

**BC/27477**

**IB/80607**



**UNICAMP**

LOCAL E DATA: Campinas, 11 de outubro de 1995.

BANCA EXAMINADORA:

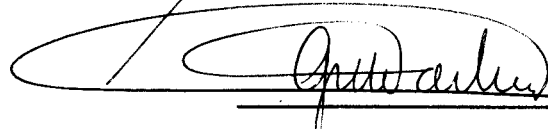
TITULARES:

Prof. Dr. BENEDITO OLIVEIRA FILHO (Orientador)



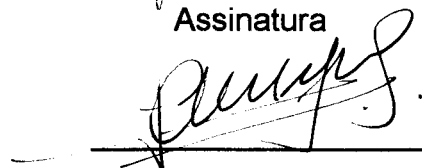
Assinatura

Prof. Dr. GILBERTO DE NUCCI



Assinatura

Prof. Dr. LUIZ ALBERTO MAGNA



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. SERGIO MARANGONI



Assinatura

APROVADO

**Evandro José Lima Rego**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
BIOQUÍMICA DE UM POLIPEPTÍDEO DO  
VENENO DA ARANHA *Phoneutria*  
*nigriventer* COM ATIVIDADE EM CORPO  
CAVERNOSO DE COELHO**

Campinas-1995



UNIPAST	I.D.
No.	101.101
PR	101.101
DA	101.101
N	C.M. 00087101.8



**Evandro José Lima Rego**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
BIOQUÍMICA DE UM POLIPEPTÍDEO DO  
VENENO DA ARANHA *Phoneutria  
nigriventer* COM ATIVIDADE EM CORPO  
CAVERNOSO DE COELHO**

Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Genética do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética.

**Orientador: Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho**

Campinas-1995

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a)

*Evandro José Lima  
Rego*

e aprovada pela Comissão Julgadora

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

**Rego, Evandro José Lima**  
R265p      **Purificação e caracterização bioquímica de um polipeptídeo do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* com atividade em corpo cavernoso de coelho / Evandro José Lima Rego. — Campinas, SP : [s.n.], 1995.**

**Orientador : Benedito Oliveira Filho.**  
**Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.**

**1. Calicreína. 2. Venenos. 3. Pênis. 4. Priapismo. 5. Aranha. I. Oliveira Filho, Benedito. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.**

# Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho pela orientação e oportunidade.

Aos Profs. Drs. Sergio Marangoni e José Camillo Novello pela co-orientação e sugestões apresentadas.

Aos Profs. Drs. Gilberto de Nucci e Edson Antunes pela discussão farmacológica e sugestões apresentadas.

À Profa. Dra. Maricilda Pallandi de Mello pelas modificações sugeridas.

Aos pós-graduandos Antônio Carlos Bento e Rodrigo A. B. Lopes Martins pela realização dos experimentos farmacológicos.

Aos colega do Departamento de Ciências da Universidade do Estado da Bahia pelo estímulo.

Aos amigos do Laboratório de Química de Proteínas - LAQUIP - do Departamento de Bioquímica pelo auxílio.

# Índice

Abreviações	v
Abreviações para aminoácidos	vi
Relação de ilustrações	vii
Resumo	1
Abstracts	3
Introdução	4
Objetivos	13
Material e Métodos	14
Resultados	24
Discussão	42
Referências Bibliográficas	61



## Abreviações

<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>ATZ</b>	Anilisotiazolinona
<b>BIS</b>	N, N'- metileno bis acrilamida
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ERDF</b>	Fator de relaxamento do endotélio
<b>GTN</b>	Gliceriltrinitrato
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta pressão
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KIZD-06</b>	Inibidor específico de caliceína tissular
<b>M</b>	Molar
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>PITC</b>	Fenilisotiocianato
<b>PNV4</b>	Polipeptídeo isolado do veneno da aranha <b>Phoneutria nigriventer</b>
<b>PPK</b>	Caliceína de pâncreas de porco
<b>PTC</b>	Feniltiocarbamil
<b>RbCC</b>	Corpo cavernoso de coelho
<b>RbPK</b>	Caliceína plasmática de coelho
<b>RbUK</b>	Caliceína urinária de coelho
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TEMED</b>	N-N'-N'-N'-Tetrametiletilenodiamina
<b>TFA</b>	Ácido Trifluoroacético
<b>TRIS</b>	Tris-hidroximetil amino metano

## Abreviações 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
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

## **Relação de ilustrações**

**Figura 1** - Perfil cromatográfico por fase reversa do veneno dialisado de *Phoneutria nigriventer*.

**Figura 2** - Repurificação da fração A, isolada do veneno dialisado de *Phoneutria nigriventer*.

**Figura 3** - Efeito do antagonista de bradicinina HOE-140, sobre os relaxamentos de corpo cavernoso isolado de coelho induzidos por PNV4.

**Figura 4** - Efeito do inibidor de protease, aprotinina, sobre os relaxamentos de corpo cavernoso isolado de coelho induzidos por PNV4.

**Figura 5** - Efeito do inibidor de caliceína tissular, KIZD-06, sobre os relaxamentos de corpo cavernoso isolado de coelho induzidos por PNV4.

**Figura 6** - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS de PNV4.

**Figura 7** - Seqüência da região amino terminal de PNV4.

**Figura 8** - Previsão de estrutura secundária da região amino terminal de PNV4.

**Figura 9** - Gráfico de hidrofobicidade da região amino terminal de PNV4.

**Figura 10** - Gráfico de focalização isoelétrica da região amino terminal de PNV4.

**Figura 11** - Estudo de homologia seqüencial entre PNV4 e outros polipeptídeos isolados de aranhas.

**Tabela 1** - Composição de aminoácidos de PNV4 em números relativos.

**Tabela 2** - Composição de aminoácidos de PNV4 em números percentuais.

**Tabela 3** - Relação das aranhas que já tiveram seu veneno estudado.

# Resumo

O veneno da aranha **Phoneutria nigriventer** produz uma série de sintomas, sendo um dos mais marcantes o priapismo, que se caracteriza por ereções prolongadas e dolorosas, podendo levar à perda da capacidade de cópula. Para a efetivação da ereção é fundamental o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso, que além do controle do sistema nervoso é mediada pelo óxido nítrico. Quando testado em corpo cavernoso de coelho o veneno de **Phoneutria nigriventer** ativa o sistema de calicreína tissular, levando à formação de cinina e óxido nítrico, com conseqüente relaxamento deste tecido. Neste trabalho purificamos do veneno de **Phoneutria nigriventer**, por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), um polipeptídeo capaz de relaxar o corpo cavernoso de coelho, que foi caracterizado bioquimicamente por eletroforese, composição de aminoácidos e seqüenciamento da região N-terminal. Este polipeptídeo, denominado PNV4, possui massa molecular de 16,9 kDa, 144 resíduos de aminoácidos e a seguinte seqüência N-terminal: **AELTSCFPVGH ECDGDASNCNCCGDDVYCGCGWGRWNCKCKVADQSYA**, que mostrou homologia para os primeiros 48 resíduos de TX1, proteína também isolada deste veneno, mas com menor massa molecular (8,1 kDa). Esta similaridade pode ser explicada por um processamento pós-traducional diferencial. A

purificação de um polipeptídeo capaz de relaxar o corpo cavernoso se constitui em uma ferramenta útil no esclarecimento do mecanismo da ereção peniana, tanto em condições normais quanto nos estados patológicos.

# Abstracts

The venom of spider **Phoneutria nigriventer** produce a diversity of biological actions including priapism, which is characterized by a painful and prolonged penile erection. For the effective penile erection is necessary the relaxation of corpus cavernosum smooth muscle that is regulated by nervous system and nitric oxide. In rabbit corpus cavernosum **Phoneutria nigriventer** venom activates the tissue kallikrein-kininogen-kinin system strips leading to NO release inducing relaxation this tissue. In this work was purified a polipeptide from **Phoneutria nigriventer** venom by liquid chromatography (HPLC) responsible for the relaxation of the rabbit corpus cavernosum. This polypeptide called PNV4 was biochemically characterized through PAGE-SDS, amino acid analysis and automated Edman degradation. It has a molecular mass of 16.9 kDa, 144 aminoacid residues and following N-terminal sequence: **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**. Comparasion of PNV4 with the TX1 also isolated this venom, but with a mass molecular of 8.1 kDa, showed a striking homology. This similarity could be explained by post-traditional process. Isolation of a polipeptide which induces relaxation of muscle corpus cavernosum is certaly a important tool in the study the mechanism of action for the penile erection.

# **Introdução**



Acidentes fatais em seres humanos têm sido registrados com as aranhas dos gêneros **Trechona**, **Atrax**, **Harpacterella**, **Loxosceles**, **Latrodectus**, **Phoneutria**, **Mastophothoscurria**, **Chiaracanthiun** e **Lithyphantes** (Santos, 1994). São conhecidas 35 mil espécies de aranhas, distribuídas em 3 mil gêneros e 105 famílias, mas não chegam a 100 as espécies potencialmente perigosas. Apenas as famílias Uloboridae e Heptathelidae não são peçonhentas (Eickstedt, 1994).

No Brasil, as espécies que causam acidentes mais sérios em humanos pertencem aos gêneros **Lycosa**, **Loxosceles**, **Latrodectus** e **Phoneutria**, sendo o último responsável pela maioria dos casos (Lucas, 1988; Barraviera e Marcondes-Machado 1994; Eickstedt, 1994).

As aranhas do gênero **Phoneutria**, popularmente conhecidas por aranhas armadeiras, são consideradas as mais perigosas do Brasil, sendo responsáveis pelo maior número de acidentes notificados ao Ministério da Saúde (Boletim, 1989). Os primeiros casos documentados datam dos anos 20, quando foi produzido o soro contra o veneno, a partir da peçonha de **Phoneutria keyserling**, na época identificada como **Ctenus fera**.

As principais espécies envolvidas com acidentes são **Phoneutria fera**, **Phoneutria keyserling**, **Phoneutria reidy** e **Phoneutria nigriventer** (Barraviera e Marcondes-Machado, 1994).

São registradas na literatura 29 espécies de **Phoneutria**, sendo 20 neotropicais, 8 da África e uma de Sumatra. No Brasil são conhecidas 5 espécies (Eickstedt, 1994):

- **Phoneutria fera** - Amazonas (Alto Rio Negro);
- **Phoneutria reidyi** - Amazonas, Pará, Amapá, Roraima, Mato Grosso;
- **Phoneutria nigriventer** - Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul;
- **Phoneutria keyserlingi** - Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul;
- **Phoneutria pertyi** - Conhecida apenas no Rio de Janeiro (Nova Friburgo).

**Phoneutria nigriventer** é a espécie mais importante do gênero, possuindo o veneno mais tóxico e estudado entre todas espécies da família Ctenidae, sendo responsável por 71% dos acidentes com aranha no Brasil, que ocorrem principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sul do país (Boletim Ministério da Saúde, 1989).

A picada de **Phoneutria nigriventer** produz uma pequena lesão na pele, podendo não ser visível. Não são observados edema local, coagulação sangüínea e hemólise, como ocorre nos acidentes com **Loxosceles** (Schenone e Litonja, 1975; Cardoso *et al.*, 1990). Provoca na maioria das vezes apenas sintomas locais, principalmente dor. Casos fatais são raros, pois o veneno é inoculado em dose muito pequena para

ter efeito letal. Em acidentes graves as principais complicações são choque neurogênico, priapismo, perturbações cardíacas, edema pulmonar e parada cardio-respiratória (Schenberg e Pereira Lima, 1971, 1978; Bucarech *et al.*, 1987). Em crianças com envenenamento severo, a ereção é freqüentemente um dos sinais da picada por **Phoneutria nigriventer** (Rosenfeld *et al.*, 1963).

As primeiras pesquisas sobre o veneno de **Phoneutria nigriventer** foram realizadas por Brazil e Vellard (1925) e tiveram seguimento tanto em trabalhos baseados na observação clínica dos envenenamentos (Fleury, 1964; Bucherl, 1972; Bucarechi 1990, 1992; Albuquerque *et al.*, 1991; Bucarechi *et al.*, 1993) como em estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*, seja com veneno total ou com frações parcialmente purificadas.

Em 1955, Bario caracterizou duas frações do veneno, separadas e isoladas por eletroforese em papel Whatman, ambas com atividade de contração do diafragma de rato, induzida pela liberação de acetilcolina. Diniz (1963) utilizando cromatografia em papel isolou, também do veneno total, duas frações com atividade de contração de íleo de cobaia e útero de rata. Schenberg e Pereira Lima (1963,1966), isolaram e caracterizaram através de cromatografia, diálise e eletroforese, novos componentes da peçonha de **Phoneutria nigriventer** com ação em músculos esqueléticos de ratos. Na década de setenta com a utilização

de coluna Sephadex G50 e de troca iônica foram isoladas duas frações que produziam alterações na pressão sanguínea de cães. Uma com atividade hipotensora e a outra com ação hipertensora (Schenberg e Pereira Lima, 1971; 1978).

Cruz-Höfling *et al.* (1985a,1985b,1986), Love e Cruz-Höfling (1986) verificaram em ratos, que o veneno de **Phoneutria nigriventer** promovia alterações nas fibras nervosas mielinizadas com formação de edema transitório no axoplasma do nodo de Ranvier, sendo que estes efeitos eram abolidos quando tetrodotoxina, toxina que se liga aos canais de sódio do axônio, era administrada aos animais antes do veneno. Estes resultados permitiram concluir que o veneno de **Phoneutria nigriventer** ativa os canais de sódio voltagem-dependente. Do mesmo modo, Fontana e Vital Brazil (1985) e Vital Brazil *et al.* (1988), constatarem o envolvimento da ativação dos canais de sódio em preparações nervo-frênico-diafragma de rato, causando despolarização não uniforme da membrana da fibra muscular e aumento dos potenciais de placa terminal em miniatura. Posteriormente, Vital Brazil *et al.* (1988), trabalhando com aurículas isoladas de cobaia, detectaram alterações na frequência das contrações, decorrente da liberação de acetilcolina e noradrenalina pelas terminações nervosas como conseqüência da ativação dos canais de sódio.

Entwistle *et al.* (1982) foram os primeiros a isolar um polipeptídeo puro do veneno de **Phoneutria nigriventer**. Este peptídeo, com massa molecular entre 5,5 e 5,8 kDa e tendo de 51 a 54 resíduos de aminoácidos, quando testado em preparações nervo-musculares de gafanhoto apresentou efeito estimulatório induzindo contrações tetânicas.

A primeira caracterização bioquímica completa de polipeptídeo de **Phoneutria nigriventer** foi realizada, apenas a cinco anos, por Diniz *et al.* (1990) e se tratava de uma neurotoxina. Posteriormente, uma série de polipeptídeos neurotóxicos foram purificados e caracterizados por eletroforese, composição de aminoácidos e determinação da estrutura primária (Cordeiro *et al.*, 1992, 1993; Figueiredo *et al.*, 1995).

Antunes *et al.* (1990, 1993a) mostraram que mesmo após diálise o veneno de **Phoneutria nigriventer** mantém atividade espasmogênica em tecidos vascular (veias cava, mesentérica e jugular) e arterial (artérias pulmonar, mesentérica e celíaca) de coelhos e concluíram que esta atividade se devia a ação de componentes não dialisáveis do veneno, provavelmente polipeptídeos.

Do mesmo modo, estudos conduzidos por Antunes *et al.* (1992) demonstraram que a diálise não afetava a capacidade do veneno de **Phoneutria nigriventer** de induzir o aumento da permeabilidade vascular em pele de coelho e rato, por um mecanismo dependente da

ativação do sistema de calicreína tissular (Antunes *et al.*, 1993b; Marangoni, R. *et al.* 1993).

As calicreínas são serinoproteases presentes em células, tecidos e fluídos biológicos, sendo classificadas em plasmáticas e tissulares. As calicreínas plasmáticas são sintetizadas no fígado e atuam no processo de coagulação a partir de substratos endógenos, os cininogênios, com alta massa molecular, liberando bradicinina (Müller-Esterl, 1989); enquanto as tissulares agem sobre cininogênios de menor massa e liberam lisil-bradicinina, que é convertida em bradicinina. A ação das cininas depende da interação com receptores específicos e podem ser abolidas por antagonistas específicos.

Marangoni, S. *et al.* (1993) descreveram um polipeptídeo (PNV1) isolado do veneno de **Phoneutria nigriventer** com atividade sobre musculatura lisa vascular de coelho. A caracterização bioquímica deste polipeptídeo por análise da composição de aminoácidos, comportamento eletroforético e seqüenciamento da região N-terminal, mostrou que este tinha massa molecular de 13,9 kDa.

Bento *et al.* (1993) apresentaram um novo polipeptídeo (PNV2) com atividade espasmogênica em musculatura lisa vascular isolada de coelho. A análise bioquímica de PNV2, incluindo seqüenciamento da região N-terminal, apontou para uma massa molecular calculada de 12,1 kDa.

Bento *et al.* (1995) purificaram do veneno de **Phoneutria nigriventer**, um polipeptídeo denominado PNV3, com massa molecular de 13 kDa, responsável pelo aumento da permeabilidade em pele de coelho, levando à formação de edema. Este efeito foi atribuído à produção local de cininas em decorrência da ativação do sistema de calicreína tissular.

Lopes-Martins *et al.* (1994) registraram a capacidade do veneno dialisado de **Phoneutria nigriventer** de promover o relaxamento do corpo cavernoso de coelho, pela ativação do sistema de calicreína tissular, levando à produção local de cininas e conseqüente liberação de óxido nítrico.

A descoberta de uma enzima, em vesículas seminais e próstata de cobaias, que *in vitro* liberava do plasma um peptídeo com perfil farmacológico semelhante à bradicinina, estimulou a procura de calicreínas no trato genital (Bhoola *et al.*, 1962). Entretanto, até o momento não foi identificado nenhum tipo de calicreína em corpo cavernoso, apesar de serem encontradas em diferentes pontos do trato genital masculino.

O relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso é um dos principais mecanismos fisiológicos responsáveis pela ereção. A flacidez peniana é resultado da contração da musculatura lisa do corpo

cavernoso e das artérias cavernosas e helicianais, por ação do sistema nervoso simpático e parasimpático, que inibidos permitem o influxo arterial com conseqüente aumento da pressão sangüínea intravenosa. Além da ação do sistema nervoso, a ereção peniana é mediada também por fatores não neurais. Ultimamente, a importância do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), identificado quimicamente como óxido nítrico (NO), vem sendo considerado um dos principais efetivadores da ereção peniana. Entre os muitos mediadores biológicos capazes de induzir a liberação de EDRF/NO, estão principalmente a acetilcolina, serotonina, histamina e bradicinina.

Até o momento nenhum peptídeo com atividade de relaxamento do corpo cavernoso foi isolado do veneno de **Phoneutria nigriventer**. A identificação e caracterização bioquímica de peptídeos relacionados com esta atividade, contribuirá para o estudo dos mecanismos fisiológicos responsáveis pela ereção, permitindo esclarecer estados patológicos, como o priapismo que se caracteriza por ereções prolongadas e dolorosas, que podem causar danos irreversíveis no tecido erétil com perda da capacidade de cópula.



# Objetivo

O objetivo deste trabalho é isolar do veneno da aranha **Phoneutria nigriventer**, um polipeptídeo com atividade de relaxamento de musculatura lisa cavernosa, através do desenvolvimento de uma metodologia simplificada de purificação por cromatografia líquida de alta pressão, eliminando etapas intermediárias (exclusão molecular e troca iônica), com conseqüente economia de material biológico. A caracterização bioquímica deste polipeptídeo por eletroforese em gel de poliacrilamida, composição global de aminoácidos e seqüência da região N-terminal, fornecerá informações que contribuirão para o estudo de filogenia molecular e homologia seqüencial, permitindo também, sua utilização como instrumento útil no esclarecimento dos mecanismos fisiológicos do relaxamento da musculatura lisa cavernosa.

## **Materias e Métodos**

## Procedência do veneno e das drogas

O veneno de **Phoneutria nigriventer** foi fornecido pela seção de artrópodos peçonhentos do Instituto Butantan, São Paulo-SP. O veneno após coletado por estimulação elétrica foi dessecado a vácuo em temperatura ambiente, sobre tabletes de hidróxido de sódio.

Os reagentes utilizados na diálise e purificação do veneno, na determinação da composição de aminoácidos e no seqüenciamento da região N-terminal do polipeptídeo PNV4 foram adquiridos da Applied Biosystems (Foster City, EUA).

Os compostos utilizados no preparo e coloração dos géis de poliacrilamida da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os marcadores de massa molecular foram adquiridos da Sigma (St. Louis, EUA).

Acetilcolina, noradrenalina, indometacina, caliceína de pâncreas de porco e aprotinina foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). O gliceriltrinitrato (ampolas contendo 1 mg/ml em solução isotônica) foi adquirido da Lipha Pharmaceuticals Ltd (West Drayton, Middlesex, Alemanha). O KIZD-06 (- Pro-Phe-Aph-Ser-Val-Gln-NH<sub>2</sub>), inibidor de caliceína tissular, recentemente sintetizado nos laboratórios da Rational Drug Design da Boston University Medical Center, foi cedido pelo Doutor James Burton.

## **Diálise**

O veneno de **Phoneutria nigriventer** (10 mg) foi dissolvido em 1ml de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e dialisado contra 4 litros do mesmo solvente, utilizando membrana de diálise com porosidade seletiva de 10-12 kDa (Philip Harris Scientific), por 24 horas, a 5 °C, com duas trocas da solução de TFA. Após diálise, o material foi clarificado por centrifugação a 10.000 g por 5 minutos.

## **Cromatografia líquida de alta pressão**

A cromatografia foi realizada utilizando-se sistema Waters HPLC modelo PDA-991, equipado com duas bombas Waters modelo 510, injetor automático de amostra Waters modelo U6K e coluna C18/ $\mu$ Bondapak Waters (7,8 x 300 mm) de fase reversa, equilibrada previamente com TFA 0,1% (solvente A). A purificação foi feita sob um gradiente linear (descrito abaixo) de 0 a 100% de uma solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1%, pH 2,5 (solvente B), utilizando um fluxo de 2 ml por minuto, sendo as frações monitoradas a 220 nm. As repurificações foram realizadas em coluna C18/ $\mu$ Bondapak analítica (39

x 300 mm) usando um gradiente linear descontínuo de 0 a 100% do solvente B.

## **Gradiente**

Tempo (minutos)	Fluxo (ml)	%A	%B
Inicial	2	100	0
5	2	100	0
10	2	60	40
64	2	20	80
67	2	0	100
72	2	0	100
76	2	100	0
83	2	100	0

## **Superfusão de corpo cavernoso em cascata**

Coelhos "New Zealand", machos e adultos (2-3 Kg), foram anestesiados com tiopental sódico (Sagatal<sup>®</sup>; 40 mg/Kg, e.v.) e exsangüinados via artéria carótida. O pênis foi retirado e imediatamente

colocado em solução de Krebs, sendo em seguida dissecado, removendo-se a túnica albugínea e mantido em solução de Krebs até o momento do experimento. Segmentos de 2-3 cm de corpo cavernoso foram montados em cascata (Vane, 1964) e superfundidos com solução de Krebs a 37 °C e aerada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, a um fluxo constante de 5 ml/min. Os tecidos foram ligados a alavancas auxotônicas conectadas em transdutores isotônicos, para músculo liso, e as respostas registradas em um polígrafo (Watanabe WR 3101). Após estabilização, os tecidos foram continuamente infundidos com 0,1 ml/min de indometacina (6 µM), com o objetivo de inibir a produção endógena de prostaglandinas. O tônus dos tecidos foi induzido por infusão contínua (0,1 ml/min) de noradrenalina (3 µM). A sensibilidade dos transdutores foi ajustada para produzir relaxamento de magnitudes similares, usando-se o gliceriltrinitrato como padrão. A acetilcolina foi utilizada como controle para teste da integridade endotelial do tecido cavernoso.

As frações do veneno de **Phoneutria nigriventer** e os agonistas foram injetados na forma de "bolus" (10-100 µl), enquanto os antagonistas foram infundidos (0,1 ml/min) sobre os tecidos.

A solução de Krebs (pH 7, 4) contém a seguinte composição (mM): NaCl 118, KCl 4,7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,17, CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2,5, NaHCO<sub>3</sub> 25 e glicose 5,6.

## **Eletroforese em gel de poliacrilamida**

O gel de poliacrilamida foi realizado segundo o método descrito por Shapiro *et al.* (1967) e Laemil (1970), com modificações. Os géis de concentração e de separação foram obtidos a partir de solução estoque de acrilamida a 30% e de N,N'- metileno bis-acrilamida 0,8%, preparada com água deionizada e mantida em refrigeração, a 4 °C, em frasco âmbar.

O gel de concentração a 5% foi preparado em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 , e o gel de separação 15%, em tampão Tris-HCl 0,3 M, pH 8,6, sendo acrescentado a ambos dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20%. A polimerização foi conseguida pela adição de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio a 10% (PSA).

As amostras (10-50 µg) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,08 M, pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,1% de azul de bromofenol, sendo imersas em água em ebulição por 1 minuto. Como redutor foi utilizado ditioneitol (DTT), a concentração final de 0,1 M. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1%, a 100 volts durante 2 horas.

Como marcadores de massa molecular foram utilizados: albumina bovina 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, pepsina 34,7 kDa, β-lactoglobulina

18,4 kDa e lisozima 14,3 kDa (*Electrophoresis Calibration Kit LMW Sigma*).

Os géis após retirados das placas, foram corados ou com nitrato de prata 0,2% e revelados com carbonato de sódio 6 % ou com Coomassie Blue a 0,1% em ácido acético: metanol : água (1:4:5 v/v/v) durante 2 horas e descorados em solução de ácido acético glacial: metanol : água (1:4:5 v/v/v).

## **Análise global de aminoácidos**

A análise de aminoácidos foi realizada em sistema Pico-Tag Waters. As amostras foram hidrolisadas por 24 horas a 105 °C por vapores de HCl 6M em atmosfera de N<sub>2</sub> (Superseco- SS, White Martins). O material foi lavado com 20 µl de solução de metanol: água: trietilamina (1: 1: 1, v/v/v), para remoção de possíveis sais e solventes adsorvidos nos aminoácidos, centrifugado e seco a vácuo. A amostra depois de derivatizada com 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 remoção completa de todo fenilisotiocianato (PITC), foi dissolvida em 50 µl de solução acetonitrilo 5% em fosfato de sódio 0,4 M titulado por ácido fosfórico 10% até pH 7,4. Os derivados de



feniltiocarbomil (PTC) dos aminoácidos foram aplicados no analisador e separados por HPLC em coluna C18/ $\mu$ Bondapak de fase reversa, com um gradiente linear de 20,5 minutos de 0 a 100% de acetonitrilo a 66% em TFA 0,1 %. A identificação e quantificação de cada aminoácido foram feitas por comparação com uma corrida padrão de PTC-aminoácidos

## **Seqüenciamento automático de proteínas**

O seqüenciamento automático de proteínas foi realizado utilizando a técnica de degradação de Edman (Edman e Begg, 1967), que remove e identifica os aminoácidos a partir da porção N-terminal do polipeptídeo. Um seqüenciador modelo 477 A, associado a um sistema de HPLC modelo 120A, ambos da Applied Biosystem, executou automaticamente todas as reações do método.

Sessenta picomoles da amostra dissolvida em acetonitrilo 66% em TFA 0,1%, foram aplicados sobre um filtro de papel e fibra de vidro, previamente tratado com um agente hidrofóbico (BioBrene), colocado na câmara de reação do seqüenciador, onde ocorreu o acoplamento do fenilisotiocianato (PITC) ao aminoácido N-terminal, que foi clivado na forma de anilintiazolina (ATZ), deixando um novo aminoácido terminal pronto para o próximo ciclo de acoplamento e clivagem. O ATZ foi transferido para a câmara de conversão e transformado em

feniltioidantina do correspondente aminoácido (PTH-aminoácido), sendo transferido para cromatografia em sistema de HPLC. A identificação de cada PTH-aminoácido foi feita por comparação com cromatograma de um padrão de PTH-aminoácido.

Os reagentes utilizados foram: R1- fenilisotiocianato (PITC) a 5% em n-heptano; R2 trimetil amina (TMA) a 12,5% em água; R3- ácido trifluoroacético (TFA), com de DTT a 0,002%; R4- TFA a 25% em água com DTT a 0,01%; R5- acetonitrilo, com DTT a 0,001%; S1- n-heptano; S2- etilacetato; S3- 1-clorobutano; S4-acetonitrilo a 20% em água.

## **Determinação da estrutura secundária**

Utilizando a estrutura primária parcial do polipeptídeo, foi possível prever a estrutura secundária do primeiro 1/3 da molécula, de acordo com o método descrito por Chou e Fasman (1978), desenvolvido pelo programa Prosis (Pharmacia) para análise de proteínas.

## **Perfil de hidrofobicidade**

Os resultados obtidos no seqüenciamento dos 48 primeiros resíduos do polipeptídeo foram utilizados na determinação do perfil de

hidrofobicidade da molécula, segundo metodologia de Hoop e Woods (1983), desenvolvida pelo programa Prosis.

## **Focalização Isoelétrica**

A previsão do ponto isoelétrico para os 48 resíduos da região N-terminal do polipeptídeo foi obtida a partir de metodologia de Skoog e Wichman (1986), utilizando programa Prosis.

# **Resultados**

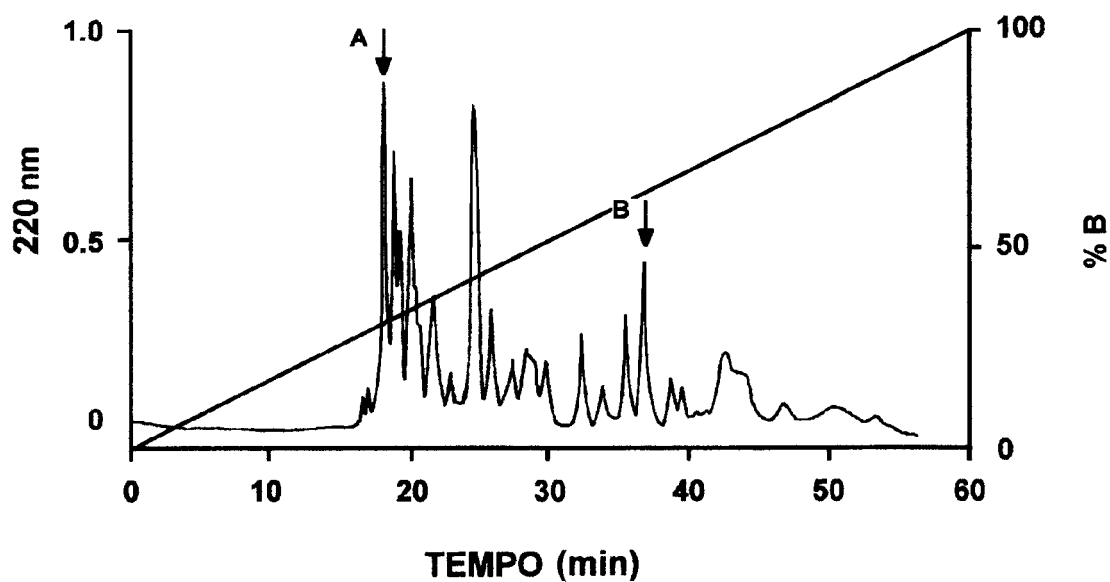
## **Diálise do veneno**

A diálise do veneno de **Phoneutria nigriventer** eliminou os componentes protéicos com massa molecular inferior a 12 kDa e os elementos não protéicos, principalmente histamina e serotonina, que poderiam influir nos resultados dos ensaios biológicos.

## **Purificação do veneno dialisado de *Phoneutria nigriventer* por cromatografia líquida de alta pressão**

Após diálise e clarificação por centrifugação, o veneno de **Phoneutria nigriventer** foi fracionado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) por fase reversa, utilizando coluna C18/ $\mu$ Bondapak, previamente equilibrada com ácido trifluoracético 0,1% (TFA - solvente A) e eluída em gradiente linear de 0-100% de acetonitrilo 66% em TFA 0,1%, pH 2,5 (solvente B) com duração de 83 minutos.

O perfil cromatográfico por HPLC é mostrado na figura 1, sendo as frações da esquerda do cromatograma mais hidrofílicas e as da direita mais hidrofóbicas.



**Figura 1** - Perfil cromatográfico do veneno dialisado de **Phoneutria nigriventer** obtido da purificação por fase reversa por HPLC. O material foi fracionado em coluna C18/ $\mu$ Bondapak (7,8 x 300 mm), eluído em gradiente linear de 0-100% do solvente B (acetonitrilo 66% em ácido trifluoroacético 0,1% - solvente A), a um fluxo de 2 ml/min. As frações A e B apresentaram atividade biológica em corpo cavernoso de coelho.

## **Determinação da atividade biológica das frações do veneno dialisado de *Phoneutria nigriventer* sobre corpo cavernoso de coelho**

As frações após liofilizadas foram ressuspendidas em solução salina e utilizadas em ensaios biológicos para determinar suas atividades sobre corpo cavernoso isolado de coelho. Os picos A e B (figura 1), eluídos no tempo de retenção de 18 e 38 minutos na concentração de 45% e 55% do solvente B, respectivamente, induziram relaxamento dose dependente quando testados em preparações de corpo cavernoso de coelho.

### **Repurificação por fase reversa da fração A**

A fração A foi escolhida para caracterização bioquímica e farmacológica, tendo sido repurificada por HPLC em coluna fase reversa (C18/ $\mu$ Bondapak analítica- 39 x 300 mm), previamente equilibrada com solvente A e eluída em gradiente linear descontínuo de 0 a 100% do solvente B.

O perfil da repurificação por HPLC é mostrada na figura 2, constando de um único pico eluído no tempo de retenção de 18 minutos na concentração de 45% do solvente B.

A fração A, a partir de agora denominada PNV4, foi utilizada em novos ensaios biológicos para verificar a manutenção da atividade biológica e determinação dos mecanismos fisiológicos envolvidos

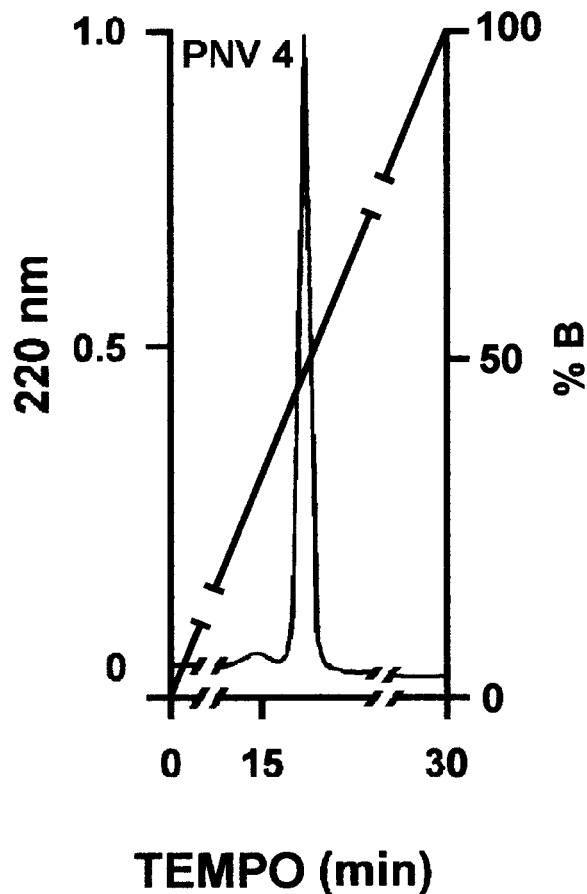
## **Caracterização farmacológica da fração A**

Os tecidos de corpo cavernoso de coelho foram pré-contraídas com noradrenalina (3  $\mu$ M) e em seguida testados com PNV4, acetilcolina, bradicinina, caliceína de pâncreas de porco e caliceína urinária de coelho.

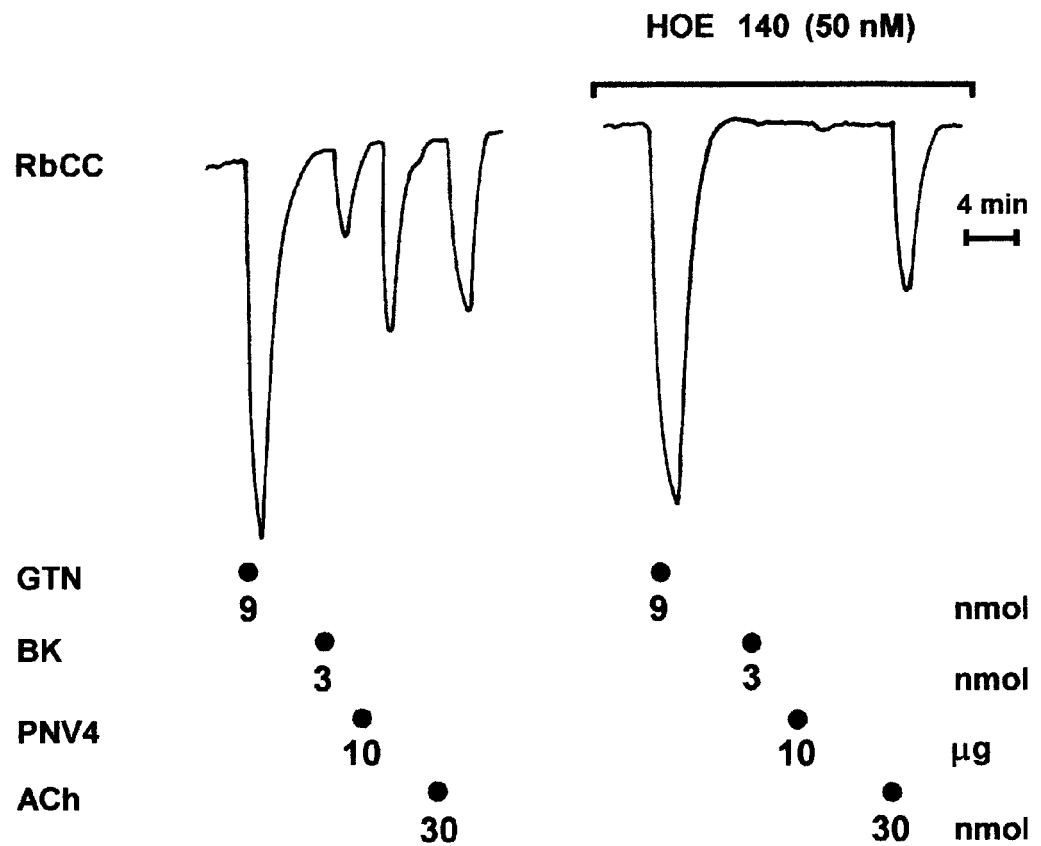
O polipeptídeo PNV4 induziu relaxamento dose dependente quando testada em preparações de corpo cavernoso de coelho. O mesmo comportamento foi observado com acetilcolina, bradicinina, caliceína de pâncreas de porco e caliceína urinária de coelho. A caliceína plasmática de coelho não produziu qualquer efeito relaxante nas tiras de corpo cavernoso de coelho.

Aprotina, inibidor da síntese de bradicinina, HOE-140, antagonista específico de receptores de bradicinina e KIZD-06, inibidor específico de caliceína tissular, aboliram o relaxamento produzido pela fração PNV4 (figura 3, 4, 5).

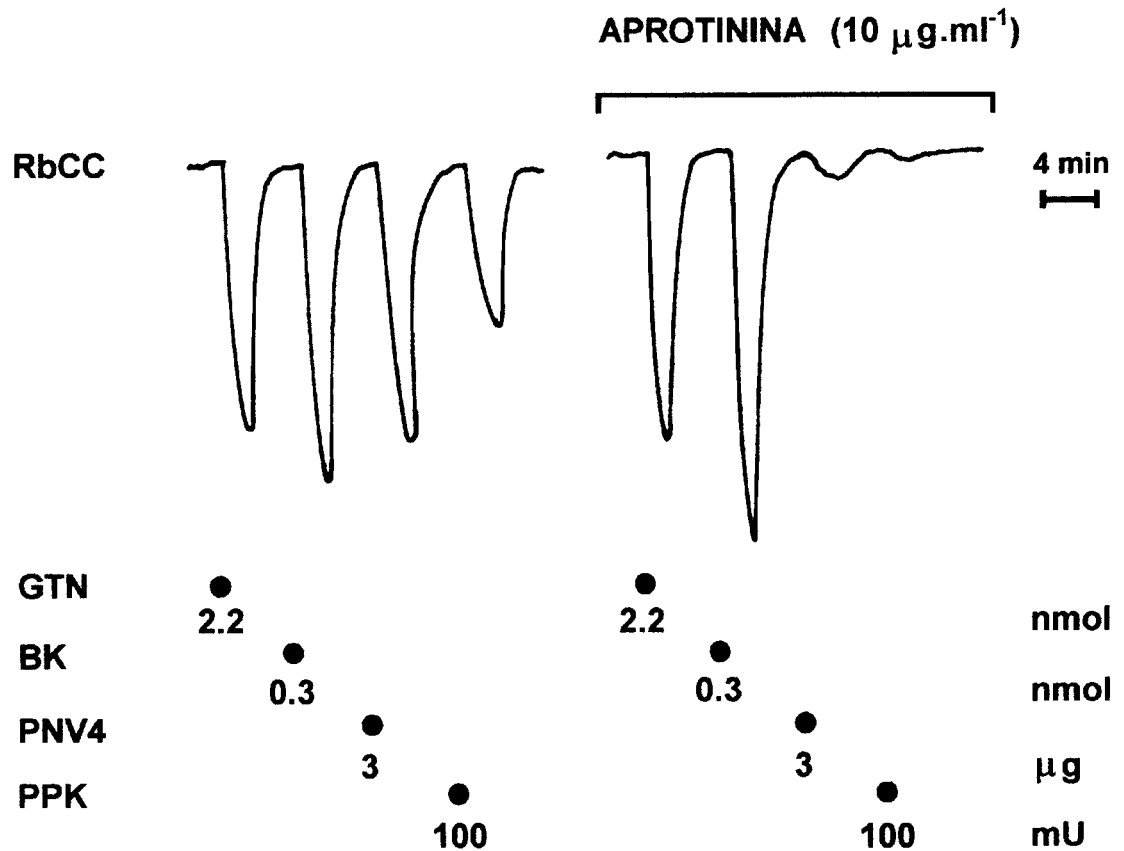




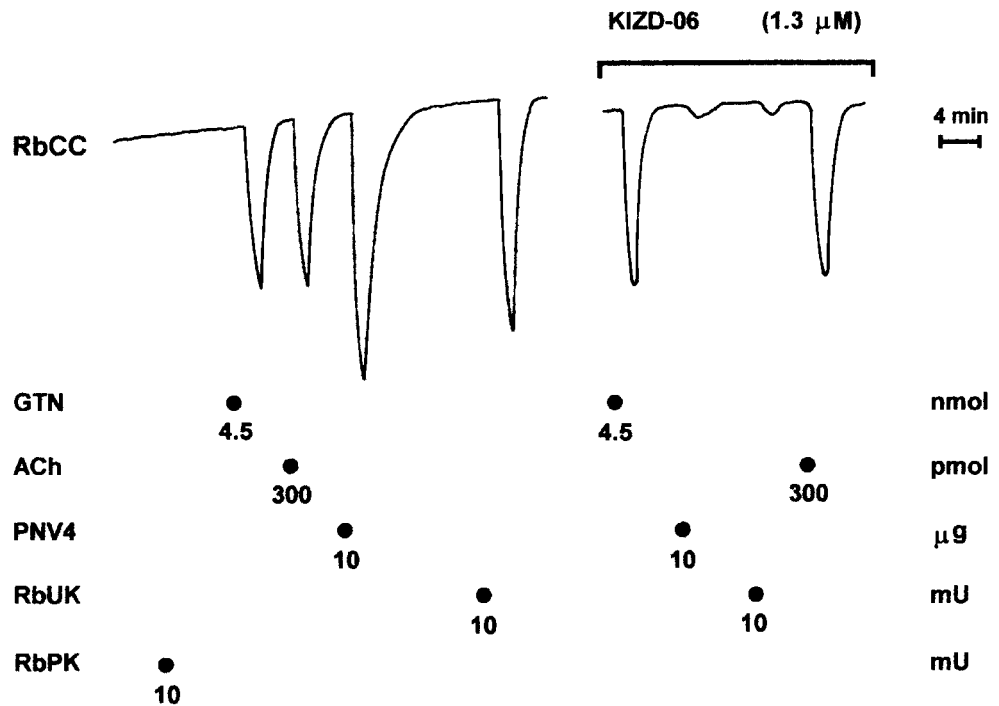
**Figura 2** - Repurificação da fração A por HPLC por fase reversa utilizando coluna C18/ $\mu$ Bondapak, eluída em gradiente linear descontínuo de 0 a 100% do solvente B (acetonitrilo 66% em solvente A - ácido trifluoroacético 0,1%). O pico único foi eluído aos 18 minutos na concentração de 45% do solvente B.



**Figura 3** - Ação do antagonista de bradicinina (Hoe-140), que aboliu o relaxamento do corpo cavernoso de coelho (RbCC) induzidos por PNV4 (10 µg) e bradicinina (BK, 3 nmol), sem afetar significativamente os produzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN, 9 nmol) e acetilcolina (ACh, 30 nmol).



**Figura 4** - Ação do inibidor de protease, aprotinina (10 µg/ml), que aboliu o relaxamento do corpo cavernoso de coelho (RbCC) induzidos por PNV4 (3 µg ) e caliceína de pâncreas de porco (PPK, 100 mU), sem afetar significativamente os produzidos por gliceriltrinitrato (GTN, 2,2 nmol) e bradicinina (BK, 0.3 nmol).



**Figura 5** - Ação do inibidor de caliceína tissular KIZD-06 (Pro-Phe-Aph-Ser-Val-Gln-Nh<sub>2</sub>), que aboliu o relaxamento das tiras de corpo cavernoso de coelho (RbCC) induzidos por PNV4 (10μg) e caliceína urinária de coelho (RbUK, 10 mU) sem afetar significativamente aqueles induzidos pelo gliceriltrinitrato (GTN, 4,5 nmol) e acetilcolina (ACh, 300 pmol). A caliceína plasmática de coelho não produziu nenhum efeito sobre a preparação.

## **Eletroforese em gel de poliacrilamida**

A eletroforese de PNV4 em gel de poliacrilamida (15%) com SDS é apresentada na figura 6. Na pista eletroforética A foi aplicado o veneno total de *Phoneutria nigriventer* e na pista B o polipeptídeo PNV4.

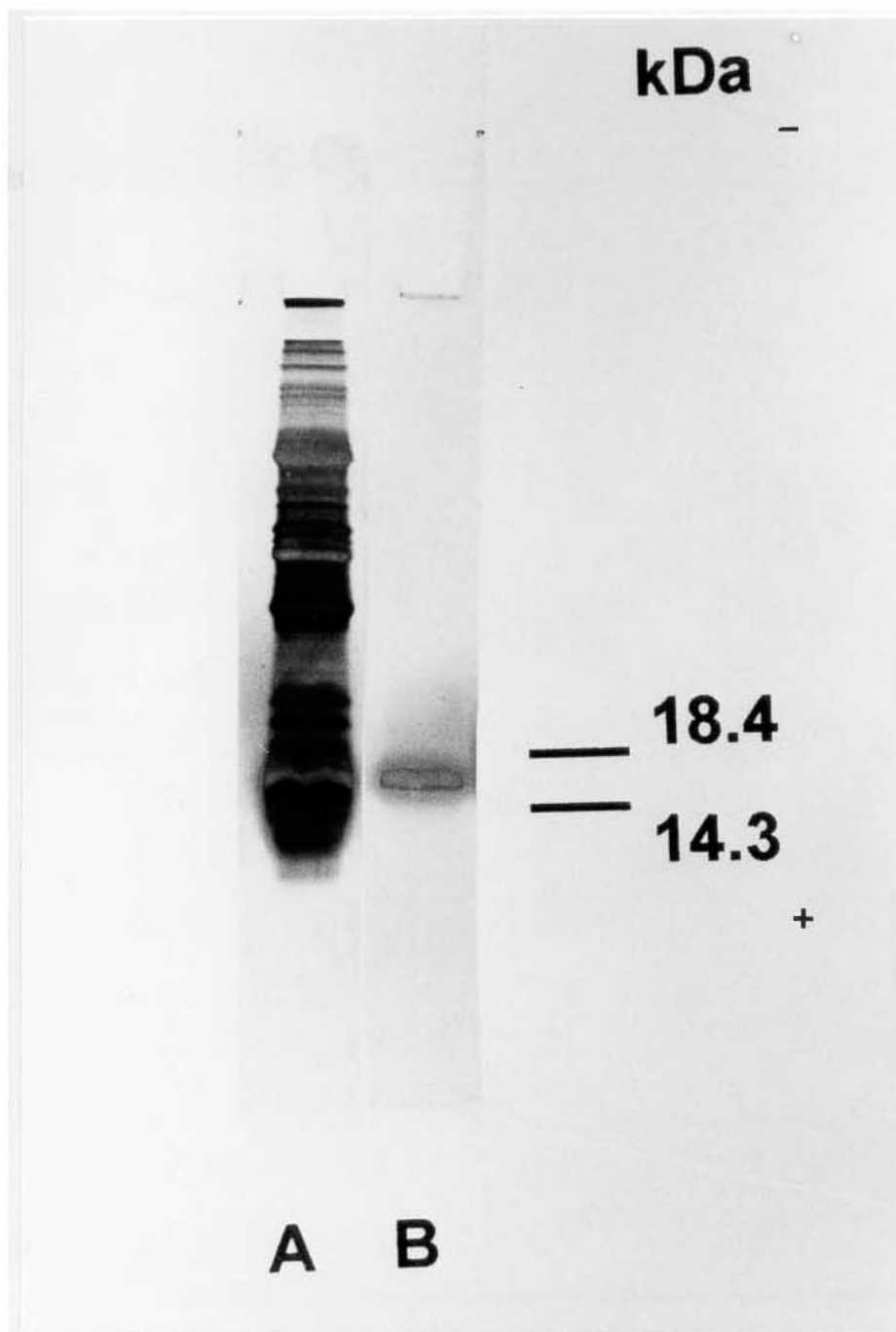
A distância percorrida pelos marcadores de massa molecular e pela amostra foi calculada em centímetros e utilizada nos cálculos de regressão linear para determinação da massa molecular de PNV4, que migrou entre  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,3 kDa). Esta posição corresponde a uma massa molecular de 16,9 kDa.

## **Análise da composição de aminoácidos**

Os resultados da composição global de aminoácidos (tabelas 1 e 2) mostram que PNV4 possui 144 resíduos de aminoácidos, tendo alta concentração de ácido aspártico + asparagina (Asx): 16,6%, além de 16 resíduos de meia-cistina, 16 de glicina, 14 de ácido glutâmico + glutamina (Glx), 10 de valina, 9 de prolina e 8 de alanina e lisina, e apenas 3 resíduos de histidina e isoleucina e 2 de tirosina e metionina. A presença de 16 meia-cistina possibilita a formação de 8 pontes dissulfeto.

A massa molecular calculada foi 16,75 kDa, valor próximo do obtido por regressão linear, 16,90 kDa, a partir dos dados da análise eletroforética.

O método utilizado não permitiu a detecção dos resíduos de triptofano (W).



**Figura 6** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) com SDS, da fração PNV4 (pista B) em condições não redutoras, mostrando uma única banda protéica que migrou entre os marcadores de massa molecular,  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,3 kDa), apresentando massa molecular calculada de 16,9 kDa. A posição dos marcadores é indicada por barras horizontais. Na pista A é apresentado o veneno total.

**Tabela 1** - Composição de aminoácidos de PNV4.

<b>Aminoácido</b>	<b>Número de Resíduos</b>
Asx <sup>a</sup>	24.6 (24)d
Glx <sup>b</sup>	14.42 (14)
Ser	7.41 (7)
Gly	15.88 (16)
His	2.73 (3)
Arg	5.51 (6)
Thr	6.44 (6)
Ala	7.90 (8)
Pro	8.79 (9)
Tyr	2.13 (2)
Val	9.72 (10)
Met	1.64 (2)
1/2 Cys	16.47 (16)
Ile	3.04 (3)
Leu	6.62 (6)
Phe	3.58 (4)
Lys	8.12 (8)
Trp <sup>c</sup>	n.d.
<b>Total</b>	<b>144.42 (144)</b>

a- O número de resíduos Asx, é a soma dos resíduos de ácido aspártico com os de asparagina;

b- Glx, é a soma dos resíduos de ácido glutâmico e glutamina.

c- nd; não determinado.

d- Determinado como valor integral mais próximo.

**Tabela 2-** Composição percentual de aminoácidos de PNV4.

<b>Aminoácido</b>	<b>Número de Resíduos</b>	<b>%</b>	<b>Massa Resíduos</b>
Asx <sup>a</sup>	24.6 (24)d	16,67	115,11
Glx <sup>b</sup>	14.42 (14)	9,72	129,13
Ser	7.41 (7)	4,86	87,09
Gly	15.88 (16)	11,11	57,07
His	2.73 (3)	2,08	137,13
Arg	5.51 (6)	4,17	156,21
Thr	6.44 (6)	4,17	111,12
Ala	7.90 (8)	5,56	71,09
Pro	8.79 (9)	6,25	97,13
Tyr	2.13 (2)	1,39	114,15
Val	9.72 (10)	6,94	163,13
Met	1.64 (2)	1,39	131,21
1/2 Cys	16.47 (16)	11,11	151,20
Ile	3.04 (3)	2,08	113,17
Leu	6.62 (6)	4,17	113,17
Phe	3.58 (4)	2,78	147,19
Lys	8.12 (8)	5,56	128,19
Trp <sup>c</sup>	n.d.	--	--
Total	144.42 (144)	100	16,75 kDa

a- O número de resíduos Asx, é a soma dos resíduos de ácido aspártico com os de asparagina;

b- Glx, é a soma dos resíduos de ácido glutâmico e glutamina.

c- nd; não determinado

d- Determinado como valor integral mais próximo.



## **Seqüenciamento da região amino terminal**

O seqüenciamento da região N-terminal de PNV4 foi realizado por degradação de Edman, utilizando um seqüenciador automático, a partir do N-terminal da molécula, em condição nativa. Foram determinados os primeiros 48 resíduos da molécula.

A figura 7, com a seqüência da região N-terminal, mostra que PNV4 possui resíduos de triptofano (W), que não foram detectados na análise de aminoácidos.

## **Determinação da estrutura secundária**

A previsão da estrutura secundária da região N-terminal de PNV4 é mostrada na figura 8.

## **Perfil de hidrofobicidade**

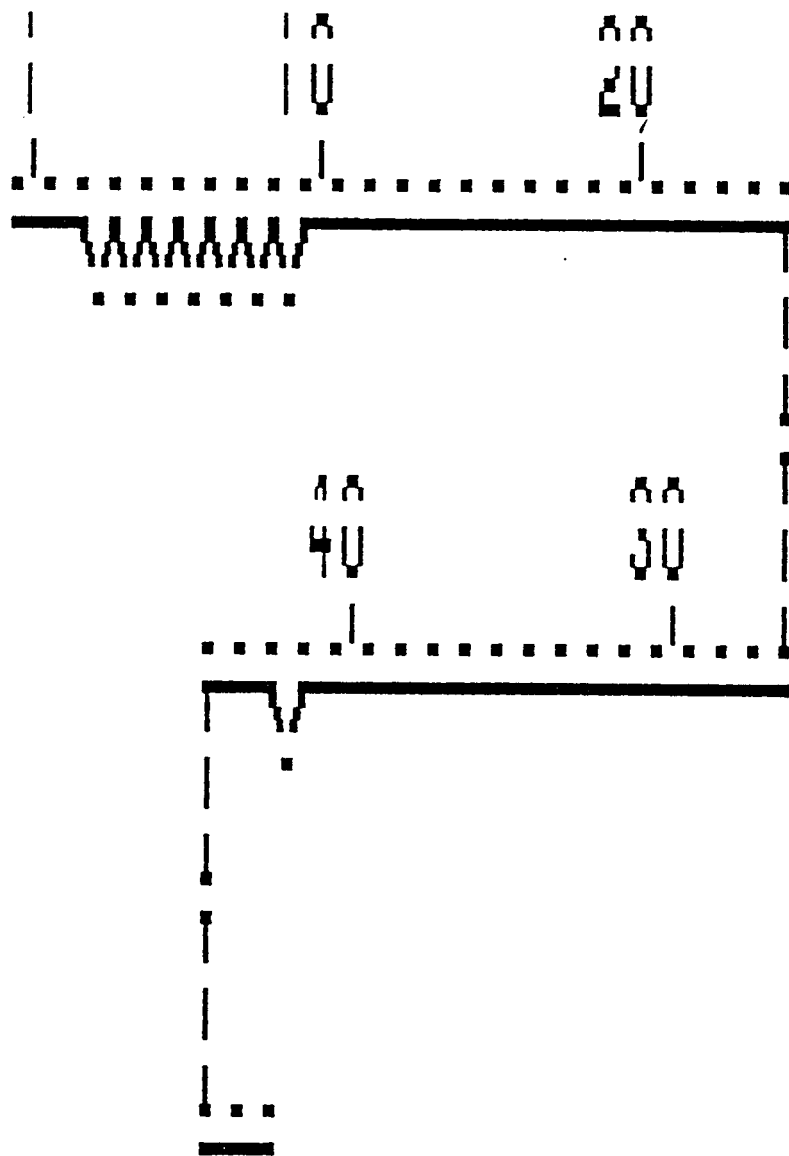
O perfil de hidrofobicidade para o primeiro 1/3 de PNV4 é apresentado na figura 9.

## **Focalização isoeletrica**

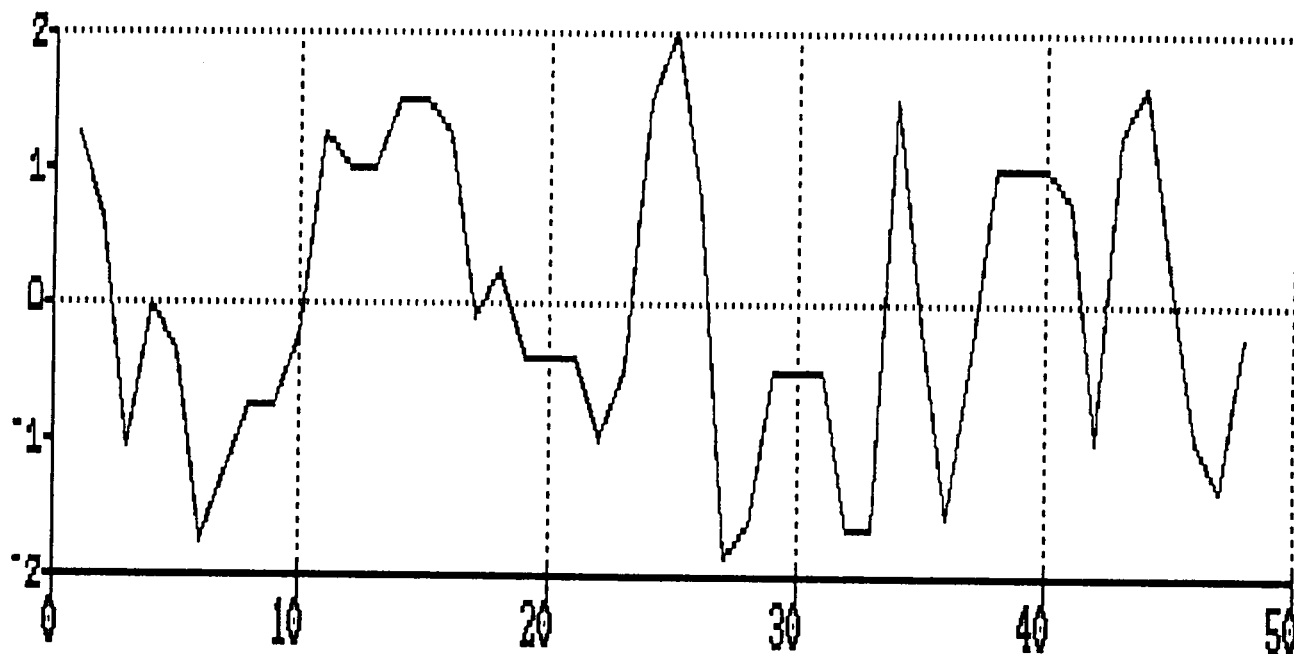
A previsão do ponto isoeletrico da região N-terminal de PNV4, cujo valor foi de 4,14 é mostrado na figura 10.

1                      10                      20                      30  
**AELTSCFPVGHECDGDASNCNCCGDDVYCGCGW**  
40  
**GRWNCKCKVADQSYA**

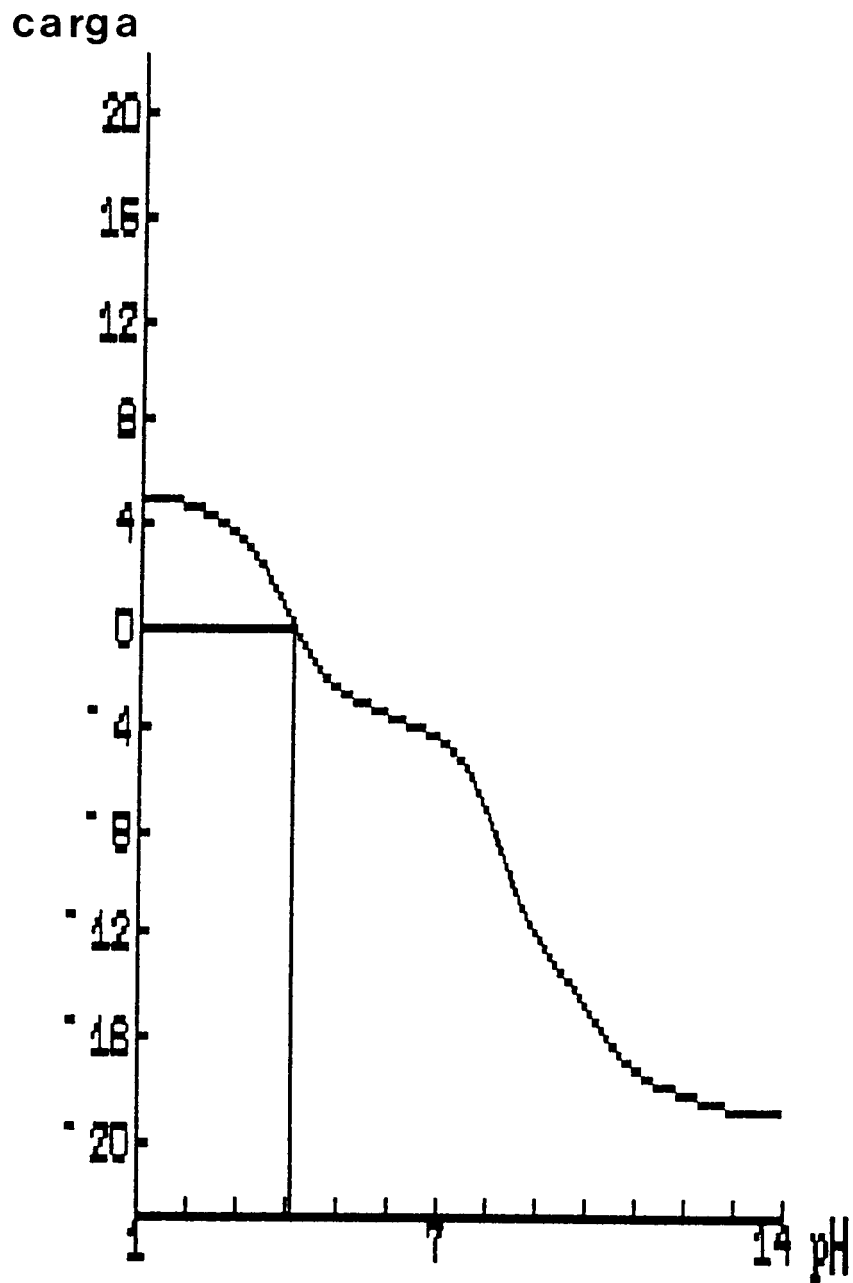
**Figura 7** - Seqüência N-terminal dos 48 primeiros resíduos da proteína PNV4, na forma nativa, determinada por degradação de Edman, (Edman e Begg, 1967), em seqüenciador automático.



**Figura 8** - Previsão da estrutura secundária da região N-terminal da proteína PNV4, determinada de acordo com Chou e Fasman (1978).



**Figura 9** - Perfil do índice de hidrofobicidade da seqüência da região amino terminal da proteína PNV4, empregando o método de Hoop e Woods (1983). As regiões hidrofílicas estão localizadas na parte superior do gráfico e as regiões hidrofóbicas na parte inferior. Na abcissa são indicadas as posições dos resíduos de aminoácidos que constituem a molécula que tem a seguinte seqüência: **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.**



**Figura 10-** Perfil da curva de focalização isoeétrica para a região amino terminal de PNV4. A previsão do ponto isoeétrico indica um valor de 4,14, calculado como descrito por Skoog e Wichman (1986).

## **Discussão**

Apesar da grande diversidade e da alta taxa de acidentes envolvendo aranhas, apenas 85 espécies distribuídas em 15 famílias diferentes (tabela 3) tiveram seu veneno estudado, sendo que menos de uma dúzia foi analisada profundamente (McCornik e Meinwald, 1993). A dificuldade de obtenção de veneno de aranhas, seja pela pouca quantidade produzida por muitas espécies, seja pelos métodos de coleta utilizados, tem sido fator limitante do estudo da peçonha destes animais. Os atuais desenvolvimentos metodológicos de isolamento, ensaios biológicos e caracterização bioquímica dos componentes dos venenos, empregando quantidades a partir de picomoles, tem ajudado a reverter o problema, permitindo novos estudos.

**Phoneutria nigriventer** é uma das aranhas que tiveram seu veneno mais analisado bioquimicamente e farmacologicamente. Os estudos com **Phoneutria nigriventer** começaram na década de 20, mas só em fins dos anos 60 a classificação sistemática da espécie foi resolvida, pois embora o gênero tenha sido estabelecido por Perty em 1833, tendo como espécie tipo **Phoneutria fera**, sua validade foi contestada sendo considerado sinônimo de **Ctenus**. Só em 1936 o gênero foi revalidado por Mello Leitão e as espécies **Ctenus fera** e **Ctenus nigriventer**, passaram a ser denominadas **Phoneutria fera** e **Phoneutria nigriventer**. Contudo, Buchel (1951) estabeleceu que as

**Tabela 3** - Espécies de aranhas que tiveram o veneno no mínimo parcialmente caracterizado (modificado de McCormick e Meinwald, 1993).

Agalenidae

*Agelena opulenta*  
*Agelenopsis aperta*  
*Hololena curta*  
*Tegenaria domestica*

Araneidae

*Agalenatea redii*  
*Araneus diadematus*  
*Araneus gemma*  
*Araneus tartaricus*  
*Argiope lobata*  
*Argiope florida*  
*Argiope trifasciata*  
*Mangora acalypha*  
*Neosocona adianta*  
*Neosocona arasbesca*  
*Neosona nautica*  
*Neosocana cruciferoides*  
*Nephila clavata*  
*Nephila edulis*  
*Nephila maculata*  
*Nuctenea folium*  
*Zygiela caspica*

Ctenizidae

*Aganippe berlandi*  
*Aptostichus schlingeri*  
*Hebestalis theveniti*  
*Phoneutria nigriventer*  
*Phoneutria fera*  
Plectreuriade

Dipluridae

*Atrax infensus*  
*Atrax robustus*  
*Atrax versutus*

Gnaphosidae

*Lampona cylindrate*

Loxoscelidae

*Loxosceles laeta*  
*Loxosceles gaucho*  
*Loxosceles reclusa-brown*  
*recluse*  
*Loxosceles reufipes*  
*Loxosceles refescens*

Lycossidae

*Lycosa singoriensis*  
*Lycosa erythrogna*  
*Lycosa tarentula*  
*Lampona cylindrate*  
*Sosippus californicus*

Pisauridae

*Dolomedes sulfureus*  
*Dolomedes kefinokensis*

*Grasmmostela pulchripes*



*Plectereurys tristes*

*Segestrie florentina*

Sparassidae

*Isopeda immanis*

Symphytognathidae

*Amaurobius insignis*

Theraphosidae

*Acanthoscurria atrox*

*Acanthoscurria cratus*

*Acanthoscurria emelia*

*Acanthoscurria sp.*

*Acanthoscurria sp.*

*Aphonopelma chalcodes*

*Bracypelma smiithii*

*Dusesiella hentzi*

*Eurypelma californicum*

*Eurypelma emilia*

*Grasmmostela mollicona*

*Grasmmostela actaeon*

*Harpactirella sp*

*Lasiadora klugii*

*Pamphosbeteus platyomma*

*Pamphosbeteus sorocabae*

*Pamphosbeteus tetracanthus*

*Pamphosbeteus cancerises*

*Pamphosbeteus roseus*

Theridiidae

*Achaearanea epidariorum*

*Epsinus ?*

*Latrodectus hasseli*

*Latrodectus mectans-black  
window*

*Latrodectus pallidus*

*Latrodectus dahli*

*Steatoda bipunctata*

*Steatoda paykulliana*

*Steatoda triangulosa*

*Theridion varians*

*Theridion impressum*

Sem família conhecida

*Chiranthium japonicum*

*Eriophora transmarina*

*Namea salantri*

*Scodra griseipes*

duas espécies eram na realidade uma só, **Phoneutria fera**, e os estudos sobre biologia, veneno, clínica e tratamento, foram unificados. Posteriormente, Buchel (1969) concluiu que **Phoneutria fera** é exclusiva da região Amazônica e **Phoneutria nigriventer** da região Sudeste (Eickstedt, 1994). Assim, estudos realizados com **Phoneutria fera** foram, na verdade, feitos com **Phoneutria nigriventer** e são deste modo citados (Barrio, 1955; Schenberg e Pereira Lima, 1978; Entwistle *et al.*, 1982).

Os primeiros trabalhos com veneno da aranha **Phoneutria nigriventer**, envolvendo purificação e atividade biológica, foram realizados por Barrio (1955), seguido por Diniz (1963), Schenberg e Pereira Lima (1963,66,71 e 78). Somente em 1982 um polipeptídeo puro foi isolado e sua atividade determinada (Entwestil *et al.*, 1982).

Diniz *et al.* (1990) purificaram e seqüenciaram um polipeptídeo, Tx1, de 77 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 8,1 kDa, com atividade neurotóxica e letal para ratos, que comparado com outras toxinas animais apresentou alta concentração de meia-cistina. Rezende *et al.* (1991) purificaram três frações com atividade neurotóxica: PhTx-1, PhTx-2 e PhTx-3, sendo que PhTx-1 mostrou ser Tx1. Posteriormente, PhTx-2 foi purificada por fase reversa e quatro polipeptídeos, Tx2-1, Tx2-5, Tx2-6 e Tx2-9, foram isolados conservando atividade neurotóxica em ratos. A caracterização por SDS-PAGE, composição de aminoácidos e seqüenciamento total, mostrou se tratar de polipeptídeos distintos com

massa molecular entre 3,7 e 5,9 kDa e ricos em meia-cistina (Cordeiro *et al.*, 1992). Repurificados por fase reversa e troca iônica, seis frações, Tx3-1, Tx3-2, Tx3-3, Tx3-4, Tx3-5 e Tx3-6, foram obtidas de PhTx3, que também apresentaram atividade neurotóxica em ratos. Caracterizados bioquimicamente, estes polipeptídeos apresentaram massa molecular entre 3,5 e 8,5 kDa e seqüência total ou N-terminal diferente de outros já registrados na literatura.

Mais recentemente, Sverzut (1994) pesquisou o efeito da fração PhTx-1 e PhTx-2 (Rezende *et al.*, 1991) sobre a fisiologia e morfologia dos nervos frênico-periféricos e músculo esquelético de camundongos, *in vitro*. O estudo morfológico da ação da fração PhTx-1 mostrou vacualização das fibras musculares e desorganização das miofibrilas, demonstrando atividade miotóxica. Já a análise eletrofisiológica revelou ausência de alterações nos potenciais de repouso e de placa terminal em miniatura, indicando que esta fração não é responsável pela ativação dos canais de sódio. Por outro lado, PhTx2 ativa os canais de sódio voltagem-dependente, promovendo aumento da pressão osmótica e influxo de líquido intersticial nas preparações nervo-musculares, produzindo desorganização dos neurofilamentos, microtúbulos, axoplasma e alterações mitocondriais.

Antunes *et al.* (1990; 1993a) demonstraram que o veneno de **Phoneutria nigriventer**, possui atividade espasmogênica em tecido

vascular de coelho. Em 1993 foi isolado por filtração em gel, cromatografia de troca iônica e recromatografia por fase reversa, um novo polipeptídeo, PNV1, com atividade espasmogênica em músculo liso vascular. A composição global de aminoácidos mostrou que PNV1 possui 125 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 13,9 kDa, com alta concentração de Axs + Glx (20%) e duas pontes dissulfeto (Marangoni, S. *et al.* 1993 ).

Bento *et al.* (1993) utilizando cromatografia por filtração em gel e fase reversa em HPLC, purificaram um peptídeo do veneno de **Phoneutria nigriventer**, com atividade espasmogênica em musculatura vascular. A análise da caracterização bioquímica e estudos de homologia seqüencial, para os vinte primeiros resíduos da seqüência N-terminal indicaram que PNV2 era um novo polipeptídeo, com 102 resíduos de aminoácidos, massa molecular calculada de 12,114 kDa, sendo rico em lisina (14%) e Glx (11%), sem histidina e com quatro pontes dissulfeto.

O aumento da permeabilidade vascular em pele de rato e coelho demonstrado por Antunes *et al.* (1992) é devido à produção local de cinina pela ativação do sistema tissular de calicreína-cininogênio-cinina (Antunes *et al.*, 1993b; Marangoni, R. *et al.*, 1993). Bento *et al.* (1995) isolaram um polipeptídeo, PNV3, responsável pelo aumento da permeabilidade vascular em pele de coelho. A composição de

aminoácidos revelou que PNV3 possui 132 resíduos, massa molecular calculada de 14,4 kDa, seis pontes dissulfeto, alta concentração de glicina (20%) e apenas uma histidina e uma metionina. Quando comparado com outras proteínas isoladas do veneno de **Phoneutria nigriventer**, PNV3, apresentou similaridade de 60% com Tx2-1 e Tx2-5 e de 70% com Tx2-6.

Lopes-Martins *et al.* (1994) verificaram que o veneno dialisado de **Phoneutria nigriventer** ativa o sistema de calicreína tissular em corpo cavernoso de coelho, levando à formação local de cininas e posterior liberação de óxido nítrico, causando o relaxamento deste tecido, um efeito que provavelmente reflete no priapismo observado no envenenamento.

Neste trabalho, desenvolvemos uma metodologia de purificação por cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa, contrária à metodologia usualmente citada na literatura sobre a purificação do veneno de **Phoneutria nigriventer**, que envolve uma etapa inicial de filtração em gel, seguida de sucessivas repurificações, com a necessidade de dessalificação. Este grande número de fases de purificações resultam num maior gasto de veneno.

O plopeptídeo puro, isolado por Entwistle *et al.* (1982) exigiu quatro etapas de purificação: filtração em gel, cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de troca catiônica, cromatografia de troca

aniônica e uma última fase de dessalificação por filtração em gel. Diniz *et al.* (1990) adotaram, primeiramente no isolamento de Tx1, filtração em gel, seguida de cromatografia de fase reversa e repurificação por fase reversa. Cordeiro *et al.* (1992) realizaram seis passos de purificação para isolar os polipeptídeos Tx2-1, Tx2-5, Tx2-6 e Tx2-9. Foram duas purificações por filtração em gel, seguidas de quatro etapas de cromatografia de troca iônica. O isolamento dos polipeptídeos Tx3-1, Tx3-2, Tx3-3, Tx3-4, Tx3-5 e Tx3-6, exigiu de Cordeiro *et al.* (1993), a partir de 120 mg de veneno bruto, duas purificações por filtração em gel, cinco cromatografias sucessivas de fase reversa, uma purificação por troca iônica e um processo de dessalificação por fase reversa. Marangoni *et al.* (1993), Bento *et al.* (1993; 1995), utilizando 900 mg de veneno, purificaram os polipeptídeos PNV1, PNV2 e PNV3, respectivamente, seguindo uma metodologia de filtração em gel, cromatografia de troca catiônica, dessalificação por filtração em gel e duas etapas de cromatografia de fase reversa. Figueiredo *et al.* (1995), partindo de 227 mg de veneno, realizaram duas purificações por filtração em gel, duas etapas de cromatografia de fase reversa, seguida de dessalificação por fase reversa, até obter o polipeptídeo Tx4 (6-1).

A estratégia de purificação aqui adotada, resultou na eliminação de fases comumente empregadas no isolamento de componentes protéicos dos venenos animais, representando uma importante

simplificação metodológica, já que com apenas uma etapa de cromatografia foi obtido um polipeptídeo puro. Deste modo houve não só uma racionalização no gasto de veneno, como uma maior obtenção de material biologicamente ativo, pois redução dos processos de separação significou a conseqüente eliminação das liofilizações necessárias, já que após cada fracionamento o material precisa ser liofilizado.

Para a obtenção do polipeptídeo aqui apresentado, 10 mg de veneno de **Phoneutria nigriventer** foi dialisado por 24 horas contra solução de ácido trifluoroacético 0,1%, utilizando membrana de diálise com porosidade seletiva de 12 kDa, visando eliminar da sua composição aminoácidos livres, peptídeos de baixo peso, além de aminas biogênicas como serotonina e histamina que poderiam influir nos resultados dos testes farmacológicos. Após diálise, o veneno da aranha armadeira **Phoneutria nigriventer** foi clarificado por centrifugação e purificado diretamente por cromatografia líquida de alta pressão em coluna de fase reversa, C18/ $\mu$ Bondapak, equilibrada previamente com TFA 0,1% (solvente A), sob um gradiente linear 0 a 100% de uma solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1%, pH 2,5 (solvente B), utilizando um fluxo de 2 ml por minuto, sendo as frações monitoradas a 220 nm.

O material obtido do fracionamento foi aplicado em testes farmacológicos, sendo que as frações A e B, eluídas em 45% e 55% do solvente B, respectivamente, apresentaram atividade de relaxamento em

corpo cavernoso de coelho. A fração A foi escolhida para caracterização bioquímica e farmacológica, por apresentar resultados positivos em outros ensaios biológicos realizados paralelamente aos descritos neste trabalho e ser obtida em maior quantidade.

A fração A foi submetida à repurificação em coluna C18/ $\mu$ Bondapak analítica, resultando em um só pico, denominado PNV4, que conservou atividade biológica de relaxamento de musculatura cavernosa. A fração PNV4 foi caracterizada por análise eletroforética, composição global de aminoácidos e seqüenciamento da região N-terminal. Estes resultados, da natureza bioquímica do polipeptídeo, associado aos dados da atividade biológica, permitiram a caracterização bioquímica e farmacológica do polipeptídeo PNV4.

A análise eletroforética de PNV4 por gel de poliacrilamida com SDS, em condições nativas e redutoras, mostrou apenas uma banda protéica, confirmando a pureza do material, já atestada quando da repurificação, indicando que PNV4 é um polipeptídeo de cadeia única, tendo migrado entre  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,3 kDa), usados como marcadores de massa molecular. Esta posição corresponde a uma massa molecular de 16,9 kDa, valor calculado por regressão linear, ficando próximo da massa molecular de outras proteínas já isoladas do veneno de **Phoneutria nigriventer** como PNV1 com 13,9 kDa (Marangoni *et al.*, 1993), PNV2 com 12,1 kDa e PNV3 com



14,5 kDa (Bento *et al.*, 1993; 1995), mas é bem maior que Tx1 (Diniz *et al.*, 1990), Tx2-5 (Cordeiro *et al.*, 1992), Tx3-2 (Cordeiro *et al.*, 1992), com massa molecular de 8,2 kDa, 5,1 kDa e 3,2 kDa, respectivamente.

Os dados da composição global de aminoácidos mostram que PNV4 possui 144 resíduos, com massa molecular calculada de 16,75 kDa, tendo como aminoácidos mais freqüentes: 16 resíduos de metionina e de glicina, 10 de valina, 9 de prolina e 8 de alanina e lisina, além de alta concentração de Asx + Glx (24,6%). Os resíduos de alanina e glicina também estão entre os mais freqüentes em outros polipeptídeos isolados de **Phoneutria nigriventer** e com massa molecular superior a 12 kDa. Assim, PNV1, PNV2 e PNV3, apresentam 9, 10 e 17 resíduos de glicina e 10, 11 e 10 resíduos de alanina, respectivamente. Observa-se também, alta concentração de Asx + Glx: PNV1, 29%, PNV2, 18% e PNV3, 26%.

Dos aminoácidos menos freqüentes, PNV4 possui 2 resíduos de tirosina e metionina e 3 de histidina e isoleucina. O baixo número de histidina e metionina é característico de outras proteínas isoladas de **Phoneutria nigriventer**. Tx2-5, Tx2-6, Tx2-9 (Cordeiro *et al.*, 1992), Tx3-4, Tx3-5 (Cordeiro *et al.*, 1993) e Tx4 (6-1) (Figueiredo *et al.*, 1995), não apresentam nenhum resíduo de histidina e metionina. Enquanto Tx1 (Diniz *et al.*, 1990), Tx2-1 (Cordeiro *et al.*, 1992), Tx3-3 e Tx3-6 (Cordeiro

*et al.*, 1993) têm um só resíduo de histidina e nenhum de metionina, ao contrário de Tx3-1 e Tx3-2 (Cordeiro *et al.*, 1992) que não possuem resíduos de histidina e apenas um de metionina.

Nos polipeptídeos, PNV1 (Marangoni, S. *et al.*, 1993), PNV2 (Bento *et al.*, 1993) e PNV3 (Bento *et al.*, 1995), também são encontrados baixos números de histidina e metionina. Em PNV3 e PNV2 estão presentes um e dois resíduos de histidina e três e um de metionina, respectivamente. Já PNV1, não possui histidina e apresenta três resíduos de metionina.

A alta concentração de cisteína, 11,1%, observada em PNV4 é característica de outros polipeptídeos de **Phoneutria nigriventer** como Tx1, Tx2-1 e Tx2-6, que apresentam, 18,2%, 18,9%, e 20% de resíduos de meia-cistina, respectivamente. Os 16 resíduos de meia-cistina, encontrados em PNV4, indicam a presença de 8 pontes dissulfeto, enquanto Tx1 (Diniz *et al.*, 1991) com 14 meia-cistina, forma 7 pontes dissulfeto e PNV3 (Bento *et al.*, 1995) com 12 resíduos de meia-cistina, tem prováveis 6 pontes dissulfeto. A riqueza de dissulfeto de PNV4 e de outros peptídeos isolados de **Phoneutria nigriventer** tem reflexos não só na estrutura, mas também no funcionamento destas proteínas. Resultados obtidos por Adams (1990), mostram perda da atividade biológica de  $\omega$ -agatoxina IA, após quebra das pontes dissulfeto, por redução com  $\beta$ -mercaptoetanol.

A seqüência da região N-terminal de PNV4, determinada para os primeiros 48 resíduos foi: **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** (figura 7). Estes dados permitiram prever a estrutura secundária parcial de PNV4 (figura 8), segundo método descrito por Chou e Fasman (1978), bem como o índice de hidrofobicidade para o primeiro terço da molécula, empregando o método de Kyte e Doolittle (1982) e a previsão do ponto isoelétrico, cujo valor foi calculado como descrito por Skoog e Wichman (1986). A figura 9 mostra que PNV4 apresenta maior número de regiões hidrofílicas. A focalização isoelétrica dos primeiros 48 resíduos de aminoácidos aponta para um caráter ácido da proteína PNV4, cujo valor do ponto isoelétrico foi de 4,14 (figura 10).

Estudos de homologia seqüencial entre PNV4 e 13 outros polipeptídeos obtidos do veneno de **Phoneutria nigriventer** (figura 11), dentre os quais PNV1 (Marangoni *et al.*, 1992) e PNV2 (Bento *et al.*, 1993) e as neurotoxinas Tx1 (Diniz *et al.*, 1990), Tx2-1 (Codeiro *et al.*, 1992) e Tx3-1 (Codeiro *et al.*, 1993), permitem concluir que PNV4, cuja massa molecular é de 16,9 kDa, apresenta uma região N-terminal homóloga a Tx1, toxina isolada por Diniz *et al.* (1990), mas com massa molecular de 8,1 kDa, valor correspondente à metade da calculada para PNV4, a partir da análise da eletroforese em gel de poliacrilamida e da composição de aminoácidos.

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

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

É sabido que a maioria dos genes dos eucariontes são descontínuos, sendo constituídos por regiões codificadoras, os exons, intercalados por regiões não codificadoras, os introns. A transcrição se processa produzindo um transcrito primário, incluindo introns 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 síntese de proteínas como PNV4 e Tx1, mas pode ter sido uma

PNV4	AELTSCFPVGHECDGDASNCNCCGDDVYCGCGWG-R...
PNV3	AVFAIQDQPC.....
PNV2	LAKRADICQP-----GKTSQRACET.....
PNV1	EAFPGQST.....
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---DCECCGCDNQCYPG-S

**Figura 11-** Homologia seqüencial da de região amino terminal de PNV4 com outros 13 polipeptídeos isolados do veneno de **Phoneutria nigriventer**. O alinhamento da estrutura primária foi realizada de acordo com os resíduos de meia-cistina. Os "gaps" foram introduzidos para maximizar o grau de homologia. PNV3 (Bento *et al.*, 1995), PNV2 (Bento *et al.*, 1993), PNV1 (Marangoni *et al.*, 1993), 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)

importante estratégia evolutiva que permitiria compreender a diversidade das toxinas animais. Se este processo está relacionado com a presença de PNV4 no veneno de **Phoneutria nigriventer** não temos elementos suficientes para afirmar. Entretanto, a ocorrência de processamento pós síntese de proteínas de veneno de aranhas é relatado para a toxina  $\omega$ -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.

O precursor de Tx1 é formado por 112 aminoácidos, distribuídos em 4 regiões distintas: a porção N-terminal (seqüência sinal); um segmento rico em ácido glutâmico; a seqüência corresponde a proteína madura e um segmento com 2 resíduos de glicina (Diniz *et al.*, 1993). As duas primeiras regiões e a última são removidas do precursor por clivagem enzimática liberando a proteína funcional com 77 aminoácidos. O processamento de  $\omega$ -aga IA é mais complexo, já que se trata de uma proteína heterodimérica. A pré-protóxina que origina  $\omega$ -aga IA é composta por 112 aminoácidos, distribuídos em 5 segmentos contínuos: a região N-terminal (seqüência sinal); um segmento rico em ácido glutâmico; a cadeia polipeptídica maior, que forma a proteína funcional; uma pequena região rica em ácido glutâmico e a cadeia menor da toxina madura. A porção N-terminal e as regiões ricas em ácido glutâmico são

excisadas enzimaticamente, liberando as 2 cadeias peptídicas, que ficam ligadas por pontes dissulfeto, resultando na toxina ativa (Santos *et al.*, 1992).

Os resultados dos testes farmacológicos indicam que o polipeptídeo apresentado neste trabalho, PNV4, promove o relaxamento da musculatura lisa cavernosa de coelhos pela ativação do sistema de calicreína tecidual que leva à formação local de cininas e conseqüente liberação de EDRF (óxido nítrico), tido como o principal mediador da ereção peniana (Myers *et al.*, 1990).

O envolvimento do sistema de calicreína-cinina tissular no relaxamento do corpo cavernoso de coelho é baseado no fato dos inibidores de calicreína tissular e EDRF abolirem o relaxamento da musculatura lisa cavernosa de coelho. O inibidor de protease, aprotinina, conhecido supressor da síntese de bradicinina, inibiu o relaxamento induzido por PNV4 e pela calicreína tissular de pâncreas de porco. O antagonista de receptores de bradicinina B2, HOE-140, aboliu os efeitos relaxantes de PNV4 e de bradicinina. Do mesmo modo, o inibidor específico para calicreína tissular, KIZD-06, bloqueou os relaxamentos produzidos por PNV4 e pela calicreína tissular de urina de coelho. Além disso, as calicreínas plasmáticas não tiveram nenhum efeito relaxante sobre as preparações de corpo cavernoso.

As calicreínas tissulares são sintetizadas na forma inativa de pró-enzima, sendo necessário a remoção de um fragmento de 24 aminoácidos (Fukushima *et al.*, 1985), para se tornarem ativas. Assim, PNV4, pode se constituir em um ativador de pré-calicreína *in vivo*, ao contrário de outros ativadores de calicreínas conhecidos, como tripsina, termolisina e arginina esterase, que só agem *in vitro* (Lopes-Martins *et al.*, 1994). Outra alternativa seria considerar PNV4 um tipo de calicreína tissular, embora estas tenham massa molecular de 24 kDa a 45 KDa (Bhoola *et al.*, 1992), superior a massa molecular de PNV4 em torno de 17 kDa. Contudo, não há registro da existência de calicreínas em venenos de aranhas.

A purificação e caracterização bioquímica de um polipeptídeo com capacidade de relaxar a musculatura lisa cavernosa, se constitui em uma ferramenta biológica útil na compreensão dos mecanismos da ereção peniana e seus estados patológicos, dos quais o priapismo é apenas um deles.



## **Referências Bibliográficas**

**Adams, M.E., Bindokas, V. P., Hasegava, L & Venema, V. J.** (1990).  $\omega$ -agatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (**Agelenopsis aperta**) venom. *J. Biol. Chem*, **265**: 861-867.

**Albuquerque, R.F, França, F.O.S., Rocha, A.S. & Cardoso, J.L.C.** (1990). Manifestação autonômicas de longa duração em paciente picado por **Phoneutria sp.** *In: Anais do XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Tema Livre 84, Natal - RN.*

**Antunes, E., Marangoni, R.A., Borges, N.C.C., Fontana, M.D. & de Nucci, G.** (1990). Pharmacological profile of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **101**: 508.

**Antunes, E., Marangoni, R.A., Brain, S.D., & 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, R.C.C. Hyslop, S. Fontana, M.D. & de Nucci, G. (1993a).** Effects of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **26**: 81-91.

**Antunes, E., Marangoni, R.A., Giglio, J.R., Brain, S.D & 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.

**Barravieira, B. & Marcondes-Machado, J.** Aspectos médicos dos acidentes por animais peçonhentos. *In: Venenos Animais: uma visão integrada.* Editora Publicações Científica, 1994, Cap. 33, pp. 313-319, São Paulo.

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

**Bento, A.C., Novello, J.C., Marangoni, S., Antunes, E., Giglio, J.R., Oliveira, B. & De Nucci, G. (1993).** Identification of a new

vascular smooth muscle contracting polypeptide in *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Biochem. Pharmacol.*, **46**: 1092-1095.

**Bento, A.C., Rego, E., Mariani-Pedroso, S.R., Mancuso, L.C., Giglio, J.R., Novello, J.C., Marangoni, S., Oliveira, B., Antunes, E. & de Nucci, G. (1995).** Isolation of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom responsible for the increase in vascular permeability. *Toxicon*, **33**: 171-177.

**Bhoola, K.D., May May Yi, R., Morley, J., and Schacetylcolinater, M. (1962).** Release of kinin by an enzyme in the accessory sex glands of the guinea-pig. *J. Physiol.*, **163**: 269-280.

**Bhoola, K.D., Figueroa, C.D., Worthy, K. (1992).** Bioregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases. *Pharmacol. Reviews*, **44**: 22-80.

**Brazil, V. & Vellard, J. (1925).** Contribuição ao estudo de veneno das aranhas. *Mem. Inst. Butantan*, **2**: 1-70.

**Bucaretychi, F., Zambrone, F.A.D., Vieira, R.J. & Bueno, L.H.I.** (1987). Acidentes por *Phoneutria* sp: Estudo retrospectivo de 41 casos. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Pediatria, São-Paulo, tema livre 37.

**Bucaretychi, F.** (1990). Análises das principais diferenças clínicas e epidemiológicas dos acidentes por escorpião das espécies **Tityus serrulatus** e **Tityus bahiense** e por aranhas do gênero **Phoneutria**, atendidos no CCI-HC-UNICAMP, no período de janeiro de 1984 a julho de 1988. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

**Bucaretychi, F.** (1992). Acidentes por **Phoneutria**. *In*; Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos. Schvartsman, S. (Ed). Edit. Savier, São Paulo, pp. 196-201.

**Bucaretychi, F., Tourinho, F.S.V., Fonseca, M.R.C.C., Douglas, J.L., Zambrone, F.A.D. & Vieira, R.J.** (1993). Envenenamento

grave por **Phoneutria sp** em paciente adulto. *Rev. Soc. Brasil. Toxicol.* (supl.).

**Bucherl, W.** (1952). Aranhas do Rio Grande do Sul. *Mem. Inst. Butantan*, 4:127-155.

**Bucherl, W.** (1969). Biology and venoms of the most important South American spiders of the genera **Phoneutria**, **Loxosceles** and **Latrodectus**. *Amer. Zool.*, 9: 157-159.

**Bucherl, W.** (1972). A "armadeira"- a aranha mais perigosa do mundo. *In: Acúleos que matam*. Bucherl, W. (Ed.). Livraria Editora Kosmos, 4ª ed., Rio de Janeiro, pp. 35-45.

**Cardoso, J.L.C., Wen, F.H., França, F.O.S., Warrell, D.A. & Theakston, R.D.G.** (1990). Detection by enzyme immunoassay of *Loxosceles gaucho* venom in necrotic skin lesions caused by spider bites in Brazil. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hygiene*, 84: 608-609.

**Cordeiro M.D.N., Figueiredo S.G., Valentim A.D.C, Diniz C.R., Von Eickstedt V.R.D., Gilroy, J. & 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.

**Cordeiro, M.D.N., Valentim, A.D.C., Diniz, C.R., Von Eickstedt, V.R.D., Gilroy, J. & 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.

**Chou, P.Y. & Fasman, G. D.(1978).** Empirical predictions of protein conformation. *Ann. Rev. Biochem.*, **47**: 251-276.

**Cruz-Höfling, M. A., Duchen, L. W., Loves, S. (1985a)** Alterations in the morphology of myelinated nerve fibres caused by **Phoneutria**, **Leiurus** or *Centruroides* venom are prevented by tetrodotoxin. *Journal of Physiology*, **365**, 29p.

**Cruz-Höfling, M.A., Love, S., Brook, G. & Duchen, L.W. (1985b).**  
Effects of *Phoneutria nigriventer* spider venom on mouse peripheral nerve. *Quart. J. Exp. Physiol.*, **70**: 623-640.

**Cruz-Höfling, M. A., Love, S., Duchen, L.W. (1986).**  
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.

**Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Junior, L.R., Kelly, P., Fischer, S., Reiman, F., Oliveira, E.B. & 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. & 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.



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

**Edman, P. & Begg, G.** (1967). A protein sequenator. *Eur.J.Biochem.*, **1**: 80-91.

**Eickstedt, V. R. von.** (1994) Aspectos biológicos dos animais peçonhentos: Aranhas de importância médica no Brasil. *In: Venenos Animais: uma visão integrada.* Editora Publicações Científica, Cap. 11, pp. 151-172, São Paulo.

**Entwistle, I. D., Johnstone, R.A.W., Medzihradszky, D. & 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.

**Figueiredo, S. G., Garcia, M. E. L-P., Valentim, A. C., Cordeiro, M. N., Diniz, C. R. & Richardson, M.** (1995) Purification and amino acid sequence of the insectical neurotoxin Tx4(6-1) from the venom

of the "armed" spider **Phoneutria nigriventer** (keys). *Toxicon*, **33**: 83-93

**Fleury, C.T.** (1964). Anestesia local em picadas por animais peçonhentos. *Rev. Bras. Anestesia*, **14**: 88-89.

**Fontana, M.D. & Vital Brazil.** (1985). Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **18**: 557-565.

**Fukushima, D., Kitamura, N., Nakanishi, S.**(1985). Nucleotide sequence of cloned cDNA from human pancreatic. *Biochem.*, **24**: 8037-8043.

**Hoop, T.P. & Woods, K.R.** (1983). A computer program for prediction protein antigenic determination. *Mol. Immunol.* **26**: 483-489.

**Kyte, J. & Doolittle, R. F.** (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **16**: 732-739.

**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., Oliva M.L.V., Sampaio C.A.M., Antunes E. & de Nucci G.** (1994). Release of nitric oxide from rabbit corpus cavernosum by *Phoneutria nigriventer* spider venom: involvement of the tissue kallikrein-kinin system. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 81-86.

**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.** (1988). Spiders in Brazil. *Toxicon*, **26**: 759-772.

**Marangoni, R.A., Antunes, E., Brain, S.D. & 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. & de Nucci, G.** (1993) Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from **Phoneutria nigriventer** (armed spider) venom. *Toxicon*, **31**: 377-384.

**McCormick, K.D. & Meinwald, J.** (1993). Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. *J. of Chemical Ecology*, **19**: 2411-2451.

**Ministério da Saúde** (1989). Secretaria Nacional de Ações Básicas da Saúde - Acidentes araneídicos. Contribuição ao estudo da morbidade. *Boletim nº 22*, Brasília - DF.

**Müller-Easterl., W.** (1989). Kininogens, Kinins and kinships. *Thromb. Haemost.*, **61**: 2-6.

**Myers, P.R., Minor Jr, R.L., Guerra Jr, R., Bates, J.N. & Harrison, D.G.** (1990). Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature*, **345**: 161.

**Rezende Jr., L., Cordeiro, M.N., Oloveira, E.B. & Diniz, C. R.** (1991). Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, **29**: 1225-1233.

**Rosenfeld, G., Nahas, L., de Cillo, D. M. & Fleury, C. T.** Envenenamentos por serpentes, aranhas e escorpiões. *In: Atualização terapêutica*, 5<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro. Ed. F. Cintra Prado, J. A. Ramos e J. Ribeiro do Vale, Livraria Luso-Espanhola e Brasileira, 1936, pp. 1148-1160.

**Santos, A.D., Imperial, J.S., Chaudhary, T., Beavis, R.C., Chait, B.T., Hunsperger, J. P., Oliveira, B.M., Adams, M.E. & Hillyard, D.R.** (1992). Heterodimeric structure of the spider toxin  $\omega$ -agatoxina IA revealed by precursor analysis and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **267**: 20701-20705.

**Santos, W. F.** Bioquímica dos venenos : Venenos aracnídeos: bioquímica e farmacologia. *In: Venenos Animais: uma visão integrada*. Editora Publicações Científica, 1994, Cap. 16, pp. 243-249, São Paulo.

**Schenberg, S. & Pereira Lima, F.A.** (1963). Estudo Farmacológico do veneno de **Phoneutria fera**. *Ciênc. e Cult.*, **14**: 237-238.

**Schenberg, S. & Pereira Lima, F.A.** (1966) Priapism, sialorrhea and other toxic effects induced in dog and mice by polypeptides of spider (**Phoneutria fera**) venom. Abstracts of 3rd Int. Pharmacol. Cong. São Paulo. pp. 189.

**Schenberg, S. & Pereira Lima, F.A.** (1971) **Phoneutria nigriventer** venom. *In: Venomous Animals and Their Venoms*, vol. 3, pp. 279-297 (Buchel, W. & Buckley, E. C.). Eds. New York: Academic Press.

**Schenberg, S. & Pereira-Lima, F.A.** (1978). Arthropod Venoms: Venoms of Ctenidae *In: Handbook of Experimental Pharmacology* (Ed. S. Bettini), **Vol. 48**, pp. 217-245. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

**Schenone, H. & Lintoja, T. (1975)** Nota sobre la biologia y distribuicion de las arañas del genero **Loxosceles**. *Bol. Chil. Parasit.*, **30**: 27-29.geografica

**Skoog, B. & Wichman, A. (1986)**. *Trends in Analytical Chemistry*, **5**: 82.

**Sverzut, A.C. M. (1994)**. Estudo eletrofisiológico e morfologico 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.

**Takada, Y., Skidgel, R.A. & Erdos, E.G. (1985)**. Purification of human urinary prokallikrein. Identification of the site of activation by the metalloproteinase thermolysin. *Biochem. J.*, **232**: 851-858.

**Vane, J.R. (1964)**. The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br. J. Pharmacol.*, **23**: 360-367.

**Vital-Brazil, O., Leite, G.B. & Fontana, M.D. (1988).** Modo de ação da peçonha da aranha armadeira **Phoneutria nigriventer** (Keyserling, 1891) nas aurículas isoladas de cobaia. *Cienc. Cul.*, **40**: 181-185.