyophilized until free of ammonium acetate. Fraction C_V, which was insoluble in acetic acid, was desalted in 0.05 M ammonium hydroxide.

Reverse phase liquid chromatography

The smooth muscle active fraction C_{VII}+C_{VIII} obtained from ion-exchange chromatography was purified by reverse phase HPLC on a 0.39 cm × 30 cm μ Bondapak column (Waters System) with a linear gradient of 0–66% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid, at a flow rate of 1 ml/min. The resulting fractions were lyophilized for bioassay and the active fraction was repurified using a step-wise elution in the range of the first purification. Proteins were detected by their absorbance at 220 nm. The purified active fraction was named PNV1.

Electrophoresis of PNV1

Tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was carried out as described by SHAGGER and JAGOW (1987). The gels were composed of a small-pore gel (16.5% T–6% C) overlaid by a spacer gel (10% T–3% C) which was in turn overlaid by a stacking gel (4% T–3% C). Samples containing approximately 50 μ g protein were dissolved in 4% SDS, 12% glycerol (w/v), 50 mM Tris, 2% mercaptoethanol (v/v), 0.01% Coomassie Blue G adjusted with HCl to pH 6.8. Anode and cathode buffers were 0.2 M Tris, pH 8.9 and 0.1 M Tris, 0.1 M Tricine, 0.1% SDS (w/v) pH 8.25, respectively. Electrophoresis was performed at 90 volts. The protein bands were fixed in a solution containing 50% methanol and 10% acetic acid for 60 min, and then stained with Coomassie Blue G (0.025%) in acetic acid (10%).

N-terminal amino acid sequence of PNV1

Twenty micrograms of the isolated polypeptide was used to determine its N-terminal sequence by automated Edman degradation in an Applied Biosystems model 477A Sequencer. Phenylthiohydantoin amino acids were identified in a model 120-A PTH-amino acid analyzer (Applied Biosystems), according to the retention times of a 20 PTH-amino acid standard.

Amino acid composition of PNV1

Amino acid analysis was performed on a Pico-Tag amino acid analyzer (Water System) as described by HEINRIKSON and MEREDITH (1984). The purified sample (10 μg) was hydrolyzed with 6 N hydrochloric acid (Pierce-Sequenal Grade) containing 1% phenol (v/v) at 106°C for 24 hr. Hydrolyzates reacted with 20 μl of fresh derivatization solution (v/v; 7:1:1:1; ethanol:triethylamine:water:phenylisothiocyanate) for 1 hr at room temperature. The phenylthiocarbamyl (PTC) amino acids were identified by HPLC comparing their retention times with those of a standard mixture.

Superfusion of vascular smooth muscle

Male New Zealand white rabbits (2.0–2.5 kg) were anesthetized with thiopental sodium (30 mg/kg, i.v.) and exsanguinated via the carotid artery. The abdominal and thoracic cavities were opened and the mesenteric (RbMesA), coeliac (RbCA) and pulmonary (RbPA) arteries and the jugular (RbJV), mesenteric (RbMesV) and cava (RbVC) veins were removed and placed in Krebs solution. The vessels were cleared of adipose tissue and the endothelial layer mechanically removed. The tissues were suspended in a cascade (VANE, 1964) and continuously superfused with oxygenated (95% O₂ + 5% CO₂) and warmed (37°C) Krebs solution at 5 ml/min. Responses of the tissues were detected with auxotonic levers (PATON, 1957) attached to Harvard heart/smooth muscle transducers and displayed on a Watanabe multichannel pen recorder (Model WTR 381). After an equilibration period of approximately 60 min, the fractions obtained from PNV separation were injected as single bolus.

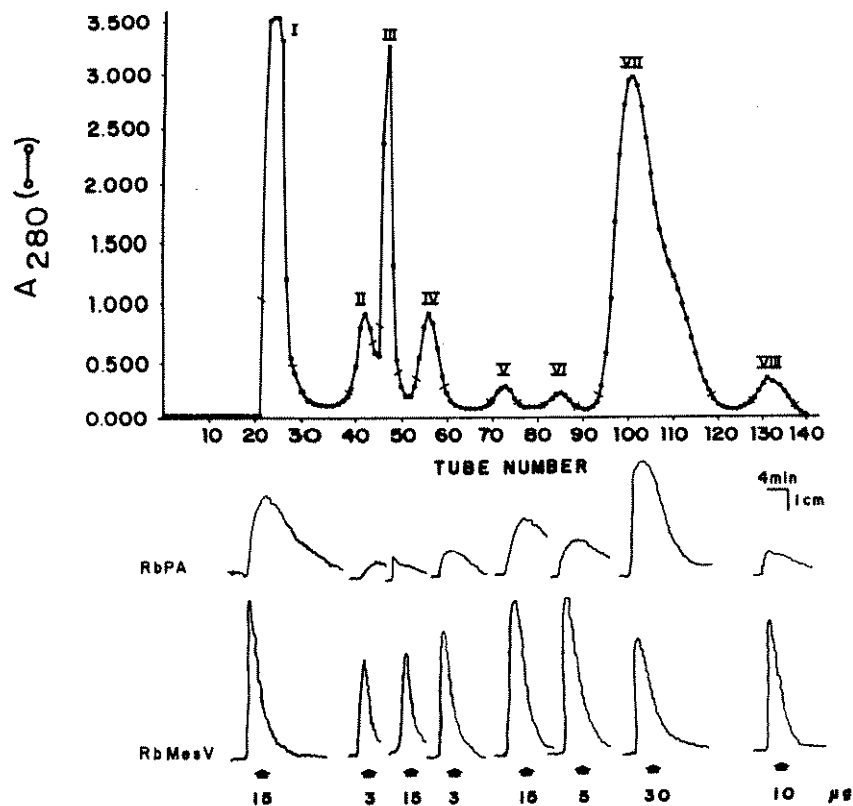


FIG. 1. SPASMOGENIC ACTIVITY IN RABBIT PULMONARY ARTERY (RbPA) AND MESENTERIC VEIN (RbMesV) OF FRACTIONS S_I–S_{VIII} OBTAINED FROM *Phoneutria nigriventer* VENOM BY GEL FILTRATION ON SEPHADEX G-10-120.

The vascular tissues were de-endothelialized and superfused in cascade. PNV was diluted in acetic acid (2%) and eluted at 13 ml/hr. The fractions were lyophilized, resuspended in saline (1 ml) and injected (3–30 μg) as single bolus. The bioassay trace is representative of three other experiments.

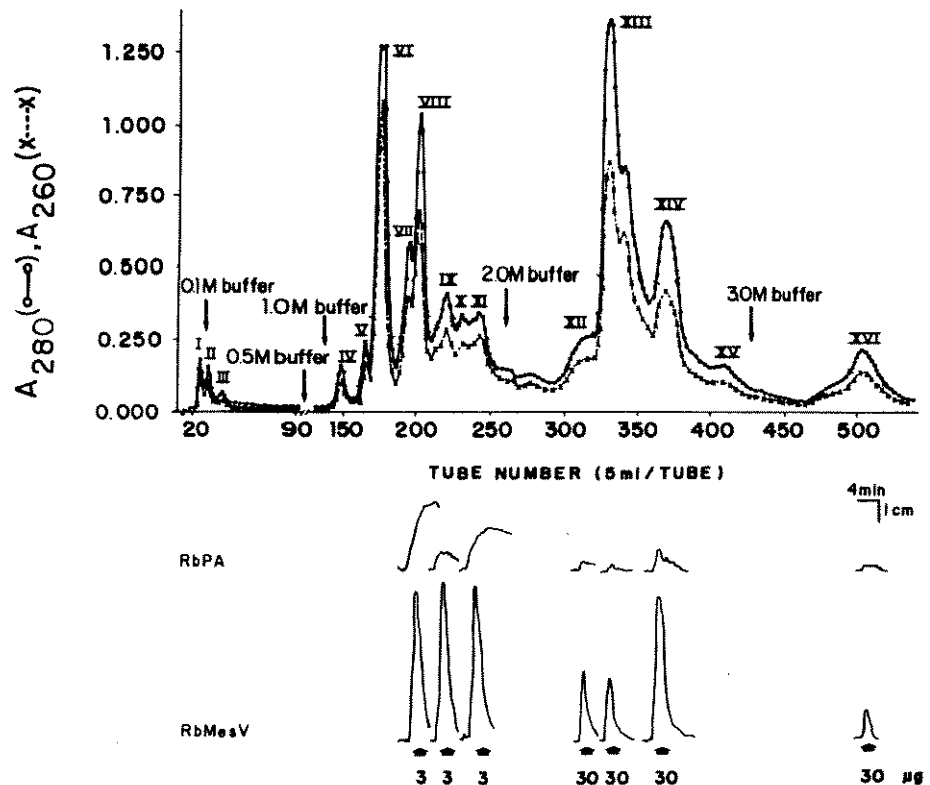


FIG. 2. SPASMOGENIC ACTIVITY IN RABBIT PULMONARY ARTERY (RbPA) AND MESENTERIC VEIN (RbMesV) OF FRACTIONS I–XVI OBTAINED BY ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY OF FRACTION S_1 . The vascular tissues were de-endothelialized and superfused in cascade. Note that fractions VII+VIII, IX, X+XI, XII, XIII, XIV and XVI contracted both vascular tissues tested. The bioassay trace is representative of three other experiments.

RESULTS

Venom fractionation

Figure 1 shows the gel filtration profile of the whole venom (900 mg) extract where eight fractions were obtained. All fractions (3–30 μ g) had spasmogenic activity on RbMesV and RbPA (Fig. 1), and on RbVC, RbJV, RbMesA and RbCA (not shown). High voltage paper electrophoresis at pH 6.5 revealed a very high concentration of glutamic acid (and a little aspartic acid) in fraction S_{II} and identified fraction S_{VII} as serotonin (not shown). The spasmogenic activity of fraction S_{VII} was abolished by pretreatment of the vascular tissues with the serotonin antagonist methysergide (5 μ M; not shown).

In order to identify the components responsible for the spasmogenic activity, fraction S_1 was selected for further purification due to its mass (452 mg). Ion-exchange chromatography of S_1 resulted in sixteen fractions (I–XVI) (Fig. 2), which were lyophilized and desalted as described above. Fractions I–VI and XV were inactive in all vascular tissues tested ($n = 3$). Fractions VII–VIII, IX and X–XI (3 μ g) and fractions XII–XIV and XVI (30 μ g) had spasmogenic activity on both RbPA ($n = 3$) and RbMesV ($n = 3$; Fig. 2), which was not affected by pretreatment of the vascular tissues with methysergide (5 μ M).

High performance liquid chromatography of fraction VII–VIII shows several peaks, but

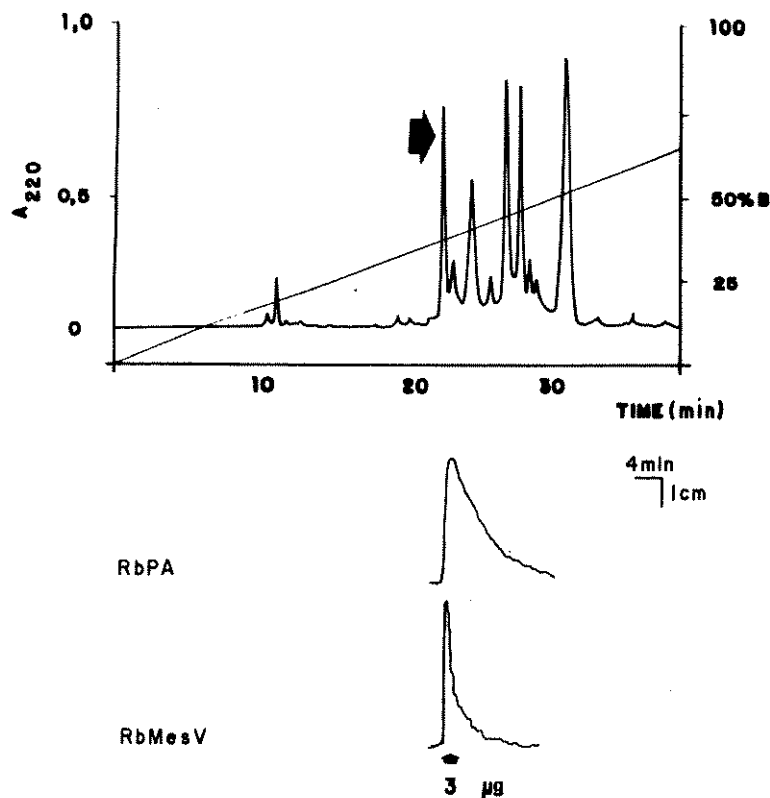


FIG. 3. SPASMOGENIC ACTIVITY IN RABBIT PULMONARY ARTERY (RbPA) AND MESENTERIC VEIN (RbMesV) OF PEAKS OBTAINED BY REVERSE PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF FRACTION VII + VIII ON A 0.39×30 cm μ Bondapak C18 ANALYTICAL COLUMN. For elution, a linear gradient from 0–66% acetonitrile in 0.1% TFA was used. The vascular tissues were de-endothelialized and superfused in cascade. Note that the spasmogenic activity (named PNV1) was present in a single chromatographic peak (arrow).

the spasmogenic activity in both RbPA and RbMesV (Fig. 3) and in RbVC and RbJV (not shown) was retained in the peak indicated as PNV1. No spasmogenic activity was detected in the other peaks (not shown). The partial sequence of the smooth muscle active fraction (PNV1) purified by reverse phase chromatography is shown in Table 1. Tricine-SDS-PAGE (Fig. 4) and N-terminal sequencing indicate that PNV1 is pure and has a single polypeptide chain. Amino acid composition of PNV1 is consistent with the presence of two disulfide bridges and a high percentage (27%) of Asx and Glx. The global amino acid composition indicates the presence of 125 residues (Trp not included) and a formula weight of 13,899.

DISCUSSION

Phoneutria nigriventer venom induces contractions on rabbit vascular smooth muscle independently of both voltage-dependent sodium and dihydropyridine-sensitive calcium channel activation (ANTUNES *et al.*, 1990). Interestingly, the spasmogenic activity on venous tissues and in the pulmonary artery was maintained after dialysis, indicating that polypeptides rather than serotonin or histamine (SCHENBERG and PEREIRA-LIMA, 1971)

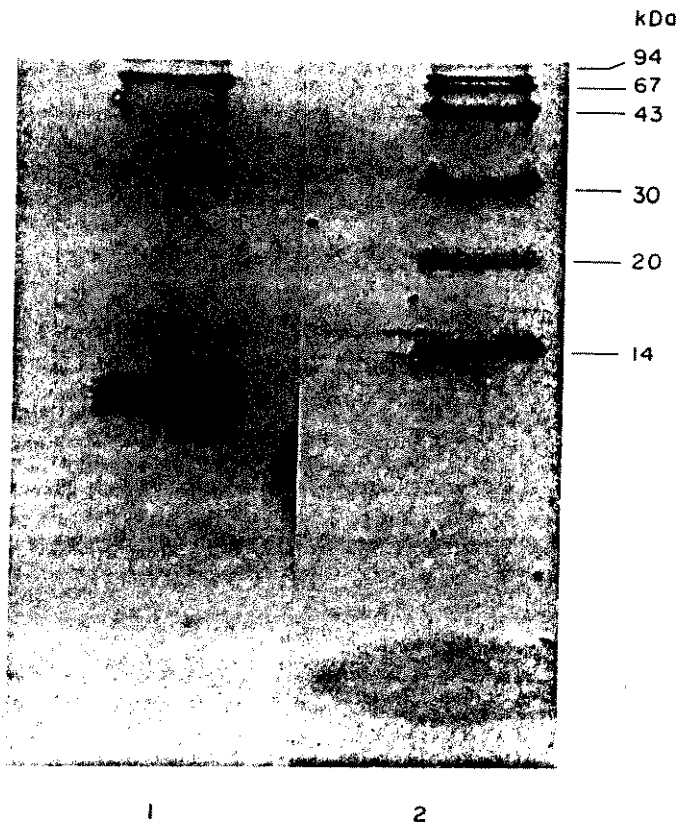


FIG. 4. TRICINE-SDS-PAGE.
Lane (1) PNVI; lane (2) from top: phosphorylase B, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase and α -lactoglobulin.

were responsible for the contractions observed in the rabbit tissues. Our results demonstrate that *Phoneutria nigriventer* venom contains several proteins that present spasmogenic activity on rabbit vascular smooth muscle. Using gel-filtration, ion-exchange and reverse phase high performance liquid chromatography, we have been able to purify one polypeptide and determine its N-terminal sequence, mol. wt and amino acid content.

DINIZ (1963) demonstrated by electrophoresis and chromatography the presence of two

TABLE I. AMINO TERMINAL SEQUENCE OF PNVI TOXIN FROM *Phoneutria nigriventer* VENOM. COMPARISON OF THE N-TERMINAL SEQUENCE OF THE FIRST EIGHT AMINO ACID RESIDUES OF PNVI TOXIN WITH THE AMINO TERMINAL SEQUENCES OF OTHER NEUROTOXIC PEPTIDES (PhTx) ISOLATED FROM THE SAME SPIDER VENOM (REZENDE *et al.*, 1991)

| Toxin | Sequence |
|-------|---------------------------------|
| PNVI | Glu-Ala-Phe-Pro-Gly-Gln-Ser-Thr |
| PhTx1 | Ala-Glu-Leu-Thr-Ser-Cys-Phe-Pro |
| PhTx2 | Ala-Thr-Cys-Ala-Gly-Gln-Asp-Thr |
| PhTx3 | Gly-Cys-Ile-Gly-Arg-Asn-Glu-Ser |

TABLE 2. AMINO ACID COMPOSITION OF PNV1 FROM *Phoneutria nigriventer* VENOM

| Amino acid | PNV1 |
|------------|--------------------|
| Asx | 12.68 (13) |
| Glx | 20.27 (20) |
| Ser | 7.98 (8) |
| Gly | 8.95 (9) |
| His | 2.15 (2) |
| Arg | 7.43 (7) |
| Thr | 6.02 (6) |
| Ala | 9.64 (10) |
| Pro | 7.86 (8) |
| Tyr | 4.37 (4) |
| Val | 6.72 (7) |
| Met | 2.65 (3) |
| 1/2 Cys | 3.54(4) |
| Ile | 5.13 (5) |
| Leu | 8.23 (8) |
| Phe | 4.87 (5) |
| Lys | 5.79 (6) |
| Trp | n.d. |
| Total | 124.28 (125) + Trp |

n.d., not determined

Numbers in parentheses represent the nearest integer.

polypeptides that contract the guinea-pig ileum, with mol. wts between 5000 and 10,000. ENTWISTLE *et al.* (1982) purified a neutral toxic (5.5–5.9 kDa) polypeptide by gel filtration and ion-exchange chromatography that had neurophysiological activity on locust tibial muscle. Three neurotoxic polypeptides, PhTx1 (DINIZ *et al.*, 1990), PhTx2 and PhTx3 (REZENDE *et al.*, 1991) were isolated from PNV and the N-terminal sequenced. These polypeptides have four (ENTWISTLE *et al.*, 1982), seven (PhTx1), nine (PhTx2) and eight (PhTx3) disulfide bridges and three, three, seven and five Glx residues, respectively. The presence of free sulphhydryl groups in PNV1 was not determined and no correction for losses during acid hydrolysis was made for its cystine content. Based on these facts and on the apparent absence of free cysteines in the previously reported toxins, we assumed that PNV1 has two disulfide bridges. There is a high content of Asx + Glx (27%), especially of Glx (20 residues), compared to the other toxins. SDS-PAGE mobility and amino acid composition indicated that PNV1 has approximately 125 residues and a mol. wt of 13,899, twice the number of residues and mol. wt of other known PNV polypeptides. In addition, the N-terminal sequence of PNV1 is different from that described for other PNV polypeptides. Whether the isolated peptide has pharmacological activities other than rabbit vascular smooth muscle contraction is under investigation.

REFERENCES

- ANTUNES, E., MARANGONI, R. A., BORGES, N. C. C., FONTANA, M. D. and DE NUCCI, G. (1990) Pharmacological profile of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmac.* **101**, 508P.
- ANTUNES, E., MARANGONI, R. A., BRAIN, S. D. and DE NUCCI, G. (1992) *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin *in vivo*. *Toxicon* **30**, 1011–1016.
- DINIZ, C. R. (1963) Separação de proteínas e caracterização de substâncias ativas em venenos de aranhas do Brasil. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **35**, 283–291.
- DINIZ, C. R., CORDEIRO, M. N., REZENDE, L., JR., KELLY, P., FISCHER, S., REIMANN, F., OLIVEIRA, E. B. and

- RICHARDSON, M. (1990) The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the Brazilian armed spider, *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Lett.* **263**, 251-253.
- ENTWISTLE, I. D., JOHNSTONE, R. A. W., MEDZIHRADESKY, D. and MAY, T. E. (1982) Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. *Toxicon* **20**, 1059-1067.
- FONTANA, M. D. and VITAL-BRAZIL, O. (1985) Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **18**, 557-565.
- HEINRIKSON, R. L. and MEREDITH, S. C. (1984) Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: pre column derivatization with phenylisothiocyanate. *Analyt. Biochem.* **136**, 65.
- LUCAS, S. (1988) Spiders in Brazil. *Toxicon* **26**, 759-772.
- PATON, W. D. M. (1957) A pendulum auxotonic lever. *J. Physiol., London* **137**, 35P.
- REZENDE, L. JR, CORDEIRO, M. N., OLIVEIRA, E. B. and DINIZ, C. R. (1991) Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the armed spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* **29**, 1225-1233.
- SCHENBERG, S. and PEREIRA-LIMA, F. A. (1966) Pharmacology of the polypeptides from the venom of the spider *Phoneutria fera*. *Mem. Inst. Butantan* **33**, 627-638.
- SCHENBERG, S. and PEREIRA-LIMA, F. A. (1971) *Phoneutria nigriventer* venom. Pharmacology and biochemistry of its components. In: *Venomous Animals and their Venoms*, Vol. 3, pp. 279-297 (BUCHERL, W. and BUCKLEY, E. E., Eds). New York: Academic Press.
- SHAGGER, H. and JAGOW, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analyt. Biochem.* **166**, 368-379.
- VANE, J. R. (1964) The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br. J. Pharmac.* **23**, 360-373.
- VITAL-BRAZIL, O., LEITE, G. B. and FONTANA, M. D. (1988) Modo de ação da peçonha da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaia. *Ciência Cult. (São Paulo)* **40**, 181-185.

Identification of a new vascular smooth muscle contracting polypeptide in *Phoneutria nigriventer* spider venom

(Received 8 February 1993; accepted 17 May 1993)

Abstract—The fractionation of *Phoneutria nigriventer* spider venom by gel filtration (Sephadex G-10-120) followed by ion-exchange chromatography (microgranular CM-cellulose-52) resulted in sixteen fractions (C_1 to C_{XVI}) from which $C_{VII, VIII}$, C_{IX} and $C_{X, XI}$ caused dose-dependent and short-lived contractions of both arterial and venous rabbit vessels. Fraction $C_{X, XI}$ was further purified by a reverse phase HPLC, and a contractile polypeptide (PNV2) was isolated. The amino terminal sequence of PNV2 (LAKRADICQPGKTSQRACET) indicated that it represents a pure polypeptide consisting of a single chain. Furthermore, the amino acid analysis of PNV2 revealed the presence of four disulfide bridges, a high content in Lys (14%), Glx (11%), and the absence of His. The global amino acid composition showed that this polypeptide is composed of 102 residues (Trp not included) with a calculated molecular weight of 12,114. Whether this peptide is responsible for the vascular alterations observed in *Phoneutria* envenomation, such as lung edema and priapism, remains to be further investigated.

Phoneutria nigriventer is the species responsible for most human spider bites in the center, east and south of Brazil [1]. The bite of this spider causes intense and radiating local pain, autonomic dysfunction, and paralysis [2-5]. *Phoneutria nigriventer* venom (PNV)* contains several toxins that exert important biological effects such as voltage-dependent sodium channel activation [6, 7], local edema formation *in vivo* [8], and vascular smooth muscle contractions [9, 10]. Recently, a polypeptide responsible for the contractile activity has been identified [11], which greatly differs from other peptides isolated from PNV [12, 13]. We report here the isolation and biochemical characterization (amino acid composition, N-terminal amino acid sequence and a calculated molecular weight) of a new contractile polypeptide purified from PNV.

Materials and Methods

Venom and reagents. *Phoneutria nigriventer* venom was obtained by electrical stimulation of spiders maintained by the Arthropods Section, Instituto Butantan, São Paulo (SP, Brazil) and desiccated using a vacuum desiccator containing NaOH tablets at room temperature. All chemicals and solvents were of HPLC grade purchased from the Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) or the Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, U.S.A.). Reverse phase chromatography was performed using a Waters (991-PDA) system. The composition of the Krebs solution was (mM): NaCl, 118; NaHCO_3 , 25; glucose, 5.6; KCl, 4.7; KH_2PO_4 , 1.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.17; and $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.5.

Fractionation of PNV. Desiccated PNV was fractionated as described previously [11]. Briefly, PNV (900 mg; dissolved in acetic acid) was separated by gel filtration at 5° on a 2.5 cm \times 190 cm column of Sephadex G-10-120, equilibrated with 2% acetic acid. The eight fractions (S_I – S_{VIII}) obtained were lyophilized and assayed on rabbit arterial and venous vascular smooth muscle. The vasoactive fraction S_I (450 mg) was dissolved in ammonium acetate buffer (3.5 mL, 0.05 M, pH 5.0) and chromatographed on a cation exchange column (microgranular CM-cellulose-52; Whatman). The column (2.5 cm \times 55 cm) was equilibrated previously with this buffer at flow rate of 20 mL/hr (5°), the sample applied, and stepwise elution (0.1 to 3.0 M buffer, pH 5.0) started at an effluent volume of 150 mL.

* Abbreviations: PNV, *Phoneutria nigriventer* venom; RbPA, rabbit pulmonary artery; RbMesV, rabbit mesenteric vein; and RbVC, rabbit vena cava.

The sixteen new fractions (C_1 to C_{XVI}) obtained were lyophilized, redissolved in acetic acid (2%), and desalted at 5° on a 2 cm \times 200 cm column of Sephadex G-10-120, equilibrated with the same solvent, followed by lyophilization. Each fraction was assayed on rabbit arterial and venous vascular smooth muscle.

Reverse phase liquid chromatography. The smooth muscle active fraction is mainly retained in fractions $C_{VII, VIII}$, C_{IX} and $C_{X, XI}$ [11]. Fraction $C_{X, XI}$ obtained from ion-exchange chromatography was purified by reverse phase HPLC on a 0.39 cm \times 30 cm μ Bondapak column (Waters System) with a linear gradient of 0–66% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid (buffer B), at a flow rate of 1 mL/min. The resulting fractions were lyophilized for bioassay and the active fraction was repurified on reverse phase HPLC using step-wise elution in the range of the first purification. Proteins were detected by their absorbance at 220 nm. The purified active fraction was named PNV2.

N-Terminal amino acid sequence of PNV2. Twenty micrograms of the isolated polypeptide (PNV2) were used to determine its N-terminal sequence by automated Edman degradation in an Applied Biosystems model 477A Sequencer. Phenylthiohydantoin amino acids were identified in a model 120-A PTH-amino acid analyzer (Applied Biosystems), according to the retention times of a 20 PTH-amino acid standard.

Amino acid composition of PNV2. Amino acid analysis was performed on a Pico-Tag amino acid analyzer (Water System) as described by Henriksen and Meredith [14]. The purified sample (10 μ g) was hydrolyzed with 6 N hydrochloric acid (Pierce—Sequenal Grade) containing 1% phenol (v/v) at 106° for 24 hr. Hydrolyzates reacted with 20 μ L of fresh derivatization solution (ethanol:triethylamine:water:phenylisothiocyanate, 7:1:1:1, by vol.) for 1 hr at room temperature. The phenylthiocarbonyl (PTC) amino acids were identified by HPLC, comparing their retention times with those of a standard mixture.

Superfusion of vascular smooth muscle. Male New Zealand white rabbits (2.0 to 2.5 kg) were anesthetized with thiopental sodium (30 mg/kg, i.v.) and exsanguinated via the carotid artery. The abdominal and thoracic cavities were opened and the rabbit pulmonary artery (RbPA), mesenteric vein (RbMesV) and vena cava (RbVC) were removed and placed in Krebs solution. The vessels were cleared of adipose tissue and the endothelial layer was removed mechanically to avoid interference of endothelial-

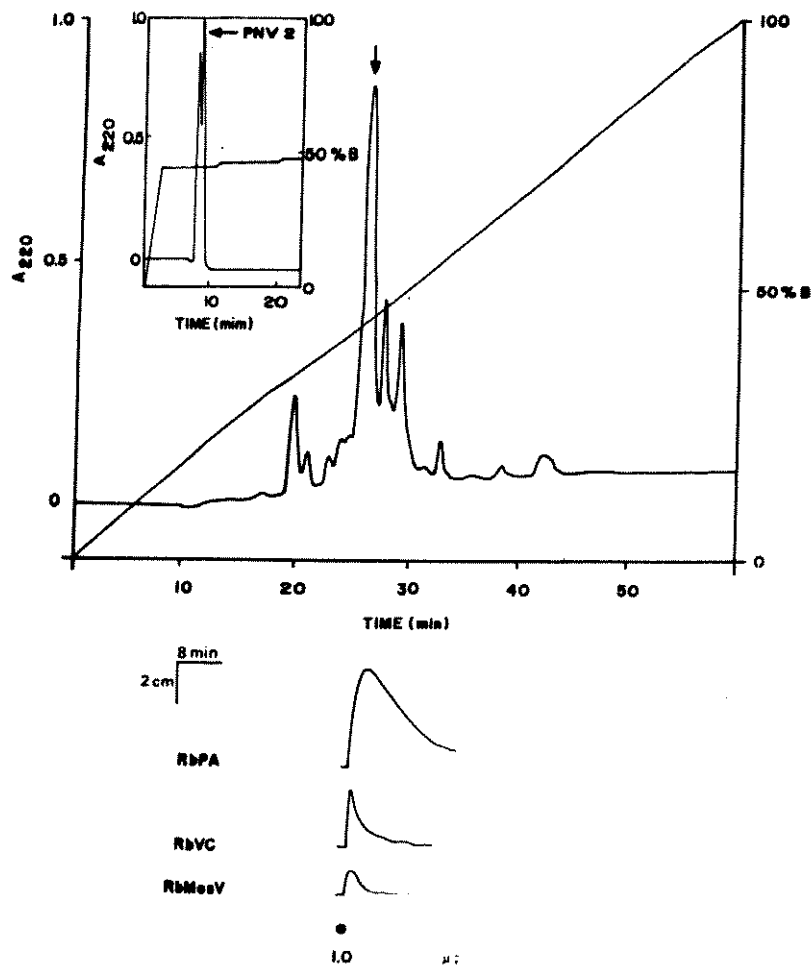


Fig. 1. Spasmogenic activity in rabbit pulmonary artery (RbPA), vena cava (RbVC) and mesenteric vein (RbMesV) of peaks obtained by reverse phase HPLC of fraction X + XI on a 0.39 cm \times 30 cm μ Bondapak C18 analytical column. For elution, a linear gradient from 0–66% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid was used. The vascular tissues were de-endothelialized and superfused in cascade. The peak containing the spasmogenic activity (indicated by the arrow) was repurified by HPLC and revealed two other peaks (inset), the latter being responsible for the contractile activity.

derived vasoactive factors. The removal of endothelium was assessed by the lack of relaxation induced by acetylcholine (10^{-6} M) in noradrenaline-precontracted tissues. The tissues were suspended in a cascade [15] and continuously superfused with oxygenated (95% O_2 + 5% CO_2) and warmed (37°) Krebs solution at 5 mL/min. Responses of the tissues were detected with auxotonic levers [16] attached to Harvard heart/smooth muscle transducers and displayed on a Watanabe multichannel pen recorder (model WTR 381). After an equilibration period of approximately 60 min, the fractions obtained from PNV separation were injected as a single bolus.

Results and Discussion

Resolution of fraction X + XI was achieved through HPLC (Fig. 1). Spasmogenic activity in both rabbit arterial (RbPA) and venous (RbVC and RbMesV) tissues was detected in the peak indicated by the arrow (Fig. 1). Similarly to whole PNV [10], the contractile activity present in this peak was dose-dependent and of short-lived duration. No spasmogenic activity was detected in the other peaks (not shown).

Repurification of the described active peak by HPLC using discontinuous linear gradient between 40 and 42% of buffer B revealed the presence of two other peaks (inset of Fig. 1), from which only the latter (indicated as PNV2) presented spasmogenic activity on the vascular tissues (not shown).

The amino terminal sequence of this vascular smooth muscle active fraction (PNV2) and its amino acid composition are shown in Tables 1 and 2, respectively. Results from N-terminal amino acid sequence support the interpretation that PNV2 represents a pure polypeptide consisting of a single chain. Amino acid analysis indicated the presence of four disulfide bridges, a high content in Lys (14%), Glx (11%) and the absence of His. The global amino acid composition indicated the presence of 102 residues (Trp not included) and a calculated molecular weight of 12,114.

Entwistle *et al.* [12] purified a neutral polypeptide (5.5 to 5.9 kDa) with four disulfide bridges responsible for repetitive action potentials and twitching of locust skeletal muscles. Three other neuropeptides (6–9 kDa) with seven (PhTx1), nine (PhTx2) and eight (PhTx3) disulfide bridges

Table 1. Amino terminal sequence of PNV2 toxin purified from *Phoneutria nigriventer* venom: Comparison of the N-terminal sequence of the first 20 amino acid residues of PNV2 toxin with other toxin peptides isolated from the same spider venom

| Toxin* | N-Terminal sequence |
|--------|--------------------------|
| | 1 20 |
| PNV2 | LAKRADICQPGKTSQRACET... |
| PNV1 | EAFPGQST... |
| PhTx1 | AELTSCFPVGHCECDGDASNC... |
| PhTx2 | ATCAGQDQTCK... |
| PhTx3 | GCIGRNESQKKDNVYKFKE... |

* PNV2: this paper; PNV1: Ref. 11; and PhTx: Ref. 13.

Table 2. Amino acid composition of PNV2 purified from *Phoneutria nigriventer* venom

| Amino acid | PNV2 |
|------------|------------|
| Asx | 8.12 (8)* |
| Glx | 10.80 (11) |
| Ser | 7.18 (7) |
| Gly | 10.35 (10) |
| His | 0 |
| Arg | 3.85 (4) |
| Thr | 7.70 (8) |
| Ala | 11.34 (11) |
| Pro | 2.48 (2) |
| Tyr | 3.22 (3) |
| Val | 2.51 (3) |
| Met | 2.72 (3) |
| Cys | 7.85 (8) |
| Ile | 2.63 (3) |
| Leu | 0.88 (1) |
| Phe | 5.89 (6) |
| Lys | 14.09 (14) |
| Trp | ND† |

* Numbers in parentheses represent the nearest integer.

† ND = not determined.

were isolated from PNV and thought to be responsible for the neurotoxicity presented by the venom [13, 17]. We have recently purified a peptide (PNV1) with two disulfide bridges and a larger molecular weight (13,899) that induces short-lived contractions on rabbit vascular smooth muscle [11]. Here we report another peptide (PNV2) with a similar molecular weight (12,114) that also presents spasmogenic activity on rabbit isolated blood vessels. Our results indicate that PNV2 lacks free sulfhydryl groups even though no corrections for losses during acid hydrolysis were done concerning its half-cystine content. Considering that the five toxins described above do not present free cysteines, we assume that the cysteines in PNV2 are arranged to form four disulfide bridges.

Since the spasmogenic effect of whole PNV in rabbit vascular smooth muscle is not affected by tetrodotoxin [10], it is unlikely that sodium channel activation plays an important role in these tissues, as it does in both rat phrenic-diaphragm muscle-nerve preparation [6] and guinea pig isolated atria [7]. Furthermore, the finding that the α -adrenoceptor antagonist phenoxybenzamine does not affect PNV-induced contractions [10] excludes the possibility that

PNV induces endogenous noradrenaline release from autonomic nerve endings present in the vascular walls, as occurs in guinea pig auricles [7]. *Phoneutria* envenomation is mainly characterized by severe local pain, but it may be accompanied by vascular disturbances such as lung edema and priapism [2-5]. Whether these peptides with vascular smooth muscle spasmogenic activity are responsible for the permeability alterations mentioned remains to be further investigated.

Departments of
*Pharmacology and
†Biochemistry
University of Campinas
(UNICAMP)

13081, Campinas (SP),
Brazil; and

‡Department of Biochemistry
Ribeirão Preto Medical School
University of São Paulo
(USP)

14049, Ribeirão Preto (SP)
Brazil

ANTONIO C. BENTO*

JOSE C. NOVELLO†

SERGIO MARANGONI†

EDSON ANTUNES*

JOSE R. GIGLIO‡

BENEDITO OLIVEIRA†

GILBERTO DE NUCCI*§

REFERENCES

- Lucas S. Spiders in Brazil. *Toxicon* 26: 759-772, 1988.
- Vital-Brazil O and Vellard J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas I. *Mem Inst Butantan* 2: 5-77, 1925.
- Vital-Brazil O and Vellard J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas II. *Mem Inst Butantan* 3: 3-77, 1926.
- Vital-Brazil O and Vellard J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas III. *Mem Inst Butantan* 3: 243-294, 1926.
- Schenberg S and Pereira-Lima FA. *Phoneutria nigriventer* venom. Pharmacology and biochemistry of its components. In: *Venomous Animals and Their Venoms* (Eds. Bucherl W and Buckley EF), Vol. 3, pp. 279-297. Academic Press, New York, 1971.
- Fontana MD and Vital Brazil O. Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Braz J Med Biol Res* 18: 557-565, 1985.
- Vital-Brazil O, Leite GB and Fontana MD. Modo de ação da peçonha da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaia. *Ciênc Cult* 40: 181-185, 1988.
- Antunes E, Marangoni RA, Brain SD and de Nucci G. *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin *in vivo*. *Toxicon* 30: 1011-1016, 1992.
- Antunes E, Marangoni RA, Borges NCC, Fontana MD and de Nucci G. Pharmacological profile of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 101: 508P, 1990.
- Antunes E, Marangoni RA, Borges NCC, Hyslop S, Fontana MD and de Nucci G. Effects of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Braz J Med Biol Res* 26: 81-91, 1993.
- Marangoni S, Borges NCC, Marangoni RA, Antunes E, Vieira CA, Novello JC, Domont GB, Giglio JR, Oliveira B and de Nucci G. Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. *Toxicon* 31: 377-384, 1993.

§ Corresponding author: Dr. Gilberto de Nucci, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences—UNICAMP, P.O. Box 6111, 13081, Campinas (SP), Brazil. Tel. 55-192-392968; FAX 55-192-521516.

12. Entwistle ID, Johnstone RAW, Medzihradzky D and May TE, Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. *Toxicon* **20**: 1059-1067, 1982.
13. Rezende L Jr, Cordeiro MN, Oliveira EB and Diniz CR, Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the armed spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* **29**: 1225-1233, 1991.
14. Heinrichson RI and Meredith SC, Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal Biochem* **136**: 65-74, 1984.
15. Vane JR, The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br J Pharmacol Chemother* **23**: 360-373, 1964.
16. Paton WDM, A pendulum auxotonic lever. *J Physiol (Lond)* **137**: 35P-36P, 1957.
17. Diniz CR, Cordeiro MN, Junior LR, Kelly P, Fischer S, Reiman F, Oliveira EB and Richardson M, The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Lett* **263**: 251-253, 1990.



ISOLATION OF A POLYPEPTIDE FROM *PHONEUTRIA NIGRIVENTER* SPIDER VENOM RESPONSIBLE FOR THE INCREASED VASCULAR PERMEABILITY IN RABBIT SKIN

A. C. BENTO,¹ E. REGO,² S. R. PEDROSO-MARIANI,¹ L. C. MANCUSO,³
J. R. GIGLIO,³ J. C. NOVELLO,² S. MARANGONI,² I. CARACELLI,⁴
B. OLIVEIRA,² E. ANTUNES^{1*} and G. DE NUCCI¹

Departments of ¹Pharmacology, and ²Biochemistry, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6111, 13081-970, Campinas (SP), Brazil; ³Department of Biochemistry, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto (SP), Brazil; and ⁴Institute of Physics and Chemistry, University of São Paulo, São Carlos (SP), Brazil

(Received 3 June 1994; accepted 15 September 1994)

A. C. Bento, E. Rego, S. R. Pedroso-Mariani, L. C. Mancuso, J. R. Giglio, J. C. Novello, S. Marangoni, I. Caracelli, B. Oliveira, E. Antunes and G. de Nucci. Isolation of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom responsible for the increased vascular permeability in rabbit skin. *Toxicon* 33, 171-178, 1995. Fractionation of *Phoneutria nigriventer* venom by Sephadex G-10 followed by ion-exchange chromatography yields a fraction (fraction XIII) which increases microvascular permeability in rabbit skin *in vivo* by activating the tissue kallikrein-kinin system. One polypeptide (PNV3) with the ability to increase microvascular permeability in the rabbit skin *in vivo* was isolated from fraction XIII and biochemically characterized. PNV3 has 132 amino acid residues with a calculated mol. wt of 14,475. This polypeptide showed the following N-terminal sequence: AVFAIQDQPC. Amino acid analysis indicated the presence of six disulfide bridges and a high content of Glx (20%). Pairwise comparison of PNV3 amino acid sequence with 27 other spider venom polypeptides and proteins indicated that PNV3 presents high similarity (60-70%) with other toxins (Tx2.1, Tx2.5 and Tx2.6) isolated from *P. nigriventer* venom.

INTRODUCTION

The venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* contains different polypeptides that evoke a variety of pharmacological effects such as contraction of vascular (Antunes *et al.*, 1993a; Marangoni, S. *et al.*, 1993; Bento *et al.*, 1993) and non-vascular (Diniz, 1963) smooth muscle, stimulatory effects on the neuromuscular preparation from the locust tibial muscle (Entwistle *et al.*, 1982), activation of voltage-

* Author to whom correspondence should be addressed.

dependent sodium channels (Fontana and Vital Brazil, 1985) and neurotoxicity (Diniz *et al.*, 1990; Rezende *et al.*, 1991; Cordeiro *et al.*, 1993). *Phoneutria nigriventer* venom (PNV) also activates the tissue kallikrein system in rabbit skin leading to the local generation of kinins and subsequently oedema formation (Antunes *et al.*, 1992; Marangoni, R. A. *et al.*, 1993). The activation of tissue kallikrein in rabbit isolated corpus cavernosum by PNV triggers relaxation of this tissue (Lopes-Martins *et al.*, 1994), an effect that probably reflect the priapism observed in *Phoneutria* envenomation (Schenberg and Pereira-Lima, 1971). Recently, we partially purified the fraction responsible (fraction XIII) for the tissue kallikrein-kinin system in the rabbit skin and showed that it presents the same pharmacological profile as whole PNV with regard to tissue kallikrein activation (Antunes *et al.*, 1993b). In this study we extend our previous report, describing the isolation and biochemical characterization (amino acid composition, N-terminal sequence and mol. wt) of a polypeptide contained in fraction XIII responsible for the increased vascular permeability in rabbit skin *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Venom and reagents

Lyophilized *Phoneutria nigriventer* venom was purchased from the Butantan Institute (São Paulo, Brazil). The venom was collected from the spiders by electrical stimulation. Pentobarbitone sodium (Sagatal), prostaglandin E₁ and Evans Blue dye were obtained from May & Baker (Dagenham, Essex, U.K.), Upjohn (Kalamazoo, U.S.A.) and Merck (Darmstadt, F.R.G.), respectively. ¹²⁵I-Human serum albumin (50 µCi/ml, 20 mg albumin/ml) was supplied by Amersham International (Amersham, U.K.). *N*-*p*-Tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) was obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, U.S.A.). Dialysis tubing (mol. wt cut-off 12,000–14,000) was bought from Philip Harris Scientific (London, U.K.).

Fractionation of Phoneutria nigriventer venom (PNV)

Desiccated PNV was fractionated as previously described (Marangoni, S. *et al.*, 1993). Briefly, PNV (900 mg; dissolved in acetic acid) was separated by gel filtration at 5°C on a 2.5 cm × 190 cm column of Sephadex G-10-120, equilibrated with 2% acetic acid. Eight fractions (S_I-S_{VIII}) were obtained and lyophilized. Fraction S_I (450 mg; eluted in the void volume) was dissolved in 3.5 ml of ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 5.0) and chromatographed on microgranular CM-Cellulose-52 (Whatman). The column (2.5 cm × 55 cm) was previously equilibrated with this buffer at 5°C, the sample applied and a stepwise elution with 0.1 M to 3.0 M buffer (pH 5.0) was started at an effluent volume of 150 ml. The 16 new fractions thus obtained were lyophilized, redissolved in 2% acetic acid and desalted at 5°C on a 2 cm × 200 cm column of Sephadex G-10-120, equilibrated with the same solvent, followed again by lyophilization. Fraction XIII was detected as the main component responsible for the increased vascular permeability of PNV (Antunes *et al.*, 1993a).

Reverse phase HPLC of fraction XIII

Fraction XIII obtained from ion-exchange chromatography was further fractionated by reverse phase HPLC on a 0.39 cm × 30 cm µBondapak column (Waters System). Elution started with trifluoroacetic acid (solvent A) followed by a 60 min linear concentration gradient of 0–100% (v/v) of solvent B (66% v/v acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid). The resulting fractions were lyophilized for bioassay and the active fractions were repurified on reverse phase HPLC using step-wise elution within the range of 50–65% of solvent B. Proteins were detected by their absorbance at 220 nm. The purified active polypeptide was named PNV3.

Electrophoresis of PNV3

Tricine-SDS-PAGE was carried out as described by Shagger and Jagow (1987). Briefly, the gels were composed of a small-pore gel, 16.5%T–6%C, overlaid by a 10%T–3%C spacer gel, which was overlaid by the 4%T–3%C stacking gel. Samples containing approximately 50 µg protein were dissolved in 4% SDS, 12% glycerol (w/v), 50 mM Tris, 2% mercaptoethanol (v/v), 0.01% Coomassie blue G adjusted with HCl to pH 6.8. Anode and cathode buffers were 0.2 M Tris, pH 8.9 and 0.1 M Tris, 0.1 M Tricine, 0.1% SDS (w/v) pH 8.25, respectively. Electrophoresis was performed at 90 V. The protein bands were fixed in a solution containing 50% methanol, 10% acetic acid for 60 min and then stained with 0.025% Coomassie blue G in 10% acetic acid.

N-Terminal amino acid sequence of PNV3

Twenty micrograms of the isolated peptide (PNV3) was used to determine its N-terminal sequence by automated Edman degradation in an Applied Biosystems model 477A Sequencer. Phenylthiohydantoin amino acids were identified in a model 120-A PTH-amino acid analyser (Applied Biosystems), according to the retention times of a 20-PTH amino acid standard.

Amino acid composition of PNV3

Amino acid analysis was performed on a Pico-Tag amino acid analyser (Waters System) as described by Henriksen and Meredith (1984). The purified sample (10 µg) was hydrolysed with 6N hydrochloric acid (Pierce-Sequenal Grade) containing 1% phenol (v/v) at 105°C for 24 hr. Hydrolysates reacted with 20 µl of fresh derivatization solution (ethanol:triethylamine:water:phenylisothiocyanate, 7:1:1:1, by vol.) for 1 hr at room temperature. The phenylthiocarbamyl (PTC) amino acids were identified by HPLC, comparing their retention times with those of a standard mixture.

Arginine esterase and proteolytic activities

Esterase activity in dialysed *Phoneutria nigriventer* venom (Antunes *et al.*, 1992) was assayed on *N*α-*p*-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) by the method of Ehrenpreis and Scheraga (1957). Proteolytic activity was measured by the method of Reimerdes and Klostermeyer (1976) using casein as the substrate.

Measurement of local oedema formation in rabbit skin

Local oedema formation was measured in male New Zealand White rabbits (1.5–2.5 kg) as the local accumulation of i.v. injected ¹²⁵I-human serum albumin into skin sites as described previously (Williams, 1979). The rabbits were anaesthetized with pentobarbital sodium (Sagatal, 30–40 mg/kg) injected via the marginal ear vein, and maintenance doses were given when required. ¹²⁵I-Human serum albumin (2 µCi/kg) and Evans blue dye (0.5 ml/kg, 2.5% w/v) were injected by the same route. The agents under test were made up in sterile saline and injected intradermally in 100 µl volumes into the shaved dorsal skin according to a balanced site pattern with six replicates per dose. After 30 min, a 5 ml cardiac blood sample was taken into heparin and the animal killed by a Sagatal overdose. The dorsal skin was removed and the injection sites were punched out (15 mm diameter) and counted for radioactivity in a gamma counter. Oedema formation at each site was expressed as plasma volume, calculated from the counts in 1 ml of plasma.

Each fraction obtained from the repurification of fraction XIII was routinely co-injected with the vasodilator prostaglandin E₁ (PGE₁; 0.1 nmole/site) in the rabbit skin in order to allow full observation of the oedematogenic response, as previously described (Brain and Williams, 1985; Antunes *et al.*, 1992).

RESULTS

Gel filtration (Sephadex G-10) of whole PNV followed by ion-exchange chromatography (CM-Cellulose-52) of the main fraction S₁ resulted in 16 fractions (Marangoni, S. *et al.*, 1993). Fraction XIII was found to be responsible for the increased vascular permeability as assessed in rabbit skin *in vivo* (Antunes *et al.*, 1993b). Reverse phase HPLC of fraction XIII (Fig. 1) revealed several subfractions, of which those indicated by A, B and C at the dose of 30 µg/site significantly increased the local microvascular permeability when co-injected with the vasodilator PGE₁ (14.7 ± 1.4 µl, 44.2 ± 3.9 µl, 76 ± 6.0 µl and 69 ± 3.3 µl, extravasation induced by PGE₁ alone, peaks A, B and C, respectively). The injection of the subfractions corresponding to other peaks (30 µg/site each) combined with PGE₁ failed to induce significant local oedema formation, as compared to PGE₁-injected sites (not shown). Subfraction C was repurified using step-wise elution within the range of 50–65% of solvent B. This repurified fraction was named PNV3 and its biochemical characterization is shown below.

PNV3 presented a single band after Tricine-SDS-PAGE (Fig. 2) and an electrophoretic mobility compatible with a mol. wt near 14,000 (as compared to the markers). Amino acid analysis of PNV3 presented in Table I indicates the probable presence of six disulfide bridges (free -SH groups not determined), a high content of Glx (20%) and only one residue of His and Met. The global amino acid composition is

consistent with 132 residues (not including Trp) and a calculated mol. wt of 14,475. Edman degradation analysis of PNV3 showed the amino terminal sequence AVFAIQDQPC.

Dialysed *Phoneutria nigriventer* venom was devoid of any caseinolytic activity up to a final concentration of 100 $\mu\text{g}/4\text{ ml}$. The TAME esterase specific activity found (3.1 U/mg) corresponds to the spontaneous hydrolysis of the substrate at pH 8.0. For comparison, specific activities of 117.7 TAME U/mg (Selistre and Giglio, 1987) and 7120 caseinolytic U/mg (Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988) were reported for *Bothrops insularis* and *Bothrops jararacussu* snake venoms, respectively.

DISCUSSION

The increased microvascular permeability induced by PNV in rat and rabbit skin (Antunes *et al.*, 1992) involves local kinin synthesis in response to activation of the tissue (but not plasma) kallikrein-kininogen-kinin system (Marangoni, R. A. *et al.*, 1993). The active fraction (fraction XIII) contained in PNV responsible for the tissue kallikrein-kinin system activation was recently fractionated (Antunes *et al.*, 1993b). We have now identified a polypeptide isolated from fraction XIII which increases the vascular permeability in the rabbit skin.

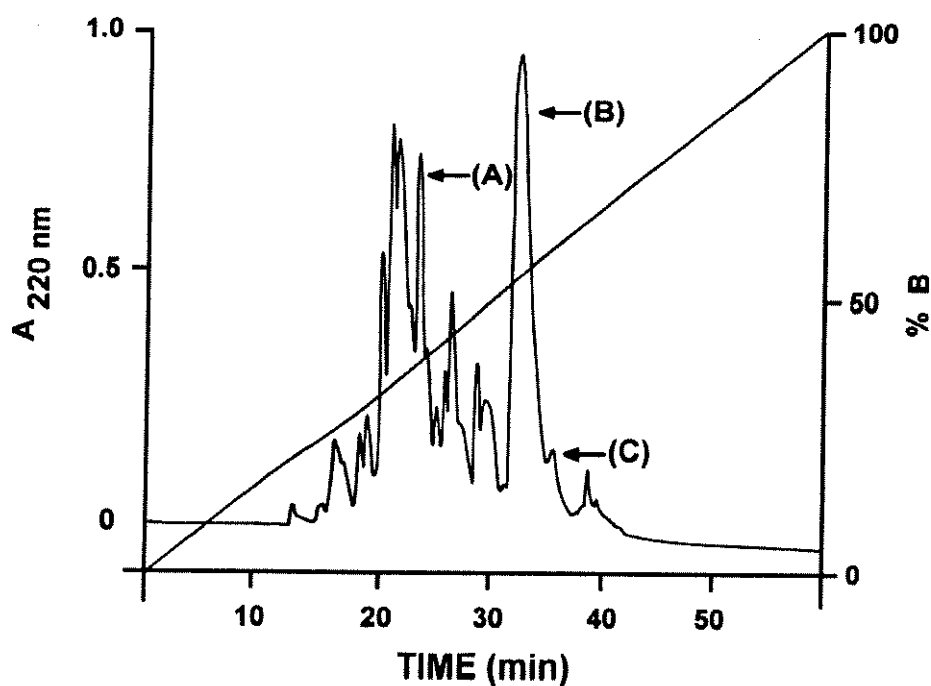


Fig. 1. Reverse phase HPLC of fraction XIII obtained after gel filtration (Sephadex G-10) of whole PNV followed by CM-Cellulose ion exchange chromatography.

Reverse phase HPLC of fraction XIII on a $0.39 \times 30\text{ cm}$ μ Bondapak (Waters System) C18 analytical column revealed several protein fractions from which three were selected as indicated by A, B and C. Elution was started with solvent A (trifluoroacetic acid) followed by a linear gradient of 0–100% of solvent B (66% v/v acetonitrile in 0.1% v/v trifluoroacetic acid). Subfraction C was repurified using step-wise elution within the range of 50–65% of solvent B. The purified polypeptide was named PNV3.

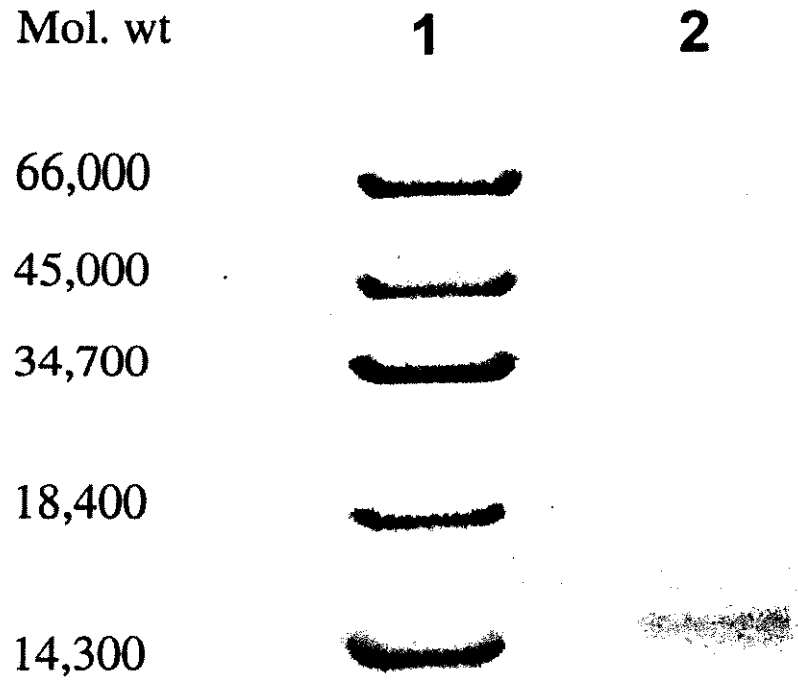


Fig. 2. Tricine SDS electrophoresis of PNV3. Lane 1: Mol. wt markers; lane 2: purified PNV3 after reverse phase HPLC. Gels were stained with 0.25% Coomassie blue. Bovine albumin (66,000), ovalbumin (45,000), pepsin (34,700), lactoglobulin (18,400) and lysozyme (14,300) were used as markers.

Our results from automated N-terminal amino acid sequence determination support the interpretation that PNV3 is a pure single-chain polypeptide. Determination of free sulfhydryl groups for PNV3 was not done and no correction for losses during acid hydrolysis was made considering its cystine content. So, our results cannot exclude this possibility. Pairwise comparison of PNV3 amino acid sequence with 27 other spider venom polypeptides and proteins obtained from different venoms such as the μ and ω agatoxins from *Agelenopsis aperta* (Skinner *et al.*, 1989; Adams *et al.*, 1990), the curtatoxins from *Hololena curta* (Stapleton *et al.*, 1990), versutoxin from *Atrax versutus* (Brown *et al.*, 1988), robustoxin from *Atrax robustus* (Scheumack *et al.*, 1985), the Tx1, Tx2 and Tx3 neurotoxins from *Phoneutria nigriventer* (Diniz *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992, 1993), PNV1 and PNV2 (Marangoni, S. *et al.*, 1993; Bento *et al.*, 1993) polypeptides from *P. nigriventer* venom, reveals similarity of PNV3 with the N-terminal sequences of Tx2.1, Tx2.5 and Tx2.6 neurotoxins (60, 60 and 70% identity, respectively).

Tissue kallikreins (mol. wt 25,000–43,000) are single-chain, acidic glycoproteins physicochemically and immunologically distinct from plasma kallikreins and readily release kinin from both high and low mol. wt kininogen (Bhoola *et al.*, 1992). The peptide responsible for the activation of the tissue kallikrein system has a calculated mol. wt of 15,000, well below the mol. wt of tissue kallikreins, excluding in this way the possibility that the

Table 1. Amino acid composition of PNV3 purified from *Phoneutria nigriventer* venom

| Amino acid | PNV3 |
|------------|------------|
| Asp | 12.20 (12) |
| Glu | 27.39 (27) |
| Ser | 1.55 (2) |
| Gly | 16.64 (17) |
| His | 1.23 (1) |
| Arg | 5.89 (6) |
| Thr | 5.30 (5) |
| Ala | 9.76 (10) |
| Pro | 5.48 (5) |
| Tyr | 7.00 (7) |
| Val | 2.52 (3) |
| Met | 1.00 (1) |
| 1/2 Cys | 12.37 (12) |
| Ile | 4.75 (5) |
| Leu | 4.71 (5) |
| Phe | 3.63 (4) |
| Lys | 9.62 (10) |
| Trp | n.d. |
| Total | 132 + Trp |

n.d., Not determined. Numbers in parentheses represent the nearest integer.

activation of tissue kallikrein could be due to the presence of a spider kallikrein in the venom (Antunes *et al.*, 1993b). This is further supported by the finding that the venom itself is devoid of esterase and caseinolytic activity.

Tissue kallikreins are synthesized in all tissues examined to date in the form of the preproenzyme (tissue prokallikrein). The activators of tissue prokallikreins so far described, namely trypsin, thermolysin (Takada *et al.*, 1985) and arginine esterase from rat submandibular gland (Kamada *et al.*, 1990), are active only on *in vitro* systems. Here we report a polypeptide that is able to activate this system *in vivo*. Since it is very unlikely that this activation could be due to a direct (enzymatic) action of the polypeptide on tissue prokallikrein, our results indicate that the polypeptide probably interacts with the cell membrane and causes activation inside the cell. Since the endogenous protease responsible for the activation of tissue kallikrein system is unknown, as is its modulation, the identification of this polypeptide may constitute a useful tool to understand further the mechanisms involved in this system.

Acknowledgements—A. C. Bento thanks Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). E. Rego is a fellow from PICD/CAPES, Universidade do Estado da Bahia, Brazil. G. de Nucci thanks the Wellcome Trust (London, U.K.). J. R. Giglio thanks Conselho Nacional de Pesquisa.

REFERENCES

- Adams, M. E., Bindokas, V. P., Hasegawa, L. and Venema, V. J. (1990) W-Agatoxins: novel calcium channel antagonist of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. *J. biol. Chem.* **265**, 861–867.
- Antunes, E., Marangoni, R. A., Brain, S. D. and de Nucci, G. (1992) *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin *in vivo*. *Toxicon* **30**, 1011–1016.

- Antunes, E., Marangoni, R. A., Borges, N. C. C., Hyslop, S., Fontana, M. D. and de Nucci, G. (1993a) Effect of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **26**, 81-91.
- Antunes, E., Marangoni, R. A., Giglio, J. R., Brain, S. D. and de Nucci, G. (1993b) Activation of tissue kallikrein-kininogen-kinin system in rabbit skin by a fraction isolated from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. *Toxicon* **31**, 1385-1391.
- Bento, A. C., Novello, J. C., Marangoni, S., Antunes, E., Giglio, J. R., Oliveira, B. and de Nucci, G. (1993) Identification of a new vascular smooth muscle contracting polypeptide in the *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1092-1095.
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D. and Worthy, K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.* **44**, 4-80.
- Brain, S. D. and Williams, T. J. (1985) Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* **86**, 855-860.
- Brown, M. R., Scheumack, D. D., Tyler, M. I. and Howden, M. E. H. (1988) Amino acid sequence of versutoxin, a lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax versutus*. *Biochem. J.* **250**, 401-405.
- Cordeiro, M. D. N., Valentim, A. D. C., Diniz, C. R., Von Eickstedt, V. R. D., Gilroy, J. and Richardson, M. (1992) Purification and complete amino acid sequences of four Tx2 type neurotoxins from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* (Keys.). *FEBS Lett.* **310**, 153-156.
- Cordeiro, M. D. N., Figueiredo, S. G., Valentim, A. D. C., Diniz, C. R., Von Eickstedt, V. R. D., Gilroy, J. and Richardson, M. (1993) Purification and amino acid sequences of six TX3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* (Keys.). *Toxicon* **31**, 35-42.
- Diniz, C. R. (1963) Separação de proteínas e caracterização de substâncias ativas em venenos de aranhas do Brasil. *An. Acad. Bras. Ci.* **35**, 283-291.
- Diniz, C. R., Cordeiro, M. N., Junior, L. R., Kelly, P., Fischer, S., Reiman, F., Oliveira, E. B. and Richardson, M. (1990) The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Lett.* **263**, 251-253.
- Ehrenpreis, S. and Scheraga, H. A. (1957) Observations on the analysis for thrombin and the activation of fibrin monomer. *J. Biol. Chem.* **227**, 1043-1061.
- Entwistle, I. D., Johnstone, R. A. W., Medzihradzky, D. and May, T. E. (1982) Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. *Toxicon* **20**, 1059-1067.
- Fontana, M. D. and Vital Brazil, O. (1985) Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **18**, 557-565.
- Heinrikson, R. L. and Meredith, S. C. (1984) Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: pre-column derivatization with phenylisothiocyanate. *Analyt. Biochem.* **136**, 65-71.
- Homsí-Brandeburgo, M. I., Queiroz, L. S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L. and Giglio, J. R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothrospoxin. *Toxicon* **26**, 615-627.
- Kamada, M., Furuhashi, N., Yamaguchi, T., Ikakita, M., Kizuki, K. and Moriya, H. (1990) Observation of tissue prokallikrein activation by some serine proteases, arginine esterases in rat submandibular gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 231-237.
- Lopes-Martins, R. A. B., Antunes, E., Oliva, M. L. V., Sampaio, C. A. M., Burton, J. and de Nucci, G. (1994) Pharmacological characterisation of rabbit corpus cavernosum relaxation mediated by the tissue kallikrein-kinin system. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 81-86.
- Marangoni, R. A., Antunes, E., Brain, S. D. and de Nucci, G. (1993) *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom activates tissue kallikrein-kininogen-kinin system in rabbit skin in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **109**, 539-543.
- Marangoni, S., Borges, N. C. C., Marangoni, R. A., Antunes, E., Vieira, C. A., Novello, J. C., Domont, G. B., Giglio, J. R., Oliveira, B. and de Nucci, G. (1993) Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. *Toxicon* **31**, 377-384.
- Reimerdes, E. H. and Klostermeyer, H. (1976) Determination of proteolytic activities on casein substrates. In: *Methods in Enzymology*, Vol. XLV, pp. 26-28 (Hirs, C. H. and Timashell, S. N., Eds). New York: Academic Press.
- Rezende, L., Jr, Cordeiro, M. N., Oliveira, E. B. and Diniz, C. R. (1991) Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "armed spider" *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* **29**, 1225-1233.
- Selistre, H. S. and Giglio, J. R. (1987) Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Toxicon* **25**, 1135-1144.
- Schagger, H. and Jagow, G. (1987) Tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analyt. Biochem.* **166**, 368-379.
- Schenberg, S. and Pereira-Lima, F. A. (1971) *Phoneutria nigriventer* venom. Pharmacology and biochemistry of its components. In: *Venomous Animals and their Venoms*, Vol. 3, pp. 279-297 (Bucherl, W. and Buckley, E. E., Eds). New York: Academic Press.
- Scheumack, D. D., Claassens, R., Whiteley, N. M. and Howden, M. E. H. (1985) Complete amino acid sequence of a new type of lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax robustus*. *FEBS Lett.* **181**, 154-156.

- Skinner, W. S., Adams, M. E., Quistad, G. B., Kataoka, H., Cesarin, B. J., Enderlin, F. E. and Schooley, D. A. (1989) Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Alegenopsis aperta*. *J. biol. Chem.* **264**, 2150-2155.
- Stapleton, A., Blankenship, D. T., Ackerman, D. L., Chen, T., Gorder, G. W., Manley, G. D., Palfreyman, M. G., Coutant, J. E. and Cardin, A. D. (1990) Neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from the funnel-web spider *Hololena curta*. *J. biol. Chem.* **265**, 2054-2059.
- Takada, Y., Skidgel, R. A. and Erdos, E. G. (1985) Purification of human urinary prokallikrein. Identification of the site of activation by the metalloproteinase thermolysin. *Biochem. J.* **232**, 851-858.
- Williams, T. J. (1979) Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and the vascular changes of inflammation. *Br. J. Pharmac.* **65**, 517-524.

TOXICON

Editor-in-Chief: Professor Alan Harvey
Department of Physiology and Pharmacology
University of Strathclyde
204 George Street
Glasgow
G1 1XW

November 30, 1995

Dr E. Antunes
Department of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences
UNICAMP PO Box 6111
13081 Campinas
Sao Paulo
Brazil

Tel 0141 553 4155
Fax 0141 552 8376

Dear Dr Antunes

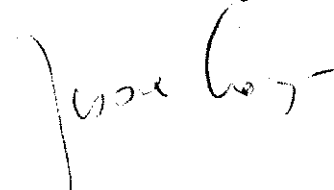
Manuscript number 95 206

E. Rego, A.C. Bento, R.A.B. Lopes-martins, E. Antunes, J.C. Novello, S. Marangoni, J.R. Giglio, B. Oliveira and G. de Nuccel

**ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A POLYPEPTIDE FROM
PHONEUTRIA NIGRIVENTER SPIDER VENOM THAT RELAXES RABBIT
CORPUS CAVERNOSUM IN VITRO**

Thank you for submitting your manuscript to *Toxicon*. This has been sent to referees and I will contact you when it has been reviewed.

Yours sincerely



Alan Harvey

**ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A
POLYPEPTIDE FROM *PHONEUTRIA NIGRIVENTER*
SPIDER VENOM THAT RELAXES RABBIT CORPUS
CAVERNOSUM *IN VITRO***

**E. Rego¹, A. C. Bento², R. A. B. Lopes-Martins², E. Antunes², J. C.
Novello¹, S. Marangoni¹, J. R. Giglio³, B. Oliveira¹ & G. de Nucci²**

Departments of ¹Biochemistry and ²Pharmacology, UNICAMP, PO Box
6111, 13081-970, Campinas (SP), Brazil and ³Department of
Biochemistry, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo,
14049, Ribeirão Preto (SP), Brazil.

Author for correspondence:

Edson Antunes, PhD
Department of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences - UNICAMP
PO Box 6111
13081-970 - Campinas (SP)
Brazil
fax 55-192-521516
phone 55-192-397482

ABSTRACT

The venom of the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* has been fractionated using a C18 μ Bondapack reverse phase HPLC column. The resulting fractions were assayed in the rabbit perfused corpus cavernosum tissues in order to identify those responsible for the corpus cavernosum relaxation. Two fractions (A and B) with retention time of 18.1 and 36.7 min, respectively, induced relaxation of corpus cavernosum strips. Fraction A was selected for further biochemical characterisation. Repurification of this fraction revealed the presence of a polypeptide (named PNV4) which migrates in PAGE/SDS electrophoresis as a unique band consistent with a molecular weight close to 16,629. Amino acid composition of PNV4 showed the presence of 144 residues, a high content of Cys and a calculated MW of 16,910. The N-terminal amino acid sequence of PNV4 determined for its first 48 residues was A E L T S C F P V G H E C D G D A S N C N C C G D D V Y C G C G W G R W N C K C K V A D Q S Y A.

INTRODUCTION

The venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* contains several toxin polypeptides (MW range 3,500-15,000) that produce a diversity of biological actions including disturbances of the central nervous system (DINIZ *et al.*, 1990; RESENDE-Jr *et al.*, 1991; CORDEIRO *et al.*, 1992; CORDEIRO *et al.*, 1993), repetitive action potentials in the crural nerve and twitching of the skeletal muscles (ENTWISTLE *et al.*, 1982), neuromuscular blockade (FONTANA and VITAL-BRAZIL, 1985), vascular smooth muscle contractions (ANTUNES *et al.*, 1993a; BENTO *et al.*, 1993; MARANGONI S *et al.*, 1983) and increase of microvascular permeability in animal skin (ANTUNES *et al.*, 1992; MARANGONI RA *et al.*, 1993; ANTUNES *et al.*, 1993b). *Phoneutria nigriventer* venom (PNV) also causes relaxation of rabbit perfused corpus cavernosum tissues (LOPES-MARTINS *et al.*, 1994), an effect that probably contributes for the priapism observed in the *Phoneutria* envenomation in humans and experimental animals (SCHENBERG AND PEREIRA-LIMA, 1971). The aim of this study was to identify and purify a polypeptide of PNV responsible for the relaxation of the rabbit corpus cavernosum.

MATERIAL AND METHODS

Venom and reagents

Phoneutria nigriventer venom was obtained by electrical stimulation of spiders maintained by the Arthropods Section, Institute Butantan, São Paulo (SP, Brazil) and desiccated using a vacuum dessicator containing NaOH tablets at room temperature. All chemicals and solvents were of HPLC grade purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, USA) or Aldrich Chemicals Co (Milwaukee, USA). Reverse phase chromatography was performed using a Waters (991-PDA) system.

Rabbit corpus cavernosum preparation

Male New Zealand white rabbits (1.5-2.5 kg, provided by CEMIB-UNICAMP) were anaesthetised with pentobarbital sodium (Sagatal[®], 30-40 mg/kg, i.v.) and exsanguinated via the carotid artery. Following penectomy, the rabbit corpus cavernosum (RbCC) was dissected in the Krebs solution and cleared of the tunica albuginea and surrounding tissues. Strips of RbCC were superfused in a cascade system with warmed (37°C) and oxygenated (95%O₂ + 5%CO₂) Krebs solution at a flow rate of 5 ml/min (LOPES-MARTINS *et al.*, 1994). The tissue responses (tension of 1.5 g) were detected with auxotonic levers attached to Harvard heart/smooth muscle transducers and displayed on a Watanabe multichannel pen recorder (model WTR 381). After a 60-90 min period of equilibration, RbCC strips were precontracted with noradrenaline (3 µM) in order to increase the basal tone. *Phoneutria nigriventer* venom and its fractions were administered as single bolus injections (10-50 µl).

Fractionation of Phoneutria nigriventer venom (PNV)

Venom was dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid and subsequently dialyzed against 2 L of the same solvent at 0°C during 24 hr. Dialyzing solution was changed twice. After centrifugation, a sample of 700 µl was applied on top of a C18 µBondapak (Waters System, 7.8 X 300 mm) reverse phase HPLC column. A linear gradient of 0-100% of solvent B (60% acetonitrile) in 0.1% trifluoroacetic acid at a flow rate of 1 ml/min was used. Proteins were read at 220 nm. All fractions were assayed in the rabbit corpus cavernosum. The active fraction was repurified on a reverse phase HPLC column in the same conditions. The purified polypeptide was named PNV4.

Electrophoresis of PNV4

PAGE/SDS polyacrylamide gel electrophoresis was carried on at 90 V using a 15% resolving and 5% stacking gels. Buffers used were respectively 0.3 M Tris.HCL (pH 8.8) and 0.1 M Tris. HCl (pH 6.8). Running buffer was 0.025 M Tris-0.1M glycine with 0.01% SDFS pH 8.3 (LAEMMLI, 1970). Samples containing 3-8 µg protein were dissolved in 4% SDS, 12% glycerol (w/v), 50 mM Tris 0.1M DTT, 0.01% Bromophenol Blue adjusted to pH 6.8 with HCl. Protein bands were fixed in a solution containing 50% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid for 60 min and then silver stained (MERRIL *et al.*, 1984).

N-Terminal Amino Acid Sequence of PNV4

500 picomoles of the isolated polypeptide was used to determine its N-terminal sequence by automated Edman degradation in an Applied Biosystems model 477A Sequencer. Phenylthiohydantoin amino acids were identified in a model 120-A PTH-amino acid analyzer (Applied Biosystems), according to the

retention times of a 20 PTH-amino acid standard. The N-terminal procedure followed a pattern reported in previous papers (Bento et al., 1995).

Amino Acid Composition of PNV4

Amino acid analysis was performed on a Pico-Tag amino acid analyzer (Water System) as previously described (Heinrikson & Meredith, 1984). The purified sample (10 μg) was hydrolyzed with 6 N hydrochloric acid (Pierce-Sequenal Grade) containing 1% phenol (v/v) at 106°C for 24 hr. Hydrolyzates reacted with 20 μl of fresh derivatization solution (v/v; 7:1:1:1; ethanol: triethylamine: water: phenylisothiocyanate) for 1 hr at room temperature. The phenylthiocarbamyl (PTC) amino acids were identified by HPLC comparing their retention times with those of a standard mixture.

RESULTS

HPLC of whole PNV after dialysis with 0.1% trifluoroacetic acid resulted in several O.D. peaks (Figure 1). The fractions A and B indicated by a vertical arrow with a retention time of 18.1 min and 36.7 min induced relaxation of the rabbit corpus cavernosum strips. Fraction A was selected for further biochemical characterisation. This fraction was recycled in a reverse phase HPLC column in the same conditions of the previous run and the purified polypeptide was named PNV4 (inset of Figure 1). PAGE/SDS electrophoresis of PNV4 in native and reduced conditions showed only one band that migrates between lysosime (14,300) and β -lactoglobulin (18,400), used as molecular weight markers (Figure 2). This position corresponds to a molecular weight of 16,600 determined using the procedure previously described (HENDRICK and SMITH, 1968).

N-terminal aminoacid sequence of PNV4 determined for its first 48 residues was A E L T S C F P V G H E C D G D A S N C N C C G D D V Y C G C G W G R W N C K C K V A D Q S Y A. Results from aminoacid analysis show a calculated molecular weight of 16,629, the presence of 144 residues and a high content of Cys (Table 1). As no correction was done for its cystine losses during hydrolysis we cannot assume that all of them are arranged as disulfide pairs.

DISCUSSION

In this study we have purified a polypeptide from PNV that relaxes rabbit corpus cavernosum *in vitro*. Results obtained from N-terminal aminoacid sequence are compatible with the interpretation that PNV4 is an unblocked single chain polypeptide without impurities. PAGE/SDS electrophoresis in reduction conditions corroborate these results. Comparison of PNV4 with the lethal Tx1 toxin isolated from PNV (DINIZ *et al.*, 1990) demonstrates an identical N-terminal aminoacid sequence regarding its first 48 residues. However, data from both aminoacid analysis and PAGE/SDS indicate that PNV4 is a larger peptide than Tx1 and its presumed precursor (142, 77 and 112 aa, respectively), with a MW similar to other polypeptides isolated from PNV (BENTO *et al.*, 1993; MARANGONI S *et al.*, 1993; BENTO *et al.*, 1994). Since these peptides with MW around 12,000-17,000 found in the PNV all have biological activity, it is possible that the so-called preprotoxin (DINIZ *et al.*, 1993) may be responsible itself for the neurotoxicity caused by PNV. Whether the enzymatic cleavages proposed (DINIZ *et al.*, 1993) would enhance the neurotoxicity needs to be confirmed.

Phoneutria nigriventer venom relaxes rabbit corpus cavernosum due to activation of tissue kallikrein system (LOPES-MARTINS *et al.*, 1994). Tissue kallikreins (MW 25,000-43,000) are single chain, acidic glycoproteins physicochemically and immunologically distinct from plasma kallikreins and readily release kinin from both high and low molecular weight kininogen (BHOOLA *et al.*, 1992). The finding that the polypeptide responsible for relaxation of the rabbit corpus cavernosum has a calculated molecular weight of 16,900, well below the molecular weight of tissue kallikreins, excludes in this way the possibility that activation of tissue kallikrein could be due to the presence of a

spider kallikrein in the venom (MARANGONI RA *et al.*, 1993; LOPES-MARTINS *et al.*, 1994).

Acknowledgements- E. Rego is a fellow from PICD/CAPES, Universidade do Estado da Bahia, Brazil. A.C. Bento thanks Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). G. de Nucci thanks the Wellcome Trust (London, UK).

REFERENCES

- ANTUNES, E., MARANGONI, R. A., BORGES, N. C. C., HYSLOP, S., FONTANA, M. D. and de NUCCI, G. (1993a) Effect of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **26**, 81-91.
- ANTUNES, E., MARANGONI, R. A., BRAIN, S. D. and de NUCCI, G. (1993b) Activation of tissue kallikrein-kininogen-kinin system by a component present in the *Phoneutria nigriventer* venom. *Toxicon* **31**, 1385-1391.
- ANTUNES, E., MARANGONI, R. A., BRAIN, S. D. and de NUCCI, G. (1992) *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin *in vivo*. *Toxicon* **30**, 1011-1016.
- BENTO, A. C., NOVELLO, J. C., MARANGONI, S., ANTUNES, E., GIGLIO, J. R., OLIVEIRA, B. and de NUCCI, G. (1993) Identification of a new vascular smooth muscle contracting polypeptide in the *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1092-1095.
- BENTO, A. C., REGO, E., PEDROSO-MARIANI, S. R., GIGLIO, J. R., NOVELLO, J. C., MARANGONI, S., CARACELLI, I., OLIVEIRA, B., ANTUNES, E. & DE NUCCI, G. (1995) Isolation of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom responsible for the increased vascular permeability in rabbit skin. *Toxicon* **33**, 171-178.

- BHOOLA, K. D., FIGUEROA, C. D. and WORTHY, K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.* **44**, 4-80.
- CORDEIRO, M. D. N., VALENTIM, A. D. C., DINIZ, C. R., VON EICKSTEDT, V. R. D., GILROY, J. and RICHARDSON, M. (1992) Purification and complete amino acid sequences of four Tx2 types neurotoxins from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* (Keys.). *FEBS Lett.* **310**, 153-156.
- CORDEIRO, M. D. N., FIGUEIREDO, S. G., VALENTIM, A. D. C., DINIZ, C. R., VON EICKSTEDT, V. R. D., GILROY, J. and RICHARDSON, M. (1993) Purification and amino acid sequences of six TX3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* (Keys.). *Toxicon* **31**, 35-42.
- DINIZ, C. R., CORDEIRO, M. N., JUNIOR, L. R., KELLY, P., FISCHER, S., REIMAN, F., OLIVEIRA, E. B. and RICHARDSON, M. (1990) The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Lett* **263**: 251-253.
- DINIZ, M. R. V., PAINE, M. J. I., DINIZ, C. R., THEAKSTON, D. G. and CRAMPTON, J. M. (1993) Sequence of the cDNA coding for the lethal neurotoxin Tx1 from the Brazilian "Armed Spider" *Phoneutria nigriventer* predicts the synthesis and processing of a preprotoxin. *J. Biol. Chem.* **268**, 15340-15342.

- ENTWISTLE, I. D., JOHNSTONE, R. A. W., MEDZIHRADSZKY, D. and MAY, T. E. (1982) Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. *Toxicon* **20**, 1059-1067, 1982.
- FONTANA, M. D. and VITAL-BRAZIL, O. (1985) Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **18**, 557-565.
- HEDRICK, J. L. and SMITH, A. J. (1968) *Arch. Biochem. Biophysic* **126**, 155-164.
- HEINRIKSON, R. L. and MEREDITH, S. C. (1984) Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Pre column derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* **136**, 65.
- LAEMMLI, V. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LOPES-MARTINS, R.A.B., ANTUNES, E., OLIVA, M.L.V., SAMPAIO, C. A. M., BURTON, J. AND de NUCCI, G. (1994) Pharmacological characterisation of rabbit corpus cavernosum relaxation mediated by the tissue kallikrein-kinin system. *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 81-86.
- MARANGONI, R. A., ANTUNES, E., BRAIN, S. D. and de NUCCI, G. (1993) Activation by *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom of tissue-kallikrein-kinin system in rabbit skin *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* **109**, 539-543.

- MARANGONI, S., BORGES, N. C. C., MARANGONI, R. A., ANTUNES, E., VIEIRA, C. A., NOVELLO, J. C., DOMONT, G. B., GIGLIO, J. R., OLIVEIRA, B. and de NUCCI, G. (1993) Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. *Toxicon* **31**, 377-384.
- MERRIL, C. R., GOLDMAN, D. and VAN KEUREN, M. I. (1984) Gel protein stains: silverstain. *Meth. Enzymol.* **104**, 441-447.
- REZENDE-JR, L., CORDEIRO, M. N., OLIVEIRA, E. B. and DINIZ, C. R. (1991) Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "armed spider" *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* **29**, 1225-1233.
- SCHENBERG, S. and PEREIRA-LIMA, F. A. (1971) *Phoneutria nigriventer* venom. Pharmacology and biochemistry of its components. In *Venomous Animals and their Venoms*, Vol.3. New York, Academic Press, pp 279-297.

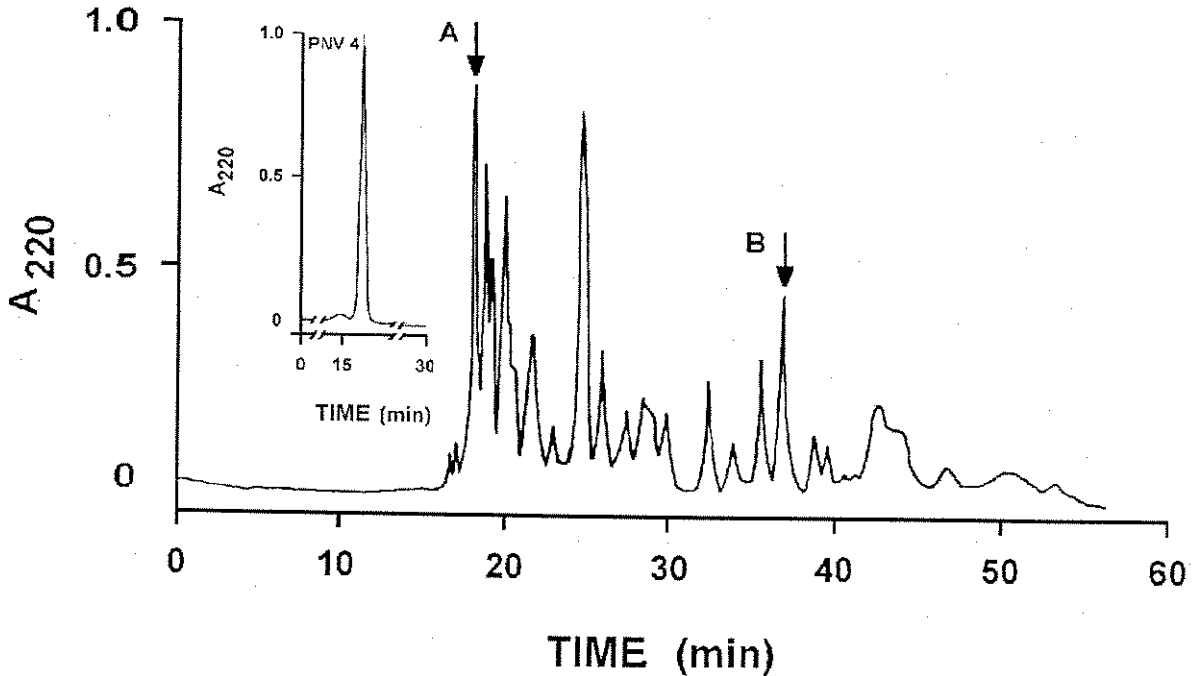


Figure 1

Purification of PNV4 from *Phoneutria nigriventer* venom. Reverse phase HPLC (7.8 mm X 300 mm C-18 μ Bondapack column) of whole venom using a 0-100% linear gradient of solvent B. Optical density full scale is 1. Solvent A: TFA 0.1%; solvent B: 60% acetonitrile in solvent A. Vertical arrow indicates the active fractions A and B with retention times of 18.10 and 36.75 min, respectively. Fraction A was repurified by HPLC and the pure polypeptide was named PNV4 (inset).

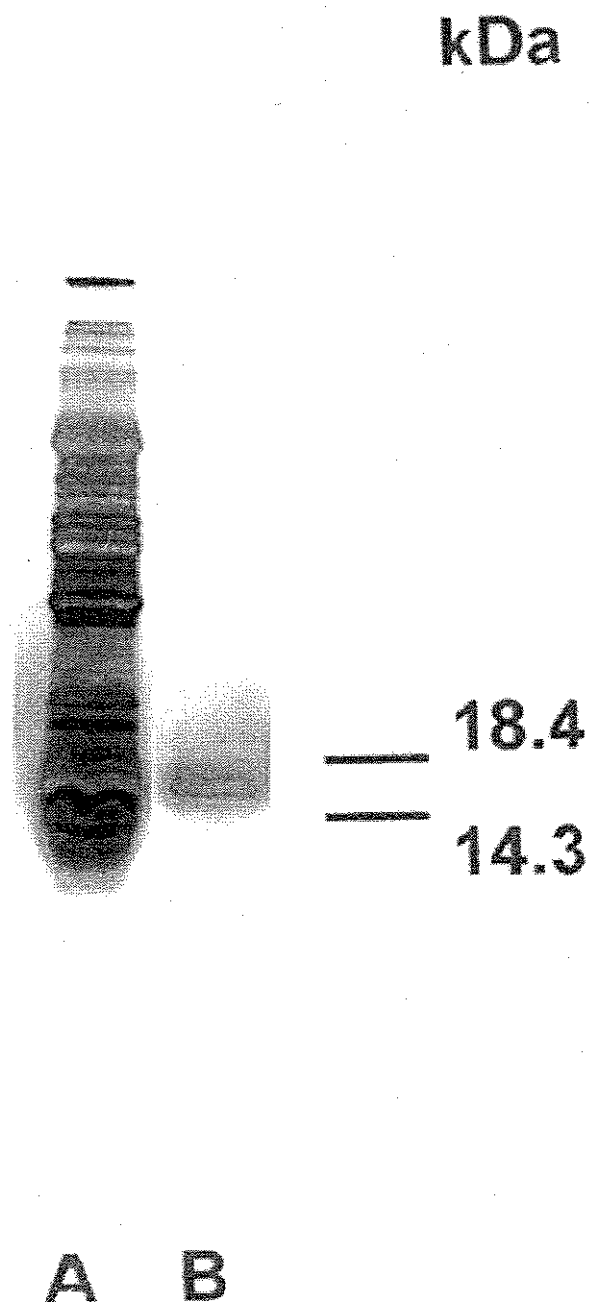


Figure 2

PAGE/SDS electrophoresis of PNIV4. Lane A: purified PNIV4 after reverse phase HPLC. Lane B: whole PNIV in the same running conditions. Position of MW markers (β -lactoglobulin, 18.4 KDa and lysosime, 14.3 KDa) is indicated by horizontal arrows. Protein bands were silver stained.