Tarcísio Liberato de Souza Júnior

Prospecção das toxinas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do tíituto de Mestre em Ciências.

São Paulo

2013

Tarcísio Liberato de Souza Júnior

Prospecção das toxinas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Lanfranco R. P. Troncone

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza Jr, Tarcísio Liberato

Prospecção das toxinas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*/Tarcísio Liberato de Souza Júnior;

Orientador: Lanfranco Raniere Paolo Troncone. – São Paulo, 2013.

109 folhas. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação

em Toxinologia, Instituto Butantan, 2013.

Elaborada com instruções fornecidas pela Biblioteca do Instituto Butantan

PÓS - GRADUAÇÃO
TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

POS-GRADUAÇÃO EM TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNO: TARCISIO LIBERTAO DE SOUZA JÚNIOR

DATA DO EXAME: 16/10/2013

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado	Reprovado
Lanfranco R. P. Troncone (Presidente)		(X)	( )
Gisele Piccio		(X)	( )
Antonio de Miranda		(X)	( )

DECISÃO FINAL: APROVADO (X) **REPROVADO** ( )

Comentários da Banca (opcional):

A banca destaca a evolução do trabalho em relação ao apresentado na qualificação e o empenho do candidato na finalização do estudo.

Av. Vital Brasil, 1500
São Paulo, 05503-900
Tel/Fax: (11) 3627-9707
tpg@butantan.gov.br
http://posgrad.butantan.gov.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ereção peniana induzida por toxina de aranha: injeção intra-cavernosa e investigação histopatológica", protocolo nº **453/08**, sob a responsabilidade de Lanfranco R.P. Troncone, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **09/04/2008.**

"We certify that the Research entitled "Penile erection induced by a spider toxin: intracavernosal injections and histological findings", protocol nº 453/08, under the responsibility of Lanfranco R.P. Troncone, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 01/09/2008".

Vigência do Projeto: 02/2008 – 06/2008	Nº de animais/espécie/linhagem
	107 / camundongo / Swiss

São Paulo, 14 de abril de 2008.

p/ Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Aos meus pais pelo exemplo de vida e cumplicidade, sempre me encorajando frente aos obstáculos da vida. À minha querida irmã Cristiane e irmãos Felipe e Fernando, por todo amor que nos une a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar minha profunda gratidão ao meu orientador Dr. Lanfranco Raniere Paolo Troncone, que sem medir esforços, iniciou e traçou meu caminho pela Toxinologia, me inspirando com sua dedicação pela investigação científica.

Gostaria de agradecer ao programa de Pós Graduação em Toxinologia do Instituto Butantan e todos os seus membros constituintes.

Agradeço a todos os pesquisadores que colaboraram para o desenvolvimento deste estudo, em especial ao Dr. Antônio de Miranda do Laboratório de Biofísica da UNIFESP, à Dra. Solange Maria de Toledo Serrano e ao Dr. Pedro Ismael, ambos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro que tornou viável o desenvolvimento desta dissertação.

Gostaria de agradecer em especial à M.Sc. Lilian Faccioli de Sousa Ambrósio e ao Dr. André Zelanis pela total disponibilidade e colaboração com esse trabalho. Tenham certeza da minha eterna gratidão.

Agradeço a Dra. Adriana de Toledo Ramos e a minha grande companheira de laboratório, Karen Silvia Carvalho Homem. Muito obrigado pela companhia e amizade durante todo esse tempo de convivência.

Agradeço a contribuição e empenho da M.Sc. Katie Riciluca e de todos os novos amigos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, camaradas Edson Takeshi,

Eduardo Kitano, Debora Andrade, Luciana Bertholim, Dra. Milene Menezes, Msc. Ana Karina e Dra. Ana Cristina.

Aos meus amigos do programa de pós, Hugo Vigerelli, e Karina Kodama e em especial a minha grande amiga Gabriela da Silva Dias.

Aos meus pais, à minha irmã Cristiane e irmão Fernando.

Em especial ao meu irmão Felipe, Samantha e Yasminzinha por todos esses anos de convivência em São Paulo.

Obrigado a todos!

“Há um princípio que é prova contra toda informação,

que é prova contra todos os argumentos,

que não pode deixar de falhar,

para manter um homem na ignorância permanente.

Esse princípio é o desprezo antes da investigação.”

Hebert Spencer

RESUMO

SOUZA JR T.L. **Prospecção das toxinas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*.** 2013. 109 fls. (Mestrado em Toxinologia) – Programa de Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, São Paulo – SP.

Venenos de aranhas do gênero *Phoneutria* são complexos e causam efeitos locais e sistêmicos, tais como intensa dor, paralisia espástica, disfunção autonômica, convulsões, priapismo, taquicardia, disturbos visuais, fasciculação, prurido e morte. Esses efeitos são ocasionados por toxinas específicas, direcionadas contra uma grande variedade de alvos farmacológicos, fazendo delas importantes agentes no estudo de novas moléculas com potencial aplicação na medicina e agricultura. Nesse estudo, o veneno da aranha *P. nigriventer* foi extraído, desidratado e armazenado a -20°C até os procedimentos experimentais. A quantificação das proteínas no veneno bruto foi realizada utilizando o reagente de Bradfort e as frações obtidas por cromatografia foram quantificadas através de um espectrofotômetro de nano volume. O perfil eletroforético do veneno foi analisado com e sem redução das pontes dissulfeto. As bandas obtidas foram recortadas e submetidas ao procedimento de digestão tripsínica assim como em solução, e subsequente análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) para identificação das proteínas correspondentes e comparadas no banco de sequencias não redundante UNIPROT. A atividade proteolítica do veneno da aranha *P. nigriventer* foi avaliada pela técnica de zimografia sem inibidores ou com PMSF ou EDTA. Observamos proteases na faixa de 14 kDa com intensa atividade gelatinolítica mas sem as características de metaloproteinase ou serinoproteinase, que ainda não foram devidamente estudadas. Em busca por novas moléculas presentes neste veneno submetemos o veneno bruto a fracionamento por HPLC e cerca de 52 picos foram obtidos. Avaliamos a integridade do veneno identificando duas toxinas conhecidas, a Tx3-4 e a Tx2-6 por espectrometria de massas (LC/ESI-MS) e observação dos efeitos após injeção em camundongos. Das 52 frações analisadas, cerca de 20 frações demonstraram atividade tóxica. Diferentes sintomas foram observados como

prostração, diarreia, diminuição dos reflexos, alterações respiratórias, ereção peniana, letargia, hipersalivação, convulsão, agitação extrema, paralisia dos membros posteriores e morte de alguns animais. Todas as frações ativas foram submetidas à análise por espectrometria de massas. Apenas 21 dos mais de 150 peptídeos estimados foram identificados no banco de dados, mostrando que uma análise proteômica abrangente ainde sa faz necessária.

Palavras-chave: *Phoneutria,* veneno de aranha, proteômica, peptídeos, bioprospecção.

ABSTRACT

SOUZA JR T.L. – **Toxin prospection in the *Phoneutria nigriventer* spider venom.** 2013. 109 p. (Masters in Toxinology) – Graduate Program in Toxinology of the Instituto Butantan, São Paulo – SP.

Venoms of spiders pertaining to genus Phoneutria are complex mixtures capable of causing intense pain, spastic paralysis, autonomic dysfunction, convulsions, priapism, tachycardia, visual disturbances, fasciculation, itching and death. Several toxins are related to these effects and target many different receptors, representing an important source of new potential drugs for human and agricultural use. In this investigation crude venom was extracted, dried and stored at -20° C for investigation. Proteins were assayed by Bradford and nano-liter spectrophotometry. Electrophoretic profiling was performed with and without disulfide bond reduction. Bands obtained were cut off the gel and trypsin-digested as well as eluted and digested in solution for analysis by LC-MS/MS. Results were plotted against UNIPROT non-redundant database constrained to taxa Arachnida. Zimography evaluated proteolytic activity in the presence and absence of PMSF and EDTA demonstrating non- methalo- or serino-proteolytic activity in the range of 14kDa. Crude venom was fractionated by HPLC yielding 52 fractions. The positive identification of Tx2-6 and Tx3-4, both by pharmacological activity and MS suggested the integrity of the venom sample. Twenty of these fractions were toxic to mice i.p. injected. The usual signs were observed and these fractions were further submitted to HPLC purification. Only 21 of the more than 150 proteins estimated were identified in the database demonstrating that a more comprehensive proteomic approach is necessary.

Keywords: *Phoneutria,* spider venom, proteomics, peptides, bioprospecting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aranha *Phoneutria nigriventer* 20

Figura 2. Perfil proteico do veneno da aranha *P. nigriventer* em eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 47

Figura 3. Avaliação da atividade proteolítica por zimografia 55

Figura 4. Cromatograma do veneno bruto da aranha *P .nigriventer* por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC – Preparativa 56

Figura 5. Espectro de massas por LC-ESI/MS da fração 67 contendo a toxina PF3 (Tx3-4) de massa molecular de 8.360 Da 58

Figura 6. Espectro de massas por LC-ESI/MS da fração 87/88 contendo a toxina Tx2-6 de massa molecular aproximada de 5.288 59

Figura 7. Ereção peniana (priapismo) em camundongos, causada pela injeção da fração 87/88 que contém a toxina Tx2-6 63

Figura 8. Cromatograma da fração 56/57 obtida por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC – Preparativa 66

Figura 9. Cromatograma da fração 78 obtida por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC – Preparativa 67

Figura 10. Cromatograma da fração 90-95 obtida por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC – Preparativa 67

Figura 11. Espectro de massas por LC-ESI/MS da fração 90-95/11 contendo um peptídeo de massa molecular de 5.158 Da que causou ereção em camundongos. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Canais de cálcio 25

Tabela 2. Toxinas isoladas da aranha *P. nigriventer* 31

Tabela 3. Identificação de proteínas por LC- MS/MS em diferentes bandas obtidas por eletroforese em gel de SDS - poliacrilamida 48

Tabela 4. Identificação de proteínas por LC-MS/MS através de digestão tripsínica em solução 51

Tabela 5. Respostas comportamentais individuais de camundongos Balb C, injetados com diferentes frações do veneno de *P. nigriventer* 61

Tabela 6. Massas obtidas nas frações da *P. nigriventer* por LC-ESI/MS 64

Tabela 7. Massas moleculares de peptídeos do veneno da *Phoneutria nigriventer* encontradas nas frações ativas deste trabalho e caracterizadas por outros autores..... 65

Tabela 8. Cromatograma da fração 56/57 obtida por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC – Preparativa 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN: Acetonitrila

cDNA: *Complementary Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

Cys: Cisteína

Da: Dalton

Dpi: *Dots per inch* (Pontos por polegada)

DDA: *Data dependent acquisition* (Aquisição dependente de dados)

DDT: Ditiotreitol

EDTA: *Ethylenediamino tetraacetic* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

FPLC: *Fast protein liquid chromatography* (Cromatografia líquida rápida de proteínas)

GuHCl: Hidrocloreto de guanidina

HEPES: *N*-(2-hidroxietil) piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico)

HPLC: *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

IAA: Iodoacetamina

kDa: kilodalton

LC: *Liquid chromatography* (cromatografia líquida)

LC/ESI-MS: *Liquid chromatography – electrospray ionization - tandem mass spectrometry* (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas – ionização por eletrospray)

LC-MS/MS: *Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry* (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial)

mA: miliampère

mM: milimolar

MW: *Molecular weight* (Massa molecular)

m/z: Razão massa/carga

nm: nanômetro

NPU: Número de peptídeos únicos

p*I:* Ponto isoelétrico

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl Fluoride* (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil)

Q-ToF: *Quadrupole-Time of Flight* (Quadrupolo-tempo de voo)

RP-HPLC: *Reversed Phase – High performance Liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa)

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamida Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio)

TFA: *Trifluoracetic acid* (ácido trifluoracetico)

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

UV: Ultravioleta

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Tarcísio Liberato de Souza Júnior, mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, autorizo a reprodução deste trabalho no site da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo.

_____

Tarcísio Liberato de Souza Júnior

_____

Dr. Lanfranco R. P. Troncone

Orientador

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20
1.1. Farmacologia e mecanismos de ação das toxinas peptídicas da *P. nigriventer* 21
1.1.1 Farmacologia das toxinas peptídicas em canais iônicos e ação da PhTx3-4 em canais de cálcio voltagem dependente 24
1.2 Estrutura das toxinas peptídicas presentes no veneno da *P. nigriventer* 27
2. OBJETIVOS 36
2.1 Objetivo Geral 36
2.2 Objetivos específicos 36
3. MATERIAIS E MÉTODOS 37
3.1 Extração do veneno da aranha *P. nigriventer* 37
3.2 Animais 37
3.3 Análise proteômica e peptidômica 37
3.3.1 Quantificação de proteínas 37
3.3.2 Dose injetada 38
3.3.3 Eletroforese de proteínas em gel de SDS- Poliacrilamida 38
3.3.4 Zimografia 39
3.3.5 Digestão tripsínica *in gel* e identificação de proteínas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)..... 39
3.3.6 Digestão tripsínica em solução e identificação de proteínas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)..... 41

3.3.7 Critério para identificação dos peptídeos e análise em bancos de dados 43

3.4 Purificação do veneno da aranha *P. nigriventer* 44

3.4.1 Purificação do veneno bruto por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC – Preparativa 44

3.4.2 Purificação das frações ativas por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC- Preparativa 44

3.5 Caracterizações dos peptídeos 45

3.5.1 Cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas – LC/ESI-MS 45

3.6 Efeitos *in vivo* das frações do veneno de *P. nigriventer* em camundongos Balb C 46

4 RESULTADOS 47

4.1 Análise proteômica 47

4.1.1 Perfis eletroforéticos 47

4.1.2 Identificações de proteínas por LC-MS/MS através de digestão tripsínica em solução 51

4.1.3 Zimografia 55

4.2 Fracionamento inicial do veneno bruto de *P. nigriventer* 56

4.3 Espectros de massas obtidos por LC/ESI-MS 57

4.4 Análise comportamental individual de camundongos Balb C injetados com diferentes frações do veneno de *P. nigriventer* 60

4.5 Espectros de massas obtidos por LC/ESI-MS 64

4.6 Purificação das frações ativas por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC- Preparativa) 66

4.7 Análise comportamental de camundongos Balb C injetados com frações ativas do veneno de *P. nigriventer* 68

4.8 Espectro de massa obtido por LC/ESI-MS da fração 90-95/11 ativa em camundongos 70

5 DISCUSSÃO 72

6 CONCLUSÕES 80

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81

ANEXO A – Peptídeos identificados por LC-MS/MS nas diferentes bandas da eletroforese e por digestão em solução 92

ANEXO B - Espectros de massas obtidos por LC/ESI-MS 100

1. INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Phoneutria* (Aranae, Ctenidae) são conhecidas popularmente como “aranhas armadeiras” ou “aranhas das bananas” devido à agressiva posição de ataque e defesa (Fig.1) que assumem diante de suas presas ou inimigos e pela sua alta incidência em plantações de bananas. Solitárias, errantes, crepusculares e noturnas, essas aranhas são amplamente distribuídas em regiões quentes da América do Sul e algumas espécies têm sido descritas (Keyserling, 1891).

Figura 1. Aranha *Phoneutria nigriventer* (Foto: Ezequiel Menta)

De acordo com a revisão taxonômica de Simó (Simó, 2001) o gênero *Phoneutria* é composto por cinco espécies: *Phoneutria nigriventer; P. Keyserlingi*; *P. fera*; *P. bahiensis* e *P. reidyi*. A *Phoneutria* é frequentemente encontrada próxima às residências, onde abrigo e alimentos (baratas, grilos, outras aranhas e muitos outros insetos) são encontrados em abundância (Lucas, 1988).

O gênero *Phoneutria* é caracterizado pela disposição dos olhos em três filas (2:4:2) e pela presença de uma escápula densa no lado interior dos segmentos palpais. *Phoneutria* é também uma das aranhas mais perigosas do Brasil, devido à

sua alta incidência em determinadas áreas, seus hábitos de invadir edificações e da alta neurotoxicidade característica do veneno (Karalliedde, 1995).

A *Phoneutria nigriventer* é responsável por um grande número de acidentes em humanos, causando intensa dor, paralisia espástica, disfunção autonômica, convulsões, priapismo, taquicardia, distúrbios visuais, fasciculação, prurido e até mesmo a morte em acidentes mais graves (Schenberg e Lima, 1966).

A distribuição geográfica da *Phoneutria nigriventer* inclui os estados brasileiros de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além da Mata Atlântica e do Cerrado brasileiro (Martins, 2007).

Seu veneno é uma mistura complexa composta por histamina, serotonina, hialuronidase, enzimas proteolíticas e uma grande variedade de proteínas e peptídeos, incluindo neurotoxinas que atuam sobre canais iônicos (Troncone *et al.*, 1995a; Richardson *et al.*, 2006). Tais toxinas peptídicas são direcionadas contra uma grande variedade de alvos farmacológicos, fazendo delas importantes agentes no estudo das propriedades dos receptores farmacológicos em diferentes paradigmas experimentais (Lewis e Garcia, 2003).

O veneno da *Phoneutria* tem sido descrito como um baú de tesouros para a descoberta e desenvolvimento de novas moléculas biologicamente ativas com potencial aplicação na medicina e na agricultura (Troncone *et al.*, 1995a; Richardson *et al.*, 2006), o que justifica a importância da investigação desse veneno em busca de novos fármacos e/ou ferramentas farmacológicas de interesse.

1.1 Farmacologia e mecanismos de ação das toxinas peptídicas da *P. nigriventer*

A filtração em gel do veneno de *P. nigriventer* combinada com cromatografia de fase reversa, revelou a existência de quatro frações peptídicas, denominadas PhTx1, PhTx2, PhTx3 e PhTx4. As três primeiras frações neurotóxicas e letais para

camundongos e a última sem efeitos em canais de mamíferos, embora extremamente tóxica para insetos da ordem Diptera e Dictyoptera, como a isoforma PhTx4(6-1) que estimula a liberação de glutamato em junção neuromuscular de baratas e retarda a inativação dos canais de Na^+ em sistema nervoso central de insetos (Richardson *et al.*, 2006).

A neurotoxina PhTx1 (LD_{50} = 0,05 mg/Kg), após injeção intra cérebro-ventricular em ratos, produz elevação da cauda, excitação comportamental, paralisia espástica dos membros posteriores, (Rezende Junior *et al.*, 1991) e promove a contração do íleo de cobaia (Santos *et al.*, 1999).

Segundo Castro (De Souza *et al.*, 2012) a Tx1 exerce efeito inibitório em canais de Na^+ competindo pelos sítios de ligação de outras toxinas como as μ-conotoxinas (toxinas de conídeos), mas não com a tetrodotoxina, conhecida como inibidora de canal de Na^+, promovendo assim descargas repetitivas de potencial de ação (Richardson *et al.*, 2006).

A seletividade da Tx1 (toxina recombinante rPnTx1) foi investigada em diferentes isoformas de canais de sódio voltagem dependente expressas em *ovócitos de Xenopus,* apresentando a ordem de potência a seguir: $rNa_v1.2 > rNa_v1.7 \approx rNa_v1.4 \geq rNa_v1.3 > mNa_v1.6 \geq hNa_v1.8$ (De Souza *et al.*, 2012)

A Tx1 reduziu a liberação de acetilcolina, [^{3}H]-Ach (acetilcolina marcada radioativamente com trítio), estimulada pela fração PhTx2, mas não afetou a liberação basal de [^{3}H]-Ach ou induzida por KCl (Kushmerick *et al.*, 1999).

Foi relatado anteriormente um efeito inibidor em canais de cálcio, porém esse efeito foi atribuído a presença de uma pequena contaminação com PhTx3-3 (Martin-Moutot, Mansuelle*, et al.*, 2006), já descrito como um potente inibidor de canais de cálcio (Leao *et al.*, 2000).

De acordo com *Araújo* (Araujo *et al.*, 1993; Moura *et al.*, 1998) a fração PhTx2 retarda a inativação de canais de Na^+ induzindo a liberação de neurotransmissores como a acetilcolina. Quatro polipeptídeos ricos em cisteína (Tx2-1, Tx2-5, Tx2-6 e Tx2-9), pertencentes à fração PhTx2, mostraram diferentes níveis de neurotoxicidade em camundongos após injeção intra cérebro ventricular. As toxinas Tx2-1, Tx2-5 e Tx2-6 causam paralisia espástica e morte, porém a toxina

menos tóxica, Tx2-9, produz apenas ereção da cauda e coceiras nos animais (Cordeiro *et al.*, 1992). A toxina PhTx2-6, como as toxinas peptídicas da fração Tx2, é responsável pela liberação de neurotransmissores através de atividade excitatória celular (Gomez *et al.*, 2002).

Entre as toxinas da fração PhTx2, a toxina Tx2-5 se destaca por sua toxicidade e letalidade. Injeções intraperitoneais de Tx2-5 induziram em camundongos uma síndrome que inclui ereção peniana, hipersalivação e morte por hemorragia pulmonar focal intra-alveolar, intramiocárdica e subendotelial, além da congestão vascular em múltiplos órgãos (Leite *et al.*, 2012). As toxinas Tx2-5 e Tx2-6, isoladas da peçonha da *Phoneutria nigriventer*, estão diretamente ligadas à indução de priapismo, por facilitar a liberação de óxido nítrico em tecido cavernoso, sugerindo que as toxinas são ferramentas potenciais para o desenvolvimento de novas terapêuticas para o tratamento da disfunção erétil (Yonamine, Troncone e Camillo; Nunes *et al.*; Villanova *et al.*).

Segundo *Andrade* (Andrade *et al.*, 2008), a dose mínima de 0,006 µg/Kg da fração Tx2-6 conhecida como eretina, produz ereção em camundongos após 35 a 45 minutos da injeção. A histologia do cavernoso de camundongos tratados com eretina revelou uma dilatação e congestão de espaços vasculares com mais sangue do que em controles, permanecendo a ereção por 120 a 140 minutos.

De acordo com Yonamine e colaboradores (Yonamine, Camillo e Troncone, 2005) sobre o estudo da biodistribuição da toxina TX2-6, não é possível indicar apenas um órgão alvo, devido à sua distribuição em vários órgãos.

Em recente estudo de nosso grupo (Troncone *et al.*, 2011) a injeção direta de diferentes doses da toxina no núcleo paraventricular do hipotálamo falhou em induzir ereção peniana, argumentando contra o envolvimento do sistema nervoso central. Assim sendo, as áreas cerebrais que parecem ser ativadas pela toxina TX2-6, que incluem o núcleo paraventricular do hipotálamo, paratenial, o núcleo do leito da estria terminal, área postrema, supraóptico e o núcleo dorsal motor do vago do tronco cerebral, são, em verdade, estimuladas pelo efeito do severo estresse agudo produzido pela toxina.

A fração Tx3, composta pelas toxinas Tx3-1 a Tx3-6, causa diferentes sintomas neurológicos em camundongos após injeção intra cérebro-ventricular a um nível de dosagem de 5 µg/camundongo. As toxinas Tx3-3 e Tx3-4 causam paralisia flácida seguida por morte em 10 a 30 minutos; a Tx3-2 induz imediata rotação no sentido horário e paralisia flácida após 6 horas; as toxinas Tx3-1, Tx3-5 e Tx3-6 produz paralisia apenas nos membros posteriores e diminuição gradual na movimentação e agressividade durante 24 horas (Cordeiro *et al.*, 1993).

Outros autores mostraram que a toxina PhTx3-4 também conhecida como PF3 bloqueou a liberação de dopamina do cérebro e bloqueou a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular de camundongos (Araujo *et al.*, 1993; Figueiredo *et al.*; Souccar *et al.*, 1995b; Troncone *et al.*, 1995a; Gomez *et al.*; Troncone *et al.*, 2003).

Em aurículas isoladas de cobaia, o veneno bruto induz efeitos inotrópicos e cronotrópicos negativos, seguidos de aumento na freqüência 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 conseqüentes da ativação de canais de sódio nos terminais nervosos (Rego *et al.*, 1996).

1.1.1 Farmacologia das toxinas peptídicas em canais iônicos e ação da PhTx3-4 (PF3) em canais de cálcio voltagem dependente

A sincronização entre a chegada de um impulso nervoso e a liberação exocitótica se faz pela propriedade da dependência de voltagem, isto é, a despolarização da membrana celular abre os canais de cálcio e permite a entrada de cálcio, ativando o processo de exocitose. Em vista desta propriedade, estes canais de cálcio foram chamados de Canais de Cálcio Voltagem-Dependentes (CCVD). Existem vários tipos de canais de cálcio no tecido nervoso e sua classificação e caracterização recebeu um grande impulso da biologia molecular e da eletrofisiologia. Assim, baseado nas propriedades eletrofisiológicas de

condutância, curvas de corrente-voltagem e tempo de abertura, assim como por suas seletividades farmacológicas, os CCVD foram classificados nos tipos L, N, P, Q, R e T. Estes tipos de CCVD foram estudados e caracterizados quanto a sua composição molecular.

Tabela 1. Canais de cálcio

Tipo	**L**	**T**	**N**	**P**	**Q**	**R**
Condutância (pS - Bário)	-25	-8	-10-20	-9-19	16	-
Permeação	$Ba^{2+}>Ca^{2+}$	$Ba^{2+}=Ca^{2+}$	$Ba^{2+}>Ca^{2+}$	$Ba^{2+}>Ca^{2+}$	$Ba^{2+}>Ca^{2+}$	$Ba^{2+}=Ca^{2+}$
Bloqueadores	ω-AgaIIIA PF3		ω-GVIA ω-MVIIC ω-AgaIIIA PF3	ω-AgaIVA ω-MVIIC PF3	ω-MVIIC ω-AgaIIIA PF3	ω-AgaIIIA
Função	Cardíaco Mus. Liso	Cardíaco Mus. Liso	Neuronal	Neuronal	Neuronal	Neuronal

De modo geral, as toxinas que bloqueiam CCVD são chamadas de Omega-toxinas. Assim as toxinas desta classe encontradas em venenos de moluscos conídeos foram chamadas de ω–Conotoxinas. As ω-conotoxinas prototípicas são a ω-GVIA, que bloqueia seletivamente os canais do tipo N, a ω-MVIIC bloqueia os canais dos tipos N, P e Q. Várias revisões trazem extensa avaliação da diversidade estrutural e funcional das conotoxinas (Richardson *et al.*, 2006).

Curiosamente as toxinas da classe ω encontram representantes importantes nos venenos de aranha também. O Veneno das aranhas do gênero Agelenopsis foi muito estudado e resultou nas chamadas ω–Agatoxinas, que guardam grande analogia com as conotoxinas, no que se refere a estrutura, disposição das cisteinas e especificidade. As principais ω-Agatoxinas são a ω-AgaIVA, que bloqueia seletivamente CCVD do tipo P e a ω-AgaIIIA que tem ação sobre vários dos CCVD.

As ω-Agatoxinas foram objeto de boas revisões também (Pocock, Venema e Adams, 1992; Venema *et al.*, 1992; Olivera *et al.*, 1994; Cassola *et al.*, 1998).

Várias toxinas isoladas de aranhas têm sido ferramentas importantes na investigação de canais de cálcio, permitindo a identificação e caracterização de diferentes subtipos de canais (Mintz, Adams e Bean, 1992; Sutton *et al.*, 1998). A ação farmacológica de toxinas isoladas da aranha *P. nigriventer* tem demonstrado potente ação ativadora como bloqueadora de canais iônicos (Romano-Silva *et al.*, 1993; De Araujo, White e Ownby, 1996; Guatimosim *et al.*, 1997; Kushmerick *et al.*, 1999; Reis *et al.*).

Mostrou-se também que o veneno da *P. nigriventer* contém pelo menos uma toxina bloqueadora de canais de cálcio. A toxina recebeu diversos nomes, mas todos estes dizem respeito à mesma toxina, a saber PhTx3-4 (Cordeiro *et al.*, 1993), ω-Phonetoxin-IIA (Cassola *et al.*, 1998) e PF3 (Souccar *et al.*, 1995a; Troncone *et al.*, 1995a; Wolff *et al.*, 1997). Esta toxina foi estudada neste laboratório em diversas ocasiões e demonstramos que sua atividade estava relacionada ao bloqueio de CCVD em tecido cerebral “in vitro”, células PC12 em cultura e junção neuromuscular de camundongos (Souccar *et al.*, 1995b; Troncone *et al.*, 1995a; Wolff *et al.*, 1997; Cassola *et al.*, 1998). Posteriormente mostramos também sua ação em junção neuromuscular de rãs e crustáceos tanto por eletrofisiologia como por microscopia confocal e detecção de cálcio por fluorescência (Troncone *et al.*, 2003). Com estas preparações foram tipificados os CCVD para os quais esta toxina é eficaz, envolvendo os CCVD dos tipos N, P/Q e L. Descrevemos também que esta toxina era tão mais eficaz quanto menos cálcio houvesse no meio, chegando a se tornar irreversível sobre CCVD do tipo N quando a concentração de cálcio foi baixada para 0,5 mM (Troncone *et al.*, 2003).

Do ponto de vista estrutural, a PF3 foi completamente sequenciada. Trata-se de uma toxina com 76 aminoácidos e 14 cisteinas formando 7 pontes dissulfeto (Cassola *et al.*, 1998). Nenhuma das conotoxinas ou agatoxinas apresenta este número de pontes dissulfeto e poucas possuem tão baixa seletividade, fatores que aumentam o interesse sobre esta toxina. Além destes efeitos incomuns da toxina, à qual chamamos de PF3, observamos outro comportamento curioso do processo de liberação de transmissores marcados por tecido cerebral quando incubado na

ausência de cálcio: a PF3 é capaz de induzir a liberação de acetilcolina de forma cálcio-independente e dose-dependente.

1.2 Estrutura das toxinas peptídicas presentes no veneno da *P. nigriventer*

A identificação dos peptídeos pode ser realizada pela combinação de diferentes métodos bioquímicos como a filtração em gel, cromatografia de fase reversa (HPLC), espectrometria de massa, sequenciamento da estrutura primária (Diniz *et al.*, 1990; Rezende Junior *et al.*, 1991; Cordeiro *et al.*, 1992; Figueiredo *et al.*, 1995), e construção de bibliotecas de cDNA a partir da glândula de veneno do animal (Diniz *et al.*, 1993; Kalapothakis, Penaforte, Beirao*, et al.*, 1998; Kushmerick *et al.*, 1999; Penaforte *et al.*, 2000).

Os peptídeos produzidos pela glândula de veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* tem sido investigados por vários grupos de pesquisadores, resultando na descrição de peptídeos ativos, representando uma farmacopéia de elevado potencial terapêutico, conforme a apresentação parcial no final desta seção (tabela 2). (Gomez *et al.*, 2002).

A clonagem molecular das toxinas da *Phoneutria* tem mostrado a mesma estrutura padrão, que é a presença de um peptídeo de sinal hidrofóbico, um pró-peptídeo precedendo o sequenciamento da toxina, em alguns casos seguidos por um resíduo de aminoácido na extremidade carboxiterminal (C-terminal), implicando modificações pós-translacionais dos peptídeos sintetizados (Kalapothakis, Penaforte, Beirao*, et al.*, 1998).

Quando os venenos de três espécies de Phoneutria *(P. nigriventer; P. Keyserlingi; P. reidyi),* foram submetidos à eletroforese bidimensional, aproximadamente 80 pontos (bandas) foram visíveis em cada caso. Esta comparação dos venenos brutos de diferentes espécies de *Phoneutria* revelou algumas similaridades em suas composições. Por exemplo, em todos os três venenos os componentes majoritários estão no intervalo entre 3 a 12 kDa e são

predominantemente, peptídeos catiônicos (p*I*>7). Existem, entretanto diferenças visíveis na intensidade da coloração em muitos componentes (Richardson *et al.*, 2006). De acordo com o mesmo autor (Richardson *et al.*, 2006), é difícil avaliar o número total de peptídeos em cada veneno com grande precisão uma vez que existem claramente muitos pontos sobrepostos nas regiões contendo peptídeos com massa molecular inferior a 12 KDa.

Segundo Richardson (Richardson *et al.*, 2006) durante o fracionamento inicial dos venenos de diferentes espécies de *Phoneutria* por Rp-HPLC, aproximadamente 55 picos de absorção à 214 nm foram obtidos. Os picos iniciais (1-7) continham peptídeos menores e material não proteico, enquanto que os demais picos (8-55) continham os peptídeos e proteínas maiores. Cada um dos picos (8-55) foram subsequentemente purificados por troca iônica (FPLC) mostrando conter um média de 3 ou mais peptídeos/proteínas por fração, suportando a estimativa que os venenos dessas aranhas contém mais que 150 componentes proteicos.

Os resultados, obtidos por RP-HPLC, também confirmam claramente que embora os venenos tivessem uma semelhança geral em seus componentes, houve diferenças qualitativas e quantitativas entre os venenos das três espécies analisadas. As principais diferenças entre os venenos residem no gradiente de eluição de acetonitrila com a concentração de 32-37%. O veneno da *P. reidyi* contem uma concentração mais elevada de componentes que eluíram desta parte do gradiente (Richardson *et al.*, 2006). De acordo com Figueiredo (De Figueiredo *et al.*, 2001) as frações eluídas nessa concentração de acetonitrila contem toxinas que são mais potentes para insetos (moscas domésticas, grilos e baratas) do que para ratos.

Segundo Richardson (Richardson *et al.*, 2006) o veneno total da *P. reidyi* é aproximadamente 20 vezes mais tóxico para insetos que o veneno bruto da *P. nigriventer*.

Também são visíveis diferenças nos perfis de HPLC de venenos obtidos de aranhas coletadas em diferentes regiões geográficas. Outros pesquisadores relataram variações acentuadas no veneno de *P. nigriventer,* examinados por SDS-PAGE e RP-HPLC os quais foram determinadas pelo sexo e tamanho/idade das

aranhas (Herzig, John e Ferreira Dos, 2002). De acordo com Richardson (Richardson *et al.*, 2006) este tipo de variação sexual, também foi observada na comparação entre venenos de aranhas adultas, machos e fêmeas de *P. keyserlingi*, coletados separadamente e analisados por eletroforese bidimensional.

No geral, os venenos de aranhas do sexo masculino contém um maior número de componentes que os venenos das fêmeas, isto é particularmente visível quando as proteínas com massas moleculares acima de 25 kDa são examinadas (Richardson *et al.*, 2006).

De acordo com Rezende (Rezende Junior *et al.*, 1991), outra possível causa de heterogeneidade em amostras de veneno pode ser a atividade de proteases endógenas. Outros autores sugerem que as atividades enzimáticas são devidas as contaminações com saliva, ou conteúdos do trato digestivo regurgitados durante o processo de extração do veneno por estimulação elétrica (Perret, 1974; Rekow, Civello e Geren, 1983; Kuhn-Nentwig, Schaller e Nentwig, 1994).

Após a análise de cerca de 150 peptídeos, foi possível identificar a estrutura principal das toxinas da *Phoneutria*, que demonstra a existência de 6 aminoácidos entre o primeiro e o segundo resíduo de cisteína, e a sequência Cys-Cys a uma distância de 5-10 resíduos de aminoácidos da segunda cisteína; e também uma segunda estrutura, que postula a existência de um par CxC na região C terminal (Richardson, Pimenta *et al,* 2006).

Considerando a diversidade e abundância de peptídeos/proteínas nos venenos de *P. nigriventer,* e os aspectos clínicos extremamente variáveis, a análise proteômica é uma ferramenta importante para o entendimento da complexidade desse veneno. Neste contexto, uma abordagem proteômica associada a técnicas tradicionais de ensaios biológicos pode evidenciar diferenças qualitativas ou quantitativas no veneno dessa espécie.

Tabela 2. Toxinas isoladas da aranha *Phoneutria nigriventer.*

Toxina	MW (Da)	Sinônimos	Referência
Techylectin-like toxin	25776,81	-	(Richardson *et al.*, 2006)
LSTTCEGKDKGICNLNLALQLITDVRDNFPVCPSPPLPIDCEEVLQRDFKAIPNPIDVYCDMVTDGGGWTVIQRRGD			
Toxin Tx1	8597,72	μ-ctenitoxin-Pn1a	(Diniz *et al.*, 1990; Rezende Junior *et al.*, 1991; Diniz *et al.*, 1993; Mattiello-Sverzut *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1999; Martin-Moutot, Mansuelle*, et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2006)
AELTSCFPVGHECDGDASNCNCCGDDVYCGCGWGRWNCKCKVADQSYAYGICKDKVNCPNRHLWPAKVCKKP			
Tx1	8669,17		(Diniz *et al.*, 1993)
MKLLGIFLVASFAFVLSF/GEEMIEGENPLEDQR**AELTSCFPVGHECDGDASNCNCCGDDVYCGCGWGRWNCKCKVADQSYAYGICKDKVNCPNRHLWPAKVCKKP**CRRN			
Neurotoxin Tx2-1	5841,7	U_2 - ctenitoxin-Pn1a	(Cordeiro *et al.*, 1992; Kalapothakis, Penaforte, Beirao*, et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 2006)
ATCAGQDKPCKETCDCCGERGECVCALSYEGKYRCICRQGNFLIAWHKLASCK			
Neurotoxin Pn 2-1A	6069,99	U_2 - ctenitoxin-Pn1b	(Kalapothakis, Penaforte, Beirao*, et al.*, 1998)
ATCAGQDKPCKETCDCCGERGECVCALSYEGKYRCICRQGYVWIAWYKLASCKK			
Pn2-1A	6079,53		(Kalapothakis, Penaforte, Beirao*, et al.*, 1998)
MKVAVIILSILVLAAAS/ESIEEYREDFSRPNAMERSANDWIPTAPSAVERSADFAVEELER/**ATCAGQDKPCKETCDCCGERGECVCALSYEGKYRCICRQGYVWIAWYKLASCKK**			
Neurotoxin Tx2-5	5100,89	δ-ctenitoxin - Pn2b	(Rezende Junior *et al.*, 1991; Cordeiro *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 2006)
ATCAGQDQTCKVTCDCCGERGECVCGGPCICRQGNFLIAAYKLASCKCK			
Neurotoxin Pn2-5A	5112,89	δ-ctenitoxin - Pn2c	(Kalapothakis, Penaforte, Leao*, et al.*, 1998)
ATCAGQDQTCKVTCDCCGERGECVCGGPCICRQGNFLIAWYKLASCKK			
Pn2-5A	5122,55		(Kalapothakis, Penaforte, Leao*, et al.*, 1998)
MKVAILFLSILVLAVAS/ESIEESRDDFAVEELGR**ATCAGQDQTCKVTCDCCGERGECVCGGPCICRQGNFLIAWYKLASCKK**			
Neurotoxin Tx2-6	5288,03	δ-ctenitoxin - Pn2a	(Cordeiro *et al.*, 1992; Penaforte *et al.*, 2000; Matavel *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2008)
ATCAGQDQPCKETCDCCGERGECVCGGPCICRQGYFWIAWYKLANCKK			
Tx2-6	5297,71		(Cordeiro *et al.*, 1992; Matavel *et al.*, 2002)
MKVAILFLSILVLAVAS/ESIEESRDDFAVEELGR**ATCAGQDQPCKETCDCCGERGECVCGGPCICRQGYFWIAWYKLANCKK**			

Tabela 2. Toxinas isoladas da aranha *Phoneutria nigriventer* (Continuação)

Neurotoxin Tx2-9	3736,51	U_5 - ctenitoxin-Pn1a	(Cordeiro *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 2006)
SFCIPFKPCKSDENCCKKFKCKTTGIVKLCRW			
Tx2-9	3742,1		(Cordeiro *et al.*, 1992)
SFCIPFKPCKSDENCCKKFKCKTTGIVKLCRW			
Neurotoxin Tx3	2243,53	U_7 - ctenitoxin-Pn1b	(Rezende Junior *et al.*, 1991)
GCIGRNESQKKDNVYKFKE			
Neurotoxin Tx3-1	4575,3	κ-ctenitoxin-Pn1a	(Cordeiro *et al.*, 1993; Kushmerick *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 2006)
AECAAVYERCGKGYKRCCEERPCKCNIVMDNCTCKKFISE			
Tx3-1	4582,93		(Cordeiro *et al.*, 1993; Kushmerick *et al.*, 1999)
MKFKIQVLVLAITLITLGIQA/EPNSSPNNPLIVEEDR**AECAAVYERCGKGYKRCCEERPCKCNIVMDNCTCKKFISE**/LFGFGK			
Neurotoxin Tx3-2	3533,18	ω-ctenitoxin-Pn1a	(Cordeiro *et al.*, 1993; Richardson *et al.*, 2006)
ACAGLYKKCGKGASPCCEDRPCKCDLAMGNCICK			
Tx3-2	3540,84		(Kalapothakis, Penaforte, Beirao*, et al.*, 1998)
MWLKIQVFLLAITLITLGIQA/EPNSSPNNPLIEEEAR**ACAGLYKKCGKGASPCCEDRPCKCDLAMGNCICK**/KKFIEFFGGGK			
Neurotoxin Tx3-3	-	ω-ctenitoxin-Pn2a	(Cordeiro *et al.*, 1993; Prado *et al.*, 1996; Guatimosim *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 1998; Leao *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2001; Richardson *et al.*, 2006)
GCANAYKSCNGPHTCCWGYNGYKKACICSGXNW			
Tx3-3	6300		(Cordeiro *et al.*, 1993)
GCANAYKSCNGPHTCCWGYNGYKKACICSGXNWK			
Neurotoxin Tx3-4	8361,58	ω-ctenitoxin-Pn3a	(Cordeiro *et al.*, 1993; Cassola *et al.*, 1998; Miranda *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 1999; Miranda *et al.*, 2001; Dos Santos *et al.*, 2002; Martin-Moutot, Haro*, et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2006; De Castro Junior *et al.*, 2008)
SCINVGDFCDGKKDDCQCCRDNAFCSCSVIFGYKTNCRCEVGTTATSYGICMAKHKCGRQTTCTKPCLSKRCKK			
Tx3-4	8449,6		(Cordeiro *et al.*, 1993)
SCINVGDFCDGKKDCCQCDRDNAFCSCSVIFGYKTNCRCE			

Tabela 2. Toxinas isoladas da aranha *Phoneutria nigriventer* (Continuação)

Neurotoxin Tx3-5	5145,77	U_7 - ctenitoxin-Pn1a	(Cordeiro *et al.*, 1993; Cardoso *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006)
GCIGRNESCKFDRHGCCWPWSCSCWNKEGQPESDVWCECSLKIGK			
Tx3-5	5063,6		(Cordeiro *et al.*, 1993)
GCIGRNESCKFDRHGCCWPWSCSCWNKEGQPESDVW			
Neurotoxin Tx3-6	6032,91	ω-ctenitoxin-Pn4a	(Cordeiro *et al.*, 1993; Bucaretchi, Dragosavac e Vieira, 2003; Cardoso *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2006)
ACIPRGEICTDDCECCGCDNQCYCPPGSSLGIFKCSCAHANKYFCNRKKEKCKKA			
Tx3-6	6044,39		(Cordeiro *et al.*, 1993)
ACIPRGEICTDDCECCGCDNQCCYCPPGSSLGIFKCSCAHANKYFCNRKKEKCKKA			
Neurotoxin Pn3A	3771,42	U_6 - ctenitoxin-Pn1a	(Kalapothakis, Penaforte, Beirao, *et al.*, 1998)
ACADVYKECWYPEKPCCKDRACQCTLGMTCKCK			
Pn3A	4866,29		(Kalapothakis, Penaforte, Leao, *et al.*, 1998)
MWLKIQVFVLALALITLGIQA/EPNSGPNNPLIQEEAR**ACADVYKECWYPEKPCCKDRACQCTLGMTCKCK**ATLGDLFGRR			
Neurotoxin Pn 3-3A	3873,34	U_9 - ctenitoxin-Pn1a	(Cardoso *et al.*, 2003)
GCADAYKSCNHPRTCCDGYNGYKRACICSGSNCKCK			
Pn 3-4A	8332,53	ω-ctenitoxin-Pn3b	(Cardoso *et al.*, 2003)
CINVGDFCDGKKDDCQCCRDNAFCSCSVIFGYKTNCRCEVGTTATSYGICMAKHKCGRQTTCTKPCLSKRCKKN			
Neurotoxin Pn3-5A	4705,32	U_{10} - ctenitoxin-Pn1a	(Cardoso *et al.*, 2003)
ECIGHRRSCKEDRNGCCRLYTCNCWYPTPGDQWCKCQLW			
Neurotoxin Pn3-6A	6589,36	U_{11} - ctenitoxin-Pn1a	(Cardoso *et al.*, 2003)
ACLARGETCKDDCECCDCDNQCYCPFDWFGGKWHPVGCSCAHANQYFCDHKKEKCKKA			
Neurotoxin Pn3-6B	6370,33	U_{12} - ctenitoxin-Pn1a	(Cardoso *et al.*, 2003)
GCLDIGKTCKDDCECCGCGNVCYCPFDWFGGKWQPFGCSCAYGLKYVCAHKQKKCPNV			

Tabela 2. Toxinas isoladas da aranha *Phoneutria nigriventer* (Continuação)

Neurotoxin Tx4(5-5)	5174,83	Γ- ctenitoxin -Pn1a	(Penaforte *et al.*, 2000; De Figueiredo *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006)
CADINGACKSDCDCCGDSVTCDCYWSDSCKCRESNFKIGMAIRKKFC			
Neurotoxin Tx4(6-1)	5241,01	δ-ctenitoxin - Pn1a	(Figueiredo *et al.*, 1995; Penaforte *et al.*, 2000; De Lima *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006)
CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSKSCKCREAAIVIYTAPKKKLTC			
Neurotoxin PnTx4-3	5199,91	δ-ctenitoxin - Pn1b	(Oliveira *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006)
CGDINAACKEDEDCCGYTTACDCYWSSSCKCREAAIVIYTAPKKKLTC			
Tx4(6-1)	5250,55		(Figueiredo *et al.*, 1995; Penaforte *et al.*, 2000)
MKVAIVFLSLLVLAFASESIEENREEFPVEESARCGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSKSCKCREAAIVIYTAPKKKLTC			
Pn4A	5184,43		(Penaforte *et al.*, 2000; De Figueiredo *et al.*, 2001)
MKVAIVFLSLLVLAFA/SESIEENREEFPVEESARCADINGACKSDCDCCGDSVTCDCYWSDSCKCRESNFKIGMAIRKKFC			
Pn4B	5625,03		(Penaforte *et al.*, 2000)
MKVAIVFLSLLVLAFA/SESIEENREEFPVEESARCGDINAPCQSDCDCCGYSVTCDCYWSSSCKCRESLFPLGMALRKAFCQNKI			
Venom protein PnTx22C3	6571,39	U_{11} - ctenitoxin-Pn1b	(Oliveira *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006)
ACLARGETCKDDCECCDCDNQCYCPFDWFGGKWHPVGCSCAHTNKYVCDHKKEKCKKA			
Neurotoxin PNTx13C3	3552,14	U_{13} - ctenitoxin-Pn1a	(Oliveira *et al.*, 2003)
VFCRSNGQQCTSDGQCCYGKCMTAFMGKICMR			
Neurotoxin PNTx24A0C3	3481,05	U_{13} - ctenitoxin-Pn1b	(Oliveira *et al.*, 2003)
VFCRFNGQQCTSDGQCCYGKCRTAFMGKICM			
Neurotoxin PNTx24A0C4	3679,28	U_{13} - ctenitoxin-Pn1c	(Oliveira *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006)
VFCRFNGQQCTSDGQCCYGKCRTAFLRMICMGG			
Neurotoxin PNTx22A0C1	4079,88	U_{14} - ctenitoxin-Pn1a	(Oliveira *et al.*, 2003)
MPCPKILKQCKSDEDCCRGWKCFGFSIKDKMCISR			

Tabela 2. Toxinas isoladas da aranha *Phoneutria nigriventer* (Continuação)

Neurotoxin PnTx27C4	4062,76	U_{17} - ctenitoxin-Pn1a	(Oliveira *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006)
IACAPRFSLCNSDKECCKGLRCKSRIANMWPTFCSQ			
Neurotoxin PnTx30C3	5195,99	U_{18} - ctenitoxin-Pn1a	(Oliveira *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006)
SCFEGGKDCKNDCQCCGKWSYCKCPIWGLFGCSCVIGDSMVEVRKCQ			
Non-toxic venom protein PnTx16C1	7577,41	U_{19} - ctenitoxin-Pn1a	(Oliveira *et al.*, 2003)
QWIPGQSCTNADCGEGQCCTGGSYNRHCQSLSDDGKPCQRPNKYDEYKFGCPCKEGLMCQVINYCQKK			
Toxin Pn4B	5615,38	U_{1} - ctenitoxin-Pn1a	(Penaforte *et al.*, 2000)
CGDINAPCQSDCDCCGYSVTCDCYWSSSCKCRESLFPLGMALRKAFCQNKI			
ω - phonetoxin PNTx22C5	8854,99	U_{20} - ctenitoxin-Pn1a	(Oliveira *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006)
GNCIELNNDCDGSKDDCQCCRDNAYCSCYNFFGIKSGCKCSVGNSGTGYSVCLKKLECPNRRAWTSWKKECTKR			
Proteinase PN47	4352,16	U_{21} - ctenitoxin-Pn1a	(Oliveira *et al.*, 2003)
IVYGVKDTPGKYPWMVSIERVKDVMKQACGGAILNENKI			
Venom protein PN10C5	3673,3	U_{23} - ctenitoxin-Pn1a	(Oliveira *et al.*, 2003)
GFCAQKGIKCHDIHCCTNLKCVREGSNRVCRKA			
Venom protein PN16C3	14775,7	U_{24} - ctenitoxin-Pn1a	(Oliveira *et al.*, 2003)
ARPKSDCEKHRESTEKTGTIMKLIPKCKENSDYEELQCYEDSKFCVCYDKKGHAASPISTKVKECGCYLKQKERKDS			
Toxin PnV2	2174,48	U_{24} - ctenitoxin-Pn1a	(Bento *et al.*, 1993)
LAKRADICQPGKTSQRACET			
Spasmogenic toxin PnV1	835,87	U_{28} - ctenitoxin-Pn1a	(Marangoni *et al.*, 1993)
EAFPGQST			

As toxinas destacadas em azul representam toxinas com discrepância nas massas moleculares relatadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Neste estudo realizamos uma varredura dos compostos presentes no veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* em busca de novas substâncias ativas farmacologicamente.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar as alterações comportamentais em animais (camundongos) sob efeito de diferentes frações do veneno da *P. nigriventer;*

- Determinar a massa molecular dos peptídeos ativos;

- Analisar o perfil proteômico e peptidômico do veneno da aranha *P. nigriventer* por espectrometria de massas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração do veneno da aranha *P. nigriventer*

O veneno foi extraído pelo laboratório de artrópodos do Instituto Butantan como descrito por Barrio (Barrio, 1949).

Resumidamente, o veneno (cerca de 150 mg) foi obtido por estimulação elétrica e coletado em pipeta capilar, desidratado e armazenado a -20°C até a diluição para procedimentos experimentais.

3.2 Animais

Todos os procedimentos envolvendo experimentação animal foram avaliados e considerados em concordância com as normas vigentes pela Comissão de Experimentação e Uso de Animais do Instituto Butantan – CEUAIB n° 453/08. OS animais utilizados em todos os experimentos foram camundongos Balb C machos com peso entre 25g e 28g. Os camundongos foram mantidos em biotério com luz, temperatura e ventilação adequadas durante todos os procedimentos experimentais, com água e ração padrão à vontade.

3.3 Análise proteômica e peptidômica

3.3.1 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas presentes no veneno foi realizada com diferentes quantidades de veneno, em duplicata, utilizando o reagente de Bradford (Bradford, 1976) adquirido da Sigma. Para estimar o teor proteico das amostras foi utilizada

uma curva padrão, construída com concentrações crescentes de soroalbumina bovina (Sigma).

Alternativamente, as frações obtidas por cromatografia foram analisadas em espectrofotômetro de nano volume (NanoDrop™ Thermo Scientific, EUA), utilizando os valores de absorbância obtidos das leituras a 280 nm como um indicativo do teor protéico. Para tanto, consideramos valores de absorbância igual a 1 (um) como sendo correspondente a concentração de 1 mg/ml.

3.3.2 Dose injetada

Injetamos 2,5% do total obtido de cada fração, a partir da purificação inicial de 150 mg do veneno bruto, por HPLC. Das purificações subsequentes injetamos 5% do total de cada fração. As diluições das frações foram feitas com 1 ml de água destilada.

3.3.3 Eletroforese de proteínas em gel de SDS-poliacrilamida

As análises foram realizadas como descrito por (Laemmli, 1970). Foram utilizados géis de 10 x 8 cm x 1.5 mm e um sistema de eletroforese Hoefer (GE Healthcare). As amostras foram aquecidas a 95 °C durante 5 min e aplicadas em volume máximo de 20 µl. As corridas foram realizadas em temperatura ambiente. Para a coloração do gel foi utilizado o Coomassie Coloidal [$(NH_4)_2SO_4$ 8%, ácido fosfórico 0,68%, Coomassie Brilliant Blue-G250 (SIGMA) 0,08%, metanol 25%]. A imagem do gel foi digitalizada utilizando um scanner (*Imagescanner,* GE Healthcare) com resolução de 300 pontos por polegada (dpi). A análise das imagens foi feita utilizando o software Image Master Platinum 6.0 (GE Healthcare).

3.3.4 Zimografia

A zimografia foi realizada para se evidenciar, no veneno da *Phoneutria nigriventer,* a presença de proteinases com atividade sobre gelatina (um substrato incorporado ao gel de SDS-poliacrilamida). Foi utilizado o método descrito por (Heussen e Dowdle, 1980) com algumas modificações. Para este ensaio, foram utilizados géis (10 x 8 cm x 1,00 mm) na concentração de 12% de poliacrilamida, contendo gelatina (na concentração final de 1mg/ml). A eletroforese ocorreu em temperatura ambiente, voltagem de 150 V, corrente de 40 mA por gel e sob condições não redutoras. Após a corrida os géis foram lavados por 30 minutos em solução tampão Tris-HCL 50 mM pH 8,0, contendo 2,5% de Triton X-100, para a remoção do SDS presente no gel. Em seguida foram lavados por 10 minutos com água destilada e imersos na solução de incubação (Tris-HCL 50mM pH 8,0 com 10 mM de $CaCl_2$, 200mM de NaCl e 0,02% Igepal) por 18 horas a 37°C. O gel foi submetido ao processo de revelação de bandas proteicas utilizando o corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma). A avaliação da atividade proteolítica deu-se com o aparecimento de regiões mais claras no gel, contrastando com o fundo azul (resultado da digestão do substrato presente na matriz poliacrilamida-gelatina). Alternativamente, a amostra do veneno foi incubada com inibidores de serinoproteases (PMSF, 20 mM, concentração final) e metaloproteases (EDTA, 20 mM, concentração final), por 30 minutos a temperatura ambiente. A imagem do gel foi documentada conforme a descrição do item anterior (Seção 3.3.2).

Procedimento realizado em colaboração com o Dr. André Zelanis e Dra. Solange Serrano do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA).

3.3.5 Digestão tripsínica *in gel* e identificação de proteínas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Bandas de proteínas de interesse, presentes no gel de SDS-poliacrilamida, foram recortadas e submetidas ao processo de digestão *in gel* segundo o protocolo descrito por (Hanna *et al.*, 2000), com algumas modificações. Todos os reagentes utilizados foram preparados no momento do uso.

Inicialmente os fragmentos de gel recortados foram incubados em 500 µL de uma solução de metanol 50% /ácido acético 5% em água MilliQ® por duas horas. Em seguida, essa solução foi removida por aspiração com pipeta e 500 µL foram adicionados aos fragmentos de gel, permanecendo por mais uma hora nesta solução. Em seguida, os fragmentos de gel foram então desidratados pela incubação por 10 minutos (2 vezes de 5 minutos) e 200 µL de acetonitrila (100%). A solução de acetonitrila foi aspirada com pipeta e o restante evaporado em um sistema de concentração a vácuo (*speed vac*). Após essa etapa, os pedaços de gel foram reidratados por 30 minutos em 30 µL (por fragmento de gel) da solução redutora (ditiotreitol 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Decorrido o tempo de reidratação com DTT, a solução foi aspirada com pipeta e os fragmentos de gel foram incubados por 30 minutos em 30 µL (por fragmentos de gel) da solução alquilante (Iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Em seguida, a solução alquilante foi removida por aspiração com pipeta e, os fragmentos de gel submetidos à incubação, por 10 minutos, em 100 µL (por fragmentos de gel) de uma solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Após essa etapa, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e 200 µL (por fragmento de gel) de acetonitrila 100% foram adicionados e os fragmentos de gel incubados nesta solução por 5 minutos. A solução de acetonitrila foi retirada e, novamente, os fragmentos de gel foram incubados, por 10 minutos, em 200 µL (por fragmento de gel) da solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Na última etapa de desidratação, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e os fragmentos de gel foram incubados por 10 minutos (duas vezes de 5 minutos) em 200 µL de acetonitrila 100%. A solução de acetonitrila foi retirada por aspiração com pipeta e o restante foi evaporado em sistema *speed vac*. Os fragmentos de gel foram reidratados em 5 µL de uma solução de tripsina (50 ng/µL em bicarbonato de amônio 50 mM), em banho de gelo, por 30 minutos. Em seguida, a solução de tripsina foi retirada, uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionada (em um volume suficiente para cobrir os fragmentos de gel) e os tubos contendo os fragmentos de gel foram incubados em banho termostatizado (a 37°C) por 18 horas.

A extração dos peptídeos do gel foi feita com a adição de 30 µL (por fragmento de gel) da solução 1 – acido fórmico 5% (em água MilliQ) – e incubação dos pedaços de gel por 10 minutos nesta solução, a temperatura ambiente. Em

seguida, a solução contendo os peptídeos foi transferida para um novo tubo e, ao pedaço de gel do tubo anterior, foram adicionados 12 µL (por fragmento de gel) da solução 2 - ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. Os fragmentos de gel foram incubados por 20minutos (duas vezes de 10 minutos) nesta solução, e a solução que foi transferida para o tubo contendo os peptídeos que foram extraídos com a solução 1. A solução foi concentrada em *speed vac* e os peptídeos resultantes foram ressuspendidos em 20 µL (por amostra) de ácido fórmico 0,1% e analisados em um espectrômetro de massas do tipo Quadrupolo – Tempo de Vôo com fonte de ionização *nanospray* (Q-ToF Ultima, Waters).

Uma alíquota de 4,5 µL da solução de peptídeos foi aplicada numa coluna de *trapping* (coluna C-18; 180 µm x 20 mm, diâmetro interno e comprimento, respectivamente, Waters) com fluxo de 15 µL/min, ajustado diretamente no programa do cromatrógrafo nano Acquity (Waters). Em seguida a mistura de peptídeos foi submetida à cromatografia líquida de fluxo nanométrico, utilizando coluna C-18 capilar de 100 µm x 100 mm (Waters), num fluxo de 600 nl/min, com um gradiente de 0 a 80% de acetonitrila (solvente B) em ácido fórmico 0,1% (Solvente A) durante um total de 20 min. (3% de B em 1min. e de 80-3% de B em 1 min. e 30 segundos; 80% de B em 1 min e de 80-3% de B em 1 min. e 30 segundos). Como calibrante foi utilizada a infusão constante de uma solução de ácido fosfórico 0,1%/ acetonitrila 25% em água MilliQ®, num fluxo de 500 nl/min.

No espectrômetro, a voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 3.4 kV e 100 °C, respectivamente. O espectrômetro foi operado no modo *Data Dependent Acquisition* (DDA), utilizando uma varredura de massas na região de *m/z* de 200 a 2000, seguida da dissociação induzida por colisão dos 3 íons mais intensos. O espectrômetro foi ajustado para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 90 segundos (para se diminuir a aquisição repetitiva de um mesmo valor de *m/z*).

3.3.6 Digestão tripsínica em solução e identificação de proteínas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A digestão tripsínica em solução foi realizada conforme o procedimento descrito por Kleifeld e colaboradores (Kleifeld *et al.*, 2011). Para a etapa de redução,

adicionamos solução de hidrocloreto de guanidina (GuHCl, preparada em água MilliQ) 8M, à amostra para uma concentração final de 4M. Em seguida adicionamos ditiotreitol (DTT, preparada em água MilliQ) para uma concentração final de 5mM. Incubamos a mistura a 65°C por 1 hora.

Para a etapa de alquilação, adicionamos solução de iodoacetamida (IAA, preparada em água MilliQ), para uma concentração final de 15mM. Incubamos a mistura a temperatura ambiente, no escuro, por 1 hora.

Para o consumo do excesso de IAA, adicionamos DTT para uma concentração final de 10mM. Incubamos a mistura a temperatura ambiente, por 15 minutos. Para o "*clean up"* da amostra (remoção dos reagentes GuHCL, DTT e IAA), adicionamos 8 volumes de acetona gelada e 1 volume de metanol gelado. Centrifugamos a amostra por 10 minutos, 14000 x g, 4°C. Removemos o sobrenadante e lavamos o *pellet* com metanol gelado (1 volume). Repetimos a centrifugação e a remoção do metanol.

Deixamos o *pellet*, da etapa anterior, secar a temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos. Nesta etapa, a dissolução do pellet é realizada de forma que no volume final a concentração fique em 1mg/ml.

Considerando 500 µg de proteínas, adicionamos 2,5 µL de NaOH 100 mM e dissolvemos o pellet com pipeta. Adicionamos 87,5 µL de água Milli Q, 10 µL de tampão HEPES 500 mM, pH 7,5 e aferimos o pH pipetando 0,5 µL em fitas de pH. Idealmente o pH deve estar entre 7 e 8. Retiramos uma alíquota de 10 µL (=10 µg) e guardamos como "*antes da digestão".*

Adicionamos a solução de tripsina (preparada em HCl 1mM) para uma proporção 1:100 (enzima:substrato). Incubamos à 37°C, *"Overnight".*

No dia seguinte, retiramos uma alíquota de 10 µL (=10 µg) e corremos um gel (12%) para verificarmos a eficiência da digestão.

A solução de peptídeos resultante (5 µL) foi carregada em coluna de *trapping* 100 µm x 2 cm, preenchida com resina C-18 (Aqua C-18, Phenomenex) e em seguida submetida a cromatografia líquida de fluxo nanométrico (300 nL/min) em coluna capilar de 10 cm (75 µm x 350 µm; diâmetro interno e externo,

respectivamente) preenchida com resina C-18 (AQUA C-18, Phenomenex, EUA. A cromatografia foi realizada num cromatógrafo de fluxo nanométrico (Proxeon nanoLC, Thermo Scientific) conectado ao espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Para tanto, os solventes utilizados foram: ácido acético 0,5% e acetonitrila 80% em ácido fórmico 0,5%. A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 2,0 kV e 200 °C, respectivamente, e o espectrômetro foi operado no modo DDA, no qual uma varredura de massas na região de *m/z* de 300 a 2000 foi realizada (*FullMS,* utilizando o analisador *Orbitrap,* com resolução de 60 000), seguida por dissociação induzida por colisão (CID, utilizando o analisador *ion trap*) dos 10 íons mais intensos, com um tempo de exclusão dinâmica de 60 segundos.

3.3.7 Critério para identificação dos peptídeos e análise em bancos de dados

Tanto para a identificação dos peptídeos gerados pela digestão das proteínas *in gel* com tripsina, quanto em solução, utilizamos o banco não redundante do Uniprot (www.uniprot.org; Uniprot *release* 2013_06), restrito à taxonomia *Arachnida* (que contava com 65 519 entradas). Para os dados de digestão tripsínica *in gel* utilizamos o software X!Tandem (Craig e Beavis, 2004). Como parâmetros de busca foram utilizados: i) até duas clivagens perdidas pela tripsina; ii) resíduos de cisteína carbamidometilados (que foram escolhidos como uma modificação fixa) e resíduos de metionina oxidados (que foram escolhidos como uma modificação variável). Para os dados de alta resolução, obtidos no espectrômetro LTQ Orbitrap Velos, utilizamos o programa MaxQuant (Cox e Mann, 2008).

Neste caso os mesmos parâmetros de busca descritos anteriormente foram utilizados. Para ambos os programas, as identificações foram realizadas com uma taxa de falso positivo ≤ 1%, calculada com base na utilização de um banco de dados *decoy*. Este banco foi elaborado por meio da ordenação reversa das sequencias presentes no banco de dados original. A Taxa de Falsos Positivos (TFP) foi calculada com base na expressão: TFP=FP/FP+PV x 100, em que FP = número de falsos positivos e PV= número de positivos verdadeiros.

3.4 Purificação do veneno da aranha *P. nigriventer*

3.4.1 Purificação do veneno bruto por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC - Preparativa

A purificação do veneno bruto foi realizada, em um cromatógrafo líquido modelo Delta 600 acoplado a um detector UV-Vis modelo 2487, ambos da Waters Associates, Milford, MA, EUA, um coletor de frações LKB-Frac-200 e um registrador Servogor 120, ambos da Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA. As condições cromatográficas foram:

a) Coluna: Júpiter C_{18} (21,2 x 250 nm, 300 Å, 15 µm)
b) Fluxo: 10 mL / min
c) Comprimento de onda: 220 nm
d) Sistema de solventes:
Solvente A: 0,1% TFA / H_2O e Solvente B: 60% ACN em A
e) Gradiente: 1-100% B / 90min

3.4.2 Purificação das frações ativas por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC- Preparativa

As frações que demonstraram atividade farmacológica (56/57, 78, 90 a 95), alterando o comportamento dos camundongos, foram submetidas à cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) para se obter um melhor grau de pureza dos peptídeos.

As purificações foram realizadas utilizando os mesmos equipamentos e procedimentos apresentados na purificação do veneno bruto (Seção 3.2.1), excetuando os sistemas de solventes, gradientes e coluna. As condições cromatográficas foram:

a) Coluna: Beckman C18, modelo Ultrasphere (10 mm X 25 cm);
b) Fluxo: 3 mL/min;
c) Comprimento de onda: 220 nm;

d) Sistema de solventes e gradientes:

- **Fração 56/57**- Solvente A: 0,1% TFA / H_2O e Solvente B: 60% ACN – 0,1% TFA/ H_2O. Gradiente: 10 a 90% de B em 90 minutos.

- **Fração 78** – Solvente A: 0,05% TFA/ H_2O e Solvente B: 100% ACN – 0,05%TFA. Gradiente: 5% de B em 5 minutos; elevamos a 35% de B em 20 minutos; 35 a 80% de B em 60 minutos.

- **Fração 90 a 95** – Solvente A: 0,1% TFA/ H_2O e Solvente B: 90% ACN – 0,1% TFA/ H_2O. Gradiente: 30 a 60% de B em 60minutos.

Procedimentos (Seções 3.4.1; 3.4.2) realizados em colaboração com o Dr. Antônio Miranda do Departamento de Biofísica da UNIFESP.

Todas as amostras obtidas foram liofilizadas e armazenadas a - 80°C até a diluição para procedimentos experimentais.

3.5 Caracterizações dos peptídeos

3.5.1 Cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas – LC/ESI-MS

Os espectros de massas foram obtidos através de um sistema LC/ESI-MS, constituído por um módulo de separação com injetor automático com capacidade de 120 amostras Alliance modelo 2695, detector do tipo “UV-Vis” modelo 2486 e um detector de massas, modelo 3100, todos da Waters Associates, Milford, MA, EUA e. O sistema é controlado por uma Workstation Dell um software denominado MassLynx, versão 4.1. Os peptídeos foram dissolvidos em água Milli-Q, na concentração de 2 mg/mL. As condições experimentais foram:

Coluna: Waters Nova-Pak C_{18} (2,1x150 mm), 60 Å, 3,5 μm

Solventes:	A: 0,1% TFA/H_2O
	B: 0,1% TFA em 90% ACN/H_2O
Gradiente:	5 a 95% de B em 30 minutos
Fluxo:	0,4 mL/min
Comprimento de onda:	214 e 254 nm
Intervalo de massas:	200 - 2000 Da.
Modo:	“Electrospray” Positivo
fluxo de nitrogênio:	4,1 L/h
Temperatura da fonte:	105ºC
Temperatura de evaporação:	400ºC
Voltagem do “cone”:	36 V
Energia no capilar:	3 kV
Energia do extrator:	0.5 kV
Energia do multiplicador:	500 V
Resolução de baixo peso molecular:	15,6
Resolução de alto peso molecular:	8,7

Procedimento realizado em colaboração com o Dr. Antônio Miranda do Departamento de Biofísica da UNIFESP.

3.6 Efeitos *in vivo* das frações do veneno de *P. nigriventer* em camundongos Balb C

A toxicidade de cada fração foi avaliada qualitativamente em 2 (dois) camundongos Balb C. Os animais foram observados individualmente por aproximadamente 3 horas e cada alteração comportamental foi descrita. Os seguintes sinais de intoxicação foram observados: excitabilidade, hipersalivação, tremor, prostração, letargia, diminuição dos reflexos, diarreia, respiração acentuada, convulsão, convulsão clônica, paralisia dos membros, ereção, animais lambendo as patas acentuadamente e morte. Consideramos como frações ativas, apenas as que alteraram o comportamento de ambos os animais injetados (dois animais).

4 RESULTADOS

4.1 Análise proteômica

4.1.1 Perfis eletroforéticos

Quando o veneno bruto (50 µg) foi submetido à eletroforese unidimensional, em condições redutoras e não redutoras, diferentes perfis foram obtidos para cada caso. Os perfis obtidos indicam proteínas com massa molecular entre 5 kDa e 120 kDa, como pode ser observado na figura 2 a seguir.

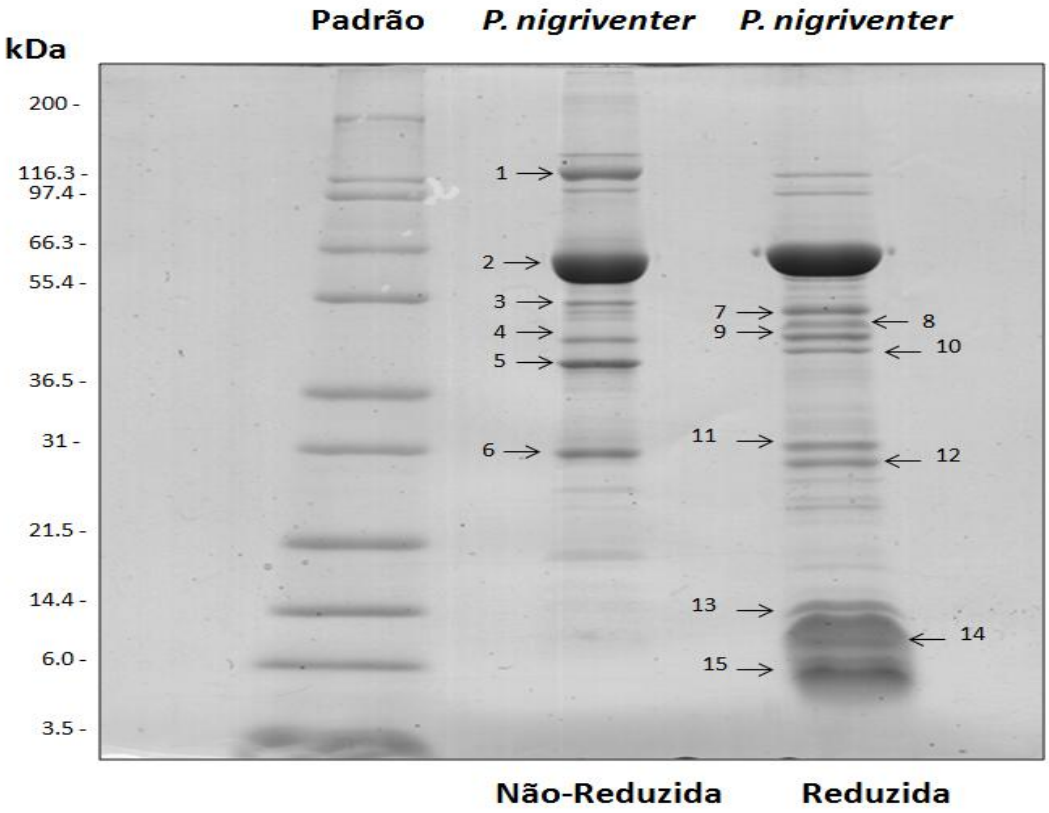

Figura 2. Perfil proteico do veneno da aranha *P. nigriventer* (50 µg) em eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (gel em gradiente de 8%-18% de poliacrilamida). Os marcadores de massa molecular estão indicados à esquerda da figura. As setas indicam bandas proteicas diferenciais entre as amostras, que foram recortadas e submetidas à digestão tripsínica *in gel* e analisadas em LC-MS/MS. As proteínas foram coradas com *Comassie Brilliant Blue* R-250. Utilizamos como padrão o Mark12 (Invitrogen).

As bandas obtidas no gel, indicadas por setas na figura 2, foram recortadas e submetidas ao procedimento de digestão tripsínica *in gel* e subsequente análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) para identificação das proteínas correspondentes, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3. Identificação de proteínas por LC-MS/MS em diferentes bandas (fig. 2) obtidas por eletroforese em gel de SDS – poliacrilamida.

Banda n°	Massa molecular (kDa)*	Proteína Identificada	Organismo	Número de acesso**	NPU†
1	120	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	3
		Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	3
		Hemocyanin subunit G	*Nephila inaurata madagascariensis*	Q86N89	2
		Hemocyanin subunit 1	*Cupiennius salei*	Q95ZI0	4
		Hemocyanin subunit 2	*Cupiennius salei*	Q95ZH9	1
2	60	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	3
		Hemocyanin subunit 2	*Cupiennius salei*	Q95ZH9	3
		Hemocyanin subunit G	*Nephila inaurata madagascariensis*	Q86N89	3
		Hemocyanin subunit 1	*Cupiennius salei*	Q95ZI0	2
		Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	5
3	55	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	1
		Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	1
		Techylectin-like protein (Fragments)	*Phoneutria nigriventer*	P85031	4
4	50	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	1
		U10-ctenitoxin-Pk1a (Fragments)	*Phoneutria keyserlingi*	P85860	2
		Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	1
5	40	Putative uncharacterized protein	*Amblyomma maculatum*	G3MJV7	1
6	30	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	1
		U21-ctenitoxin-Pn1a	*Phoneutria nigriventer*	P84033	4
		Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	1

(Continua)

Tabela 3. Identificação de proteínas por LC-MS/MS em diferentes bandas (fig. 2) obtidas por eletroforese em gel de SDS – poliacrilamida *(Continuação)*

7	**53**	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	1
		U10-ctenitoxin-Pk1a (Fragments)	*Phoneutria keyserlingi*	P85860	1
		Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	1
8	**52**	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	1
9	**51**	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	2
		Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	2
		Hemocyanin subunit G	*Nephila inaurata madagascariensis*	Q86N89	1
10	**48**	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	2
		Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	2
		Hemocyanin subunit G	*Nephila inaurata madagascariensis*	Q86N89	1
		Hemocyanin subunit 1	*Cupiennius salei*	Q95ZI0	1
		Hemocyanin subunit 2	*Cupiennius salei*	Q95ZH9	1
11	**32**	**Techylectin-like protein (Fragments)**	*Phoneutria nigriventer*	P85031	7
		Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	3
		Hemocyanin subunit G	*Nephila inaurata madagascariensis*	Q86N89	1
		U21-ctenitoxin-Pn1a	*Phoneutria nigriventer*	P84033	1
		Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	1
12	**30**	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	1
		U21-ctenitoxin-Pn1a	*Phoneutria nigriventer*	P84033	4
		Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	1

(Continua)

Tabela 3. Identificação de proteínas por LC-MS/MS em diferentes bandas (fig. 2) obtidas por eletroforese em gel de SDS – poliacrilamida.

13	**15**	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	1
		U20-ctenitoxin-Pn1a (Fragment)	*Phoneutria nigriventer*	P84093	2
		Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	1
14	**8**	**Delta-ctenitoxin-Pn2a**	*Phoneutria nigriventer*	P29425	2
		Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	1
		Omega-ctenitoxin-Pn3a	*Phoneutria nigriventer*	P81790	3
		Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	1
15	**5**	**Kappa-ctenitoxin-Pn1a**	*Phoneutria nigriventer*	O76200	1

* massa molecular das proteínas no gel
** Número de acesso conforme o banco de dados Uniprot (www.uniprot.org).
† Número de Peptídeos Únicos
As identificações destacadas em verde pertencem a aranha *P. nigriventer.*

Todas as informações referentes à identificação de peptídeos por espectrometria de massas (tabelas contendo as estruturas primárias dos peptídeos) estão apresentadas no anexo deste trabalho.

4.1.2 Identificações de proteínas por LC-MS/MS através de digestão tripsínica em solução

A amostra de veneno da aranha *P. nigriventer* (100 μg) foi submetida à digestão tripsínica em solução e analisada por (LC-MS/MS), utilizando um espectrômetro de alta resolução (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Scientific, EUA) como alternativa à análise de digestão tripsínica *in gel.* Esta abordagem permitiu a identificação de um número ainda maior de proteínas no veneno. A tabela 4 apresenta as proteínas identificadas nesse experimento.

Tabela 4. Identificação de proteínas por LC-MS/MS através de digestão tripsínica em solução.

Proteínas identificadas	Número de acesso*	Organismo	NPU**
Cytochrome c oxidase subunit 1	**A7WU46**	*Geolycosa micanopy*	1
Cytochrome c oxidase subunit 1	**H9CDJ0**	*Arctosa littoralis*	1
Empty spiracles protein	**Q5XU01**	*Euscorpius flavicaudis*	1
Hemocyanin	**A9QQD6**	*Lycosa singoriensis*	1
Hemocyanin subunit 1	**Q95ZI0**	*Cupiennius salei*	1
Hemocyanin subunit 2	**Q95ZH9**	*Cupiennius salei*	2
Hemocyanin subunit 4	**Q95ZH7**	*Cupiennius salei*	1
Hemocyanin subunit 5	**Q95ZH5**	*Cupiennius salei*	1
Neural cell adhesion molecule L1	**B7PCC8**	*Ixodes scapularis*	1
Putative dystrophin-like protein	**L7LZ01**	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Putative uncharacterized protein	**B7PHI9**	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**B7PIY3**	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**B7PQG6**	*Ixodes scapularis*	1
Secreted salivary gland peptide	**B7QH82**	*Ixodes scapularis*	1
Techylectin-like protein	**P85031**	*Phoneutria nigriventer*	1

(Continua)

Tabela 4. Identificação de proteínas por LC-MS/MS através de digestão tripsínica em solução.

Actin	**B2YGD3**	*Galianora bryicola*	1
Acyl-CoA synthetase	**B7PHG0**	*Ixodes scapularis*	1
Arylformamidase	**B7PSM5**	*Ixodes scapularis*	1
Cytochrome c oxidase subunit 2	**D7SGR9**	*Panonychus ulmi*	1
Delta-ctenitoxin-Pn2c	**O76199**	*Phoneutria nigriventer*	1
Hemocyanin	**A9QQD6**	*Lycosa singoriensis*	1
Hemocyanin G chain	**Q9NFL4**	*Aphonopelma californicum*	1
Hemocyanin subunit 1	**Q95ZI0**	*Cupiennius salei*	3
Hemocyanin subunit 5	**Q95ZH5**	*Cupiennius salei*	1
Hemocyanin subunit 6	**Q95ZH2**	*Cupiennius salei*	10
		Cupiennius salei	
		Cupiennius salei	
		Cupiennius salei	
		Cupiennius salei	
		Cupiennius salei	
		Cupiennius salei	
		Cupiennius salei	
		Cupiennius salei	
		Cupiennius salei	

(Continua)

Tabela 4. Identificação de proteínas por LC-MS/MS através de digestão tripsínica em solução.

Innexin	**B7PZQ9**	*Ixodes scapularis*	1
Involucrin	**B7Q576**	*Ixodes scapularis*	1
Leucine-rich repeat (LRR) protein	**B7QEK2**	*Ixodes scapularis*	1
Lospin 3	**A7UI18**	*Amblyomma americanum*	1
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	**Q6JT24**	*Haplopelma schmidti*	1
P450 CYP319A1	**B7QBU2**	*Ixodes scapularis*	1
Protein disulfide isomerase	**B7Q9F1**	*Ixodes scapularis*	1
Putative fringe glycosyltransferase	**L7LYZ5**	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Putative inactive phospholipase c-like protein 2	**L7MKG3**	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Putative pnuts	**L7MKZ7**	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Putative tick serine protease	**L7MMY4**	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Putative tick transposon	**L7MC25**	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Putative uncharacterized protein	**B7PH95**	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**B7PS90**	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**B7Q8L5**	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**B7QHV7**	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MFU0**	*Amblyomma maculatum*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MGW9**	*Amblyomma maculatum*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MHC7**	*Amblyomma maculatum*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MIL2**	*Amblyomma maculatum*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MNZ1**	*Amblyomma maculatum*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MS29**	*Amblyomma maculatum*	1

(*Continua)*

Tabela 4. Identificação de proteínas por LC-MS/MS através de digestão tripsínica em solução.

Sodium-dependent multivitamin transporter	**B7PU18**	*Ixodes scapularis*	1
Techylectin-like protein	**P85031**	*Phoneutria nigriventer*	2
		Phoneutria nigriventer	
U10-ctenitoxin-Pk1a	**P85860**	*Phoneutria keyserlingi*	2
		Phoneutria keyserlingi	
U21-ctenitoxin-Pn1a	**P84033**	*Phoneutria nigriventer*	3
		Phoneutria nigriventer	
		Phoneutria nigriventer	
U24-ctenitoxin-Pn1a	**P84032**	*Phoneutria nigriventer*	1
Uncharacterized protein	**L7LZ58**	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Zinc finger protein	**B7P0R7**	*Ixodes scapularis*	1

* Número de acesso conforme o banco de dados Uniprot (www.uniprot.org).
** Número de Peptídeos Únicos
As identificações destacadas em verde pertencem a aranha *P. nigriventer.*

Todas as informações referentes à identificação de peptídeos por espectrometria de massas (tabelas contendo as estruturas primárias dos peptídeos) estão apresentadas no anexo deste trabalho.

4.1.3 Zimografia

A atividade proteolítica do veneno da aranha *P. nigriventer* foi avaliada pela técnica de zimografia em que utilizamos um substrato (gelatina) incorporado ao gel de SDS- policrilamida. A figura 3 apresenta uma distribuição bem definida de proteinases nas regiões de aproximadamente 14 a 25 kDa, característica observada pela intensa atividade gelatinolítica das bandas presentes nessas regiões. Após a incubação da amostra com inibidor de serinoproteases (PMSF) foi possível perceber uma discreta redução da atividade gelatinolítica na faixa de 23 kDa (região destacada na figura). Por outro lado, a incubação prévia da amostra com inibidor clássico de metaloproteases (EDTA), não foi capaz de abolir a atividade gelatinolítica.

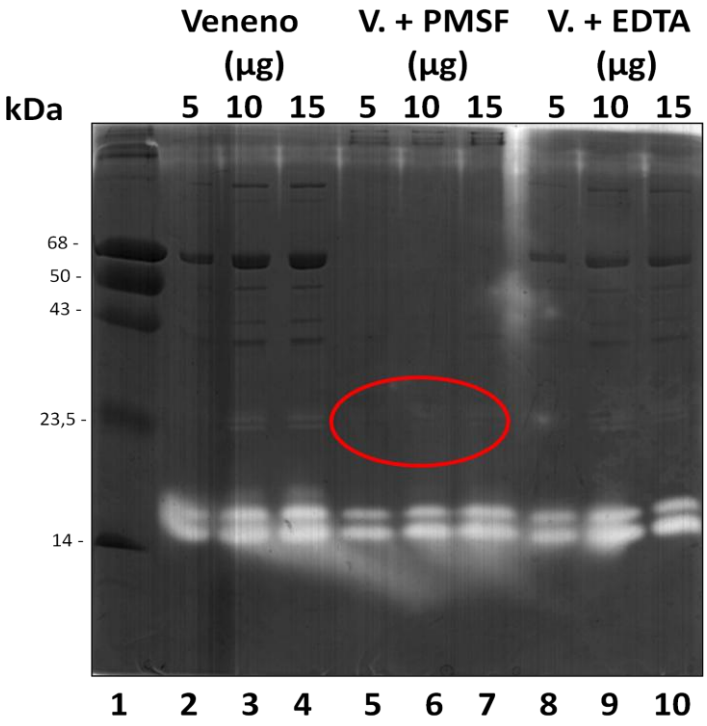

Figura 3. Avaliação da atividade proteolítica por zimografia**. 1-** Padrão de massa molecular (kDa); **2;3;4-** Veneno bruto da *P. nigriventer,* nas concentrações de 5, 10, 15 µg, respectivamnt ; **5;6;7-** Veneno bruto de *P.*n, nas concentrações de 5, 10, 15 µg + PMSF (inibidor de serinoproteases), 20mM; **8,9,10-** Veneno bruto de *P.n,* nas concetrações de 5, 10, 15 µg + EDTA (inibidor de metaloproteases, 20mM. As proteínas foram coradas com *Comassie Brilliant Blue* G-250.

4.2 Fracionamento inicial do veneno bruto de *P. nigriventer*

O veneno bruto da aranha *Phoneutria nigriventer* foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC - preparativa, em uma coluna Júpiter C_{18} (21,2 x 250 nm, 300 Å, 15 µm) e absorbância monitorada em 220 nm. O fluxo foi de 10 ml/min e o gradiente empregado foi de 1-100% de B por 90 minutos.

Durante o fracionamento inicial, aproximadamente 52 picos majoritários foram obtidos e as frações foram colhidas em tubos individuais, numerados de 1 a 105, conforme demonstrado na figura 4, a seguir.

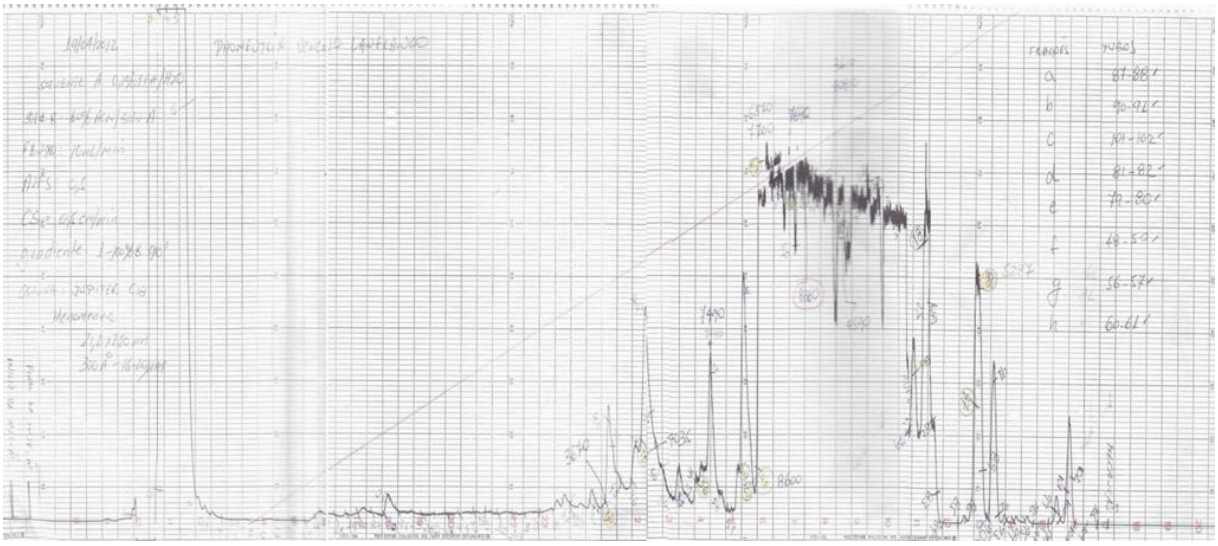

Figura 4. Cromatograma do veneno bruto da aranha *P. nigriventer* por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC - preparativa.

Em todos os estudos sobre o veneno da *Phoneutria nigriventer,* neste laboratório, nós rotineiramente empregamos a filtração em gel, em uma longa coluna Sephadex G-50 (200 cm) como a primeira etapa dos procedimentos de purificação. Neste estudo não empregamos esta etapa cromatográfica, na tentativa de minimizar a hidrólise das proteínas e peptídeos constituintes deste veneno, por qualquer protease endógena além de otimizar os procedimentos cromatográficos.

4.3 Espectros de massas obtidos por LC/ESI-MS

Iniciamos as caracterizações buscando identificar as frações (tubos) que continham duas toxinas conhecidas, a Tx3-4, com massa molecular de 8.360 Da (Fig. 2) e a Tx2-6 de aproximadamente 5.290 Da (Fig.3), a fim de avaliarmos a integridade do veneno.

Para a obtenção dos espectros de massas, o veneno bruto foi submetido à cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) em um sistema LC/ESI-MS, utilizando uma coluna Waters Nova-Pak $C_{18,}$ e absorbância monitorada em 214 nm. O fluxo foi de 0,4 mL/min.

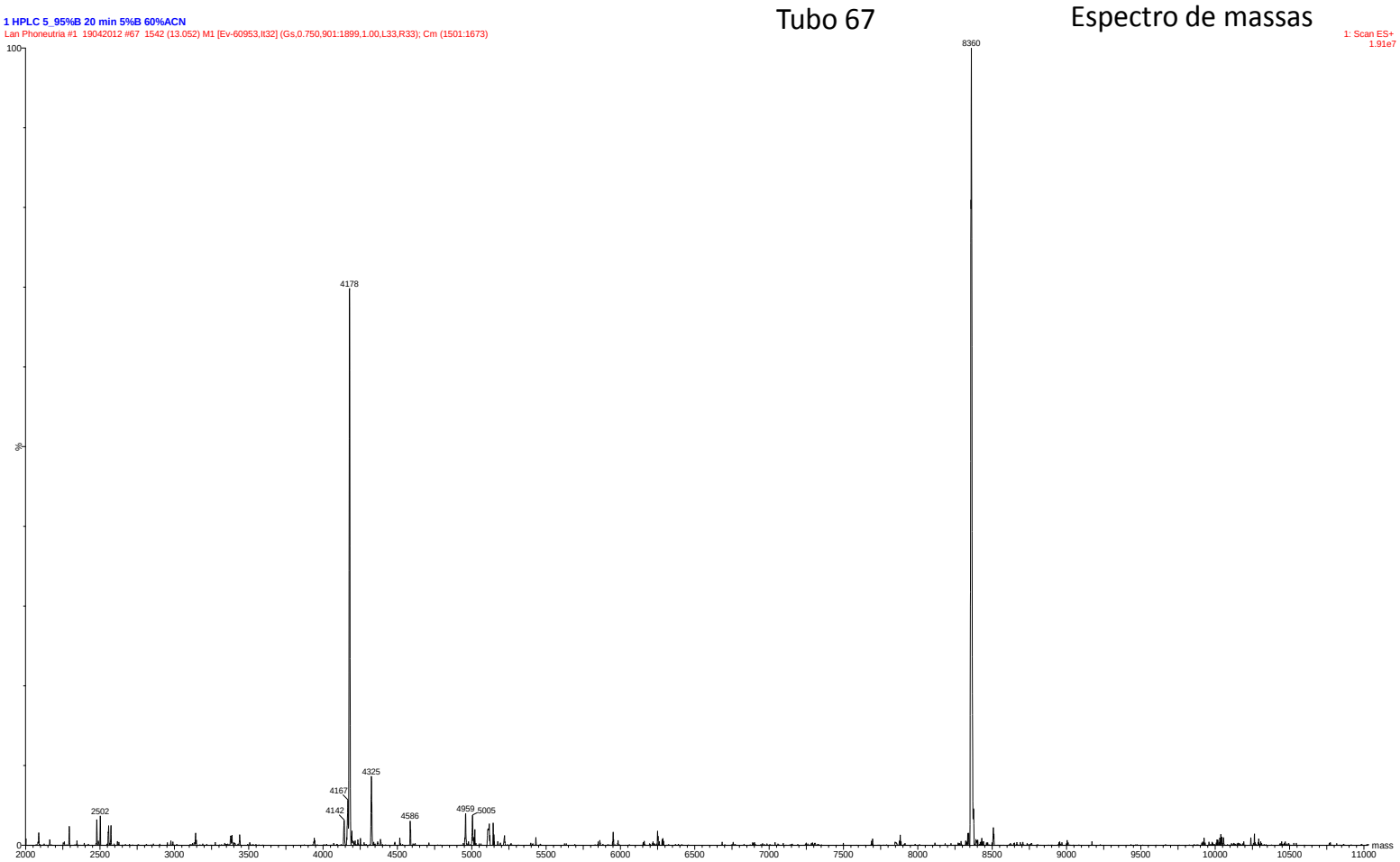

Figura 5. Espectro de massas por LC-ESI/MS da fração 67 contendo a toxina PF3 (Tx3-4) de massa molecular de 8.360 Da.

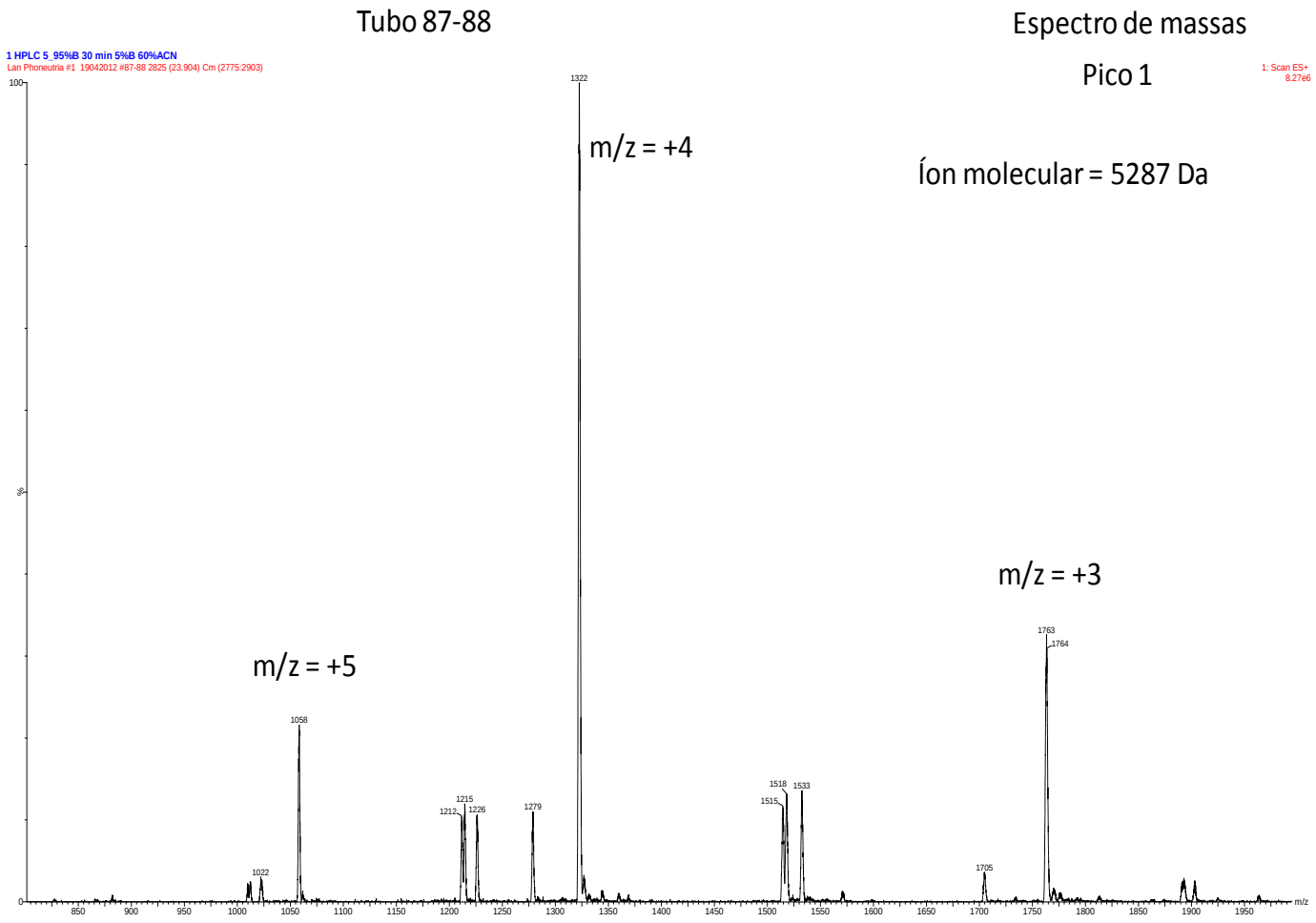

Figura 6. Espectro de massas por LC-ESI/MS da fração 87/88 contendo a toxina Tx2-6 de massa molecular aproximada de 5.288 Da.

Das frações obtidas (105 frações), submetemos à analise comportamental, cerca de 52 frações que representam os picos majoritários da cromatografia inicial.

4.4 Análise comportamental individual de camundongos Balb C injetados com diferentes frações do veneno de *P. nigriventer*

Passamos a apresentar as alterações comportamentais, observadas individualmente em camundongos Balb C, sob efeito de diferentes frações do veneno analisado.

Diferentes sintomas foram observados como prostração, diarreia, diminuição dos reflexos, alterações respiratórias, ereção peniana, letargia, hipersalivação, convulsão, agitação extrema, paralisia dos membros posteriores e morte de alguns animais.

A partir da identificação da fração que continha a toxina Tx2-6 (coletada no tubo 87/88), pudemos estimar a concentração protêica por absorbância óptica a 280 nm e subsequente injeção da dose mínima efetiva estimada, determinada em outro estudo desse laboratório, capaz de causar ereção em camundongos. As concentrações dessas frações e das demais estão apresentadas no quadro 2 da análise comportamental (Seção 4.2).

Na tabela 5 a seguir, descrevemos as alterações comportamentais observadas, após a injeção de diferentes concentrações, correspondentes a 2,5% de cada fração obtida nesta etapa da purificação, , destacando em amarelo as frações ativas.

Vale a pena lembrar que consideramos como frações ativas, apenas as frações que reproduziram os efeitos simultaneamente em dois animais injetados.

Tabela 5. Respostas comportamentais individuais de camundongos Balb C injetados com diferentes frações do veneno de *P. nigriventer.*

Frações	Toxinas	Dose µg	Efeitos observados
43/44/45	-	0,4	Nenhuma alteração
46	-	0,26	Nenhuma alteração
47	**-**	0,012	**Prostração/ letargia/ diminuição dos reflexos**
(48/49/50)	-	0,32	Nenhuma alteração
51	-	0,015	Nenhuma alteração
52/53	-	0,037	Nenhuma alteração
54/55	-	0,057	Nenhuma alteração
56/57	**-**	0,34	**Excitabilidade/ animais se coçando constantemente/ lambendo as patas desesperadamente**
59	**-**	0,0205	**Prostrados/ letargia/ diminuição dos reflexos**
60	-	0,15	Nenhuma alteração
61	-	0,027	Nenhuma alteração
62	-	0,0125	Nenhuma alteração
63	**-**	0,225	**Prostração/ letargia/ diminuição dos reflexos/ respiração acentuada/ diarréia**
64	**-**	0,115	**Prostração/ letargia/ diminuição dos reflexos/ diarreia**
65	-	0,32	Nenhuma alteração
66	-	0,26	Nenhuma alteração
67	**PF3**	3	**Prostração/ letargia/ diminuição dos reflexos/ morte**
68	**-**	10,84	**Prostração/ letargia/diminuição dos reflexos/ morte**
69	**-**	4,76	**Prostração/ letargia/ respiração acentuada**
70	**-**	0,11	**Prostração/ letargia/ diminuição dos reflexos**

(Continua)

Tabela 5. Respostas comportamentais individuais de camundongos Balb C injetados com diferentes frações do veneno de *P. nigriventer (Continuação).*

71	-	0,21	Nenhuma alteração
72	-	0,2	Nenhuma alteração
73	-	0,23	Nenhuma alteração
74	**-**	0,48	**Prostração/Letargia/ diminuição dos reflexos**
75	**-**	0,015	**Prostração/Letargia/ diminuição dos reflexos**
76	**-**	0,15	**Prostração/Letargia/ diminuição dos reflexos**
77	-	0,87	Nenhuma alteração
78	**-**	1,2	**Convulsão/ excitabilidade/ hipersalivação**
79/80	**-**	0,23	**Convulsão Clônica/ hipersalivação**
81/82	**-**	1,01	**Animais lambendo as patas acentuadamente/ Excitabilidade**
86	**-**	0,05	**Paralisia dos membros posteriores/ tremor/ convulsão/ morte**
(87/88)	**TX2-6**	0,3 µg	**Excitabilidade/ ereção**
90/91	**-**	0,8	**Hipersalivação/ morte**
92	-	0,45	Nenhuma alteração
94	**-**	0,5	**Ereção / morte**
95	**-**	0,3	**Diarréia/ ereção**
98+99	-	0,31	nenhuma alteração
100+101+102	-	0,8	nenhuma alteração

As frações ativas foram destacadas em amarelo.

Podemos visualizar na figura 7 a seguir, a ereção peniana (priapismo), causada pela injeção de 2,5% do material da fração 87/88, que contém a toxina Tx2-6, responsável por tal efeito em camundongos.

Figura 7. Ereção peniana (priapismo) em camundongos, causada pela injeção da fração 87/88 que contém a toxina TX2-6.

A partir dos resultados qualitativos observados, passamos a estudar as frações que alteraram o comportamento dos animais. As frações que não apresentaram alterações no comportamento não foram alvos de estudos neste trabalho.

4.5 Espectros de massas obtidos por LC/ESI-MS

As frações que apresentaram atividade farmacológica foram submetidas à análise das massas por LC/ESI-MS. A seguir são apresentadas (Tabela 6) as massas moleculares encontradas.

Tabela 6. Massas obtidas por LC/ESI-MS. As massas destacadas em amarelo representam massas aproximadas de peptídeos conhecidos, de acordo com a literatura. As massas em negrito representam os peptídeos que melhor se ionizaram em cada fração. A fração 86 possui dois perfis de massas diferentes, devido à análise de dois picos majoritários obtidos na cromatografia.

	Frações ativas da aranha *P. nigriventer*																		
	47	56/57	59	63	64	68	69	70	74	75	76	78	79/80	81/82	86	86	90/91	94	95
MASSAS MOLECULARES (Da)		3420	2420	2115							2445	2265	2335		2435	2555	2545	2210	4130
		3685	**3225**	2455							2585	2990	2705		2725	3835	2575	3850	5780
		4175	3275	3455							3095	3040	3045		**3655**	**5110**	3865	5130	9630
		4910	**4020**	3685							3670	3740	3505		4090	5285	**5150**	5780	11560
		5575	4080	4295							**3880**	**4055**	**4055**		5200	6390	5195	6410	14450
		6140	4825	4445							4125	4485	4160		**5455**	6815	**6370**	9630	17330
		6265	**5640**	5180							4890	4985	5000		7275	7660		11540	19270
		6655	6435	5215							**5155**	5380	5055		7315	8520		14450	20110
		6960	7255	5725							**5175**	**5970**	5240		8185			16670	21680
		7495	8055	**6135**							5630	**6175**	**5840**		8535			19240	27540
		8195	8190	6885							6065	6720	6090		9750			23110	27660
		9605	8870	6955							6440	6875	6930					25640	27700
		9835	9005	**7155**							6875	7615	6985					**28850**	**28850**
		9985	9685	7370							7245	8310	7295					**28910**	**28910**
				7715							7585	8960	7750					30070	30010
				8190							7735	9025	8420					34630	30090
				8590							8170	9065	8755					37340	31230
				9005							8485	9460	9175					38470	33720
				9830							9380		9770					39790	38550
				9895							9785		9970						

O sistema LC/ESI-MS não forneceu resultados significativos para as frações marcadas em cinza, apesar de estas apresentarem significativa absorção UV durante a cromatografia. Todos os espectros de massas referentes à identificação de peptídeos estão apresentados no anexo deste trabalho.

Na tabela 7 a seguir apresentamos os peptídeos encontrados nesse estudo, com massas aproximadas de peptídeos já publicados anteriormente, que podem indicar sua natureza, conforme a tabela 1 (Introdução).

Tabela 7. Massas moleculares de peptídeos do veneno da *Phoneutria nigriventer* encontradas nas frações ativas deste trabalho e caracterizadas por outros autores.

Toxinas (Peptídeos/Proteínas)	Massas Moleculares	Toxinas (Peptídeos/Proteínas)	Massas Moleculares
Tx 24A0C4	3679,28	Tx 2-1	5841,7
Tx 22A0C1	4079,88	Tx 3-5	5063,6
Tx 22C5	8854,99	Tx 4(6-1)	5250,55
Tx1	8597,72	Tx 27C4	4062,76
Tx 4(5-5)	5174,83	Pn 10C5	3673,3
Pn 4A	5184,43	Tx 2-5	5100,89
Pn 2-1A	6069,99	Tx 2-6	5288,03
Pn 3-3A	3873,34	Pn 3-6B	6370,33
Pn 4B	5625,03	Tx 30C3	5195,99
Tx 16C1	7577,41	Pn 16C3	14775,7
Tc 2-9	3742,1		

4.6 Purificação das frações ativas por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC- Preparativa)

Dentre as 20 frações ativas, três frações foram eleitas por apresentarem espectros de massas moleculares não atribuídas a peptídeos conhecidos (Frações 56/57 e 78) ou por apresentarem efeitos farmacológicos de interesse (Fração 94).

As frações 56/57, 78 e 90 a 95 foram submetidas à cromatografia de fase reversa (RP-HPLC), utilizando um gradiente específico para cada fração, como descrito na metodologia (Seção 3.2.2).

A purificação da fração 56/57 revelou 8 picos majoritários, colhidos em tubos individuais e numerados de 1 a 65, como pode ser observado na figura 8.

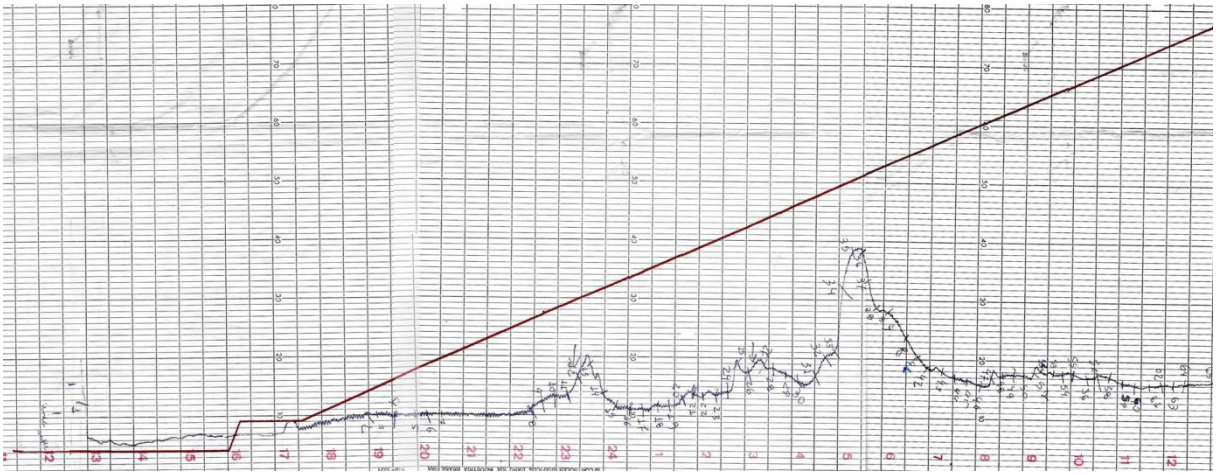

Figura 8. Cromatograma da fração 56/57 obtida por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC - preparativa.

A cromatografia da fração 78 revelou 10 picos majoritários, colhidos em 42 tubos no total, figura 9.

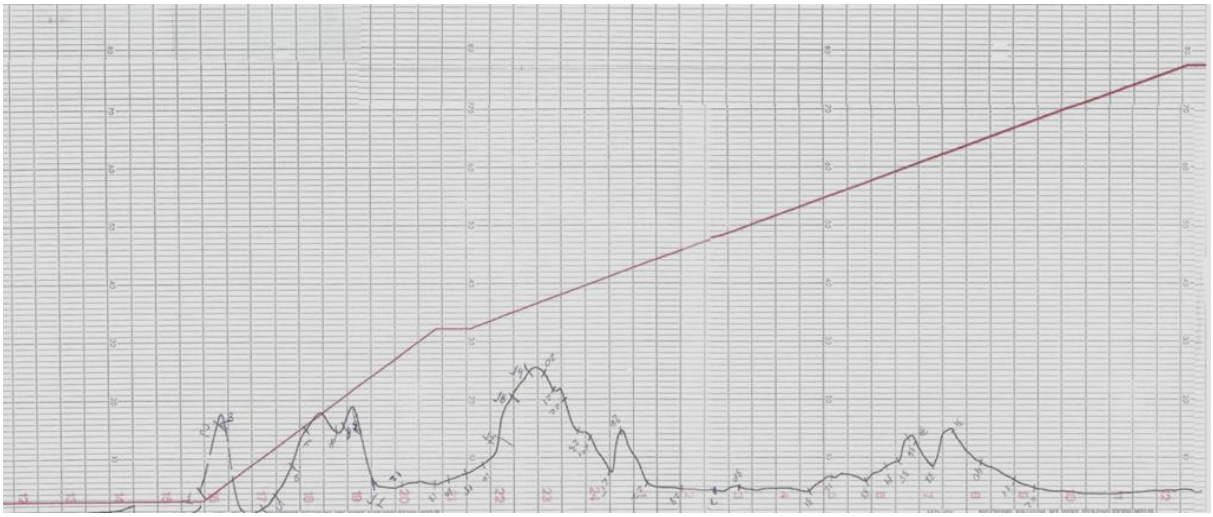

Figura 9. Cromatograma da fração 78 obtida por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC - preparativa.

A fração 94 causou ereção nos camundongos, em semelhança ao efeito observado da fração 87/88, que contém a toxina Tx2-6, diferindo pelo óbito ocorrido em aproximadamente 2 horas e 30 minutos. Por serem frações colhidas em diferentes tempos de retenção, passamos a investigar a fração 94 a fim de identificarmos a toxina responsável pelo efeito. As frações 90 a 95 foram reunidas para obter maior quantidade de material proteico.

A fração (90-95) resultou em 4 picos majoritários e as frações foram colhidas em tubos individuais, numerados de 1 a 29, figura 10.

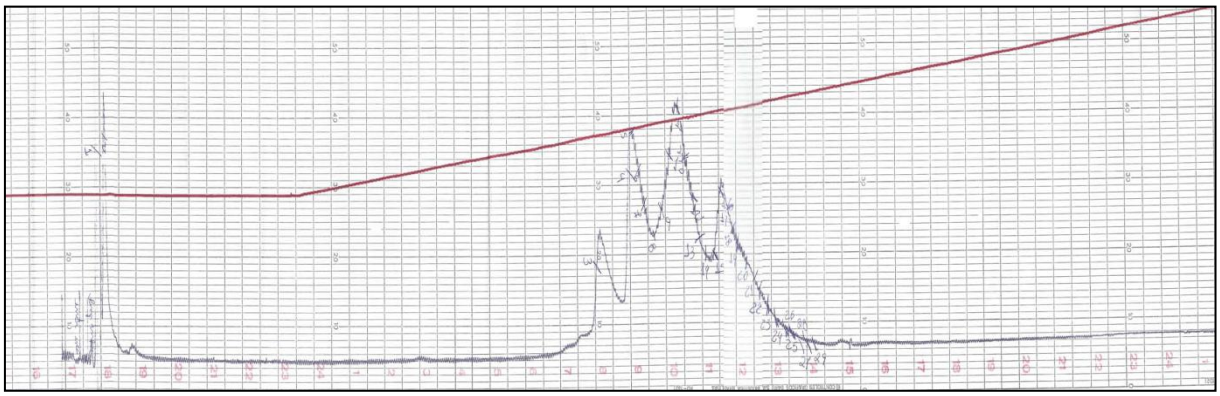

Figura 10. Cromatograma da fração 90-95 obtida por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC - preparativa.

4.7 Análise comportamental de camundongos Balb C injetados com frações ativas do veneno de *P. nigriventer*

A partir das repurificação das frações eleitas, submetemos os picos majoritários à análise comportamental. Os sintomas observados estão reunidos na tabela 6 a seguir.

Tabela 8. Respostas comportamentais individuais de camundongos Balb C injetados com diferentes frações do veneno de *P. nigriventer.*

Frações		Dose µg	Efeitos observados
56/57	12	0,1	Letargia, animais sem reação
	26	0,08	Excitabilidade, animais se coçando constantemente
	32	0,05	Nenhuma alteração
	35	0,02	Nenhuma alteração
78	1	0,012	Nenhuma alteração
	2	0,07	Nenhuma alteração
	3	0,085	Nenhuma alteração
	4	0,032	Nenhuma alteração
	5	0,015	Nenhuma alteração
	6	0,0013	Nenhuma alteração
	7	0,0025	Nenhuma alteração
	8	0,006	Nenhuma alteração
	9	0,003	Nenhuma alteração
	10	0,003	Nenhuma alteração

(Continua)

Tabela 8. Respostas comportamentais individuais de camundongos Balb C injetados com diferentes frações do veneno de *P. nigriventer (Continuação).*

90-95	3	0,0025	Nenhuma alteração
	4	0,012	Nenhuma alteração
	5	0,007	Nenhuma alteração
	11	0,13	Ereção (pênis arroxeado e pouco exposto)
	15	0,01	Nenhuma alteração
	16	0,0095	Nenhuma alteração
	20	0,0025	Nenhuma alteração

As frações ativas foram destacadas em amarelo.

Como pode ser observada na tabela 8, a fração 56/57-12 causou letargia e diminuição da reatividade nos camundongos, enquanto a 56/57-26 causou excitabilidade e coceira nos animais.

A fração 90-95/11 causou ereção parcial (pênis arroxeado e pouco exposto) em camundongos, após a injeção de 5% do material obtido nesta etapa da purificação, o que corresponde à 0,13 µg de proteina.

Em outro estudo deste laboratório, realizado por Ravelli (Troncone *et al.*, 2011) a dose mínima efetiva da toxina Tx2-6, capaz de causar ereção completa (priapismo) em camundongos foi determinada, correspondendo a 0,3 µg/kg. De acordo com o mesmo estudo, o sintoma de priapismo foi classificado em 4 categorias: base do pênis arroxeada; pênis arroxeado e pouco exposto; pênis ereto e quase totalmente exposto; pênis muito ereto (ereção completa) e completamente exposto. Neste trabalho, após a injeção de 0,13 µg de proteina da fração 90-95/11 foi possível observar o pênis arroxeado e pouco exposto, sugerindo que apenas parte da proteina presente corresponde a Tx2-6.

As frações numeradas de 1 a 10, a partir da purificação da fração 78, não reproduziram os efeitos (convulsão, excitabilidade e hipersalivação) observados anteriormente ao processo cromatográfico.

As frações, 56-12; 56-26 e 90-95/11, foram submetidas à análise de massas a fim de identificarmos os peptídeos responsáveis pelas ações.

4.8 Espectro de massa obtido por LC/ESI-MS da fração 90-95/11 ativa em camundongos

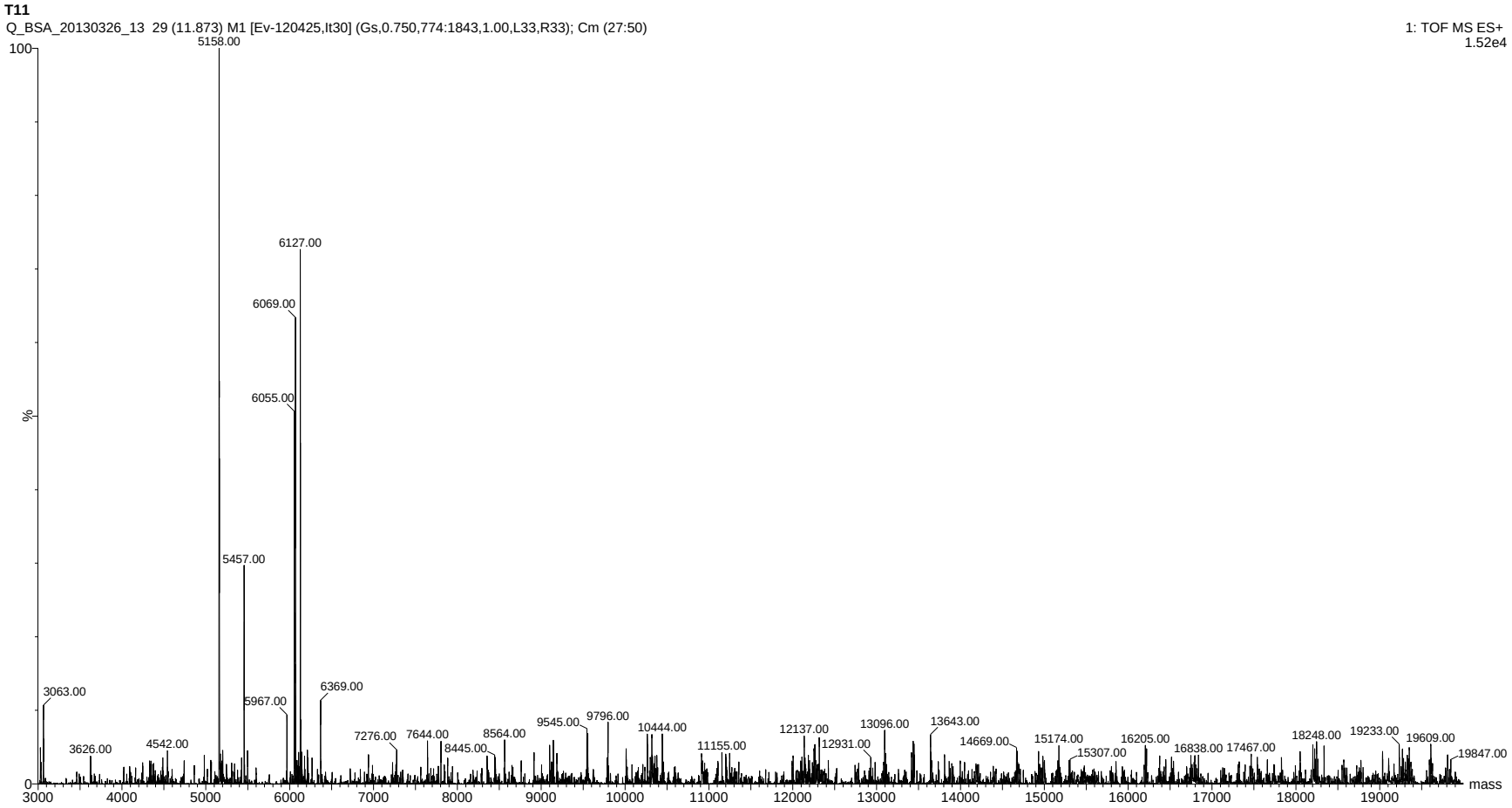

Figura 11. Espectro de massas por LC-ESI/MS da fração 90-95/11 contendo um peptídeo de massa molecular de 5.158 Da que causou ereção em camundongos.

A massa molecular obtida através da análise por LC/ESI-MS foi de 5.158 Da (fig. 11) diferindo 130 Da da massa molecular da Tx2-6, com massa molecular de 5288,03 Da. Essa diferença pode ser decorrente de uma possível clivagem de um resíduo de lisina (K), com massa molecular de 128,174 Da, na porção carbóxi-terminal da estrutura primária da toxina.

O sistema LC/ESI-MS não forneceu resultados significativos para as frações 56-12 e 56-26, apesar de estas apresentarem significativa absorção UV durante a cromatografia.

5 DISCUSSÃO

Os avanços atuais em abordagens ômicas, tais como a proteômica e peptidômica, têm propiciado uma visão mais clara sobre a complexidade da composição dos venenos e outras secreções tóxicas de animais (Moura-Da-Silva *et al.*, 1996; Kini e Doley, 2010; Kordis, 2011; Moura-Da-Silva *et al.*, 2011; Vaiyapuri *et al.*, 2011). Variações no veneno da aranha *P. nigriventer* têm sido relatadas, determinadas pelo sexo, tamanho, idade, alimentação e fatores geográficos, já que o animal tem que se adaptar ao ambiente em que está inserido (Herzig, John Ward e Ferreira Dos Santos, 2002; Herzig, Ward e Dos Santos, 2004; Zelanis *et al.*, 2010). Nesse projeto, nós procuramos identificar peptídeos ativos na peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, interessantes do ponto de vista farmacológico, que ainda não foram descritos na literatura. Essa busca foi realizada através da combinação de diferentes ferramentas bioquímicas e farmacológicas, como a cromatografia de fase reversa (RP-HPLC), espectrometria de massas, eletroforese unidimensional, zimografia e busca em bancos de dados, por peptídeos já descritos por outros autores.

Quando o veneno bruto foi submetido à eletroforese unidimensional, em condições redutoras e não redutoras, perfis distintos foram observados, uma vez que as proteínas/peptídeos, após a redução das pontes dissulfeto, apresentam maior dificuldade de migração eletroforética através da malha do gel de SDS-poliacrilamida, sendo possível revelar com maior precisão, os peptídeos de menor massa molecular, como as bandas 13-15 na faixa de 5 a 14 kDa. Além disso, o perfil da eletroforese em condições não-redutoras, revelou bandas na faixa de 116,3 kDa que não foram visíveis em condições redutoras, o que pode ser explicado devido a interação de diferentes cadeias polipeptídicas por pontes dissulfeto, formando uma banda única (amostra não-reduzida).

De uma maneira geral, conseguimos identificar, através desse procedimento, proteínas na faixa de 5 a 120 kDa. De acordo com Richardson (Richardson *et al.*, 2006) os componentes peptídicos com massa molecular abaixo de 4 kDa, não são bem resolvidos por essa técnica.

As bandas obtidas do gel de SDS-poliacrilamida, indicadas por setas na figura 2 da seção 4.1.1, foram recortadas e submetidas ao procedimento de digestão tripsínica *in gel* e subsequente análise por LC-MS/MS para identificarmos as proteínas/ peptídeos constituintes desse veneno. No total, 15 bandas foram recortadas e identificadas pelo procedimento descrito. Proteínas e peptídeos de diferentes classes de toxinas presentes no veneno da *Phoneutria nigriventer* foram identificadas: Techylectin-like protein; U_{10} – ctenitoxin- Pk1a (toxina presente na peçonha da aranha *Phoneutria Keyserlingi*); U_{21} – ctenitoxin – Pn1a; hemocianinas (proteína constituinte da hemolinfa de aracnídeos) e proteínas diversas cuja função biológica ainda não é conhecida.

A proteína techylectin-like, única em venenos de aranhas, compartilha 55% de identidade com a techylectin-like 5A do caranguejo ferradura, *Tachypleus tridentatus*, e portanto pode ter propriedades similares como a capacidade de aglutinar eritrócitos humanos, bem como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A techylectin-like possui massa molecular de 25.776,81 Da, com duas pontes dissulfeto e 225 resíduos de aminoácidos (Richardson *et al.*, 2006). A banda de número 3, que contém a techylectin-like, situa-se na faixa de 50 kDa, porém quando reduzimos as pontes dissulfeto, a mesma proteína foi identificada na banda de n°11, na faixa de 30 kDa. Este resultado sugere a presença de dímeros desta toxina, unidos por pontes dissulfeto.

A proteína identificada na banda 4 e 7, na faixa de 50 kDa, possui dois fragmentos peptídicos (Tabela A1, anexo) homólogos à toxina da aranha *Phoneutria keyserlingi*, denominada como U_{10} – ctenitoxin- Pk1a. De acordo com Richardson (Richardson *et al.*, 2006), a toxina U_{10} – ctenitoxin- Pk1a, possui massa molecular de 16.592 Da e 147 resíduos de aminoácidos. Nas bandas de n° 6, 11 e 12, na faixa de 30 kDa, identificamos a toxina U_{21} – ctenitoxin – Pn1a, também descrita como proteinase Pn47, que possui a capacidade de hidrolisar gelatina e succinil-caseína. A U_{21} – ctenitoxin – Pn1a possui 245 resíduos de aminoácidos, três pontes dissulfeto e massa molecular de 26.776 Da (Richardson *et al.*, 2006).

As toxinas de menor massa molecular, identificadas nas bandas 13, 14 e 15, como U20-ctenitoxin-Pn1a (também conhecida como Tx2-1), Delta-ctenitoxin-Pn2a (conhecida como Tx2-6), Omega-ctenitoxin-Pn3a (Tx3-4 ou PF3) e Kappa-ctenitoxin-

Pn1a (Tx3-1) possuem um maior número de pontes dissulfeto, 5, 5, 7 e 4 respectivamente (Cordeiro *et al.*, 1993; Cassola *et al.*, 1998; Kalapothakis, Penaforte, Beirao*, et al.*, 1998; Matavel *et al.*, 2009). Não foi possível observar essas toxinas em condições não redutoras, devido à maior velocidade de migração eletroforética.

Outros peptídeos apresentaram homologia às diferentes subunidades de hemocianinas, presentes na hemolinfa de outras aranhas, como a *Cupiennius salei* (Subunidades 1 a 5) e *Nephila inaurata madagascariensis* (Subunidade G). Muitos desses peptídeos têm sido reconhecidos como componentes importantes do sistema imune inato em uma variedade de organismos, por possuírem intensa atividade antimicrobiana, e tem sido isolados e caracterizados em plantas e animais, incluindo insetos, moluscos, crustáceos, anfíbios, pássaros, peixes e mamíferos (Hoffmann e Hetru, 1992; Hetru e Bulet, 1997; Haeberli *et al.*, 2000; Silva, Daffre e Bulet, 2000; Kuhn-Nentwig, 2003) (Hoffmann e Hetru, 1992; Boman, 1995; Hetru e Bulet, 1997; Haeberli *et al.*, 2000; Silva, Daffre e Bulet, 2000; Kuhn-Nentwig, 2003). Podemos sugerir que a presença dessas hemocianinas na amostra analisada, se deve a uma possível contaminação no processo de extração do veneno, procedimento descrito na seção 3.1.

Como alternativa à análise de digestão tripsínica *in gel*, submetemos o veneno da aranha *P. nigriventer* à digestão tripsínica em solução, permitindo identificar um número maior de proteínas/peptídeos. Além das proteínas identificadas e mencionadas anteriormente, identificamos duas proteínas, denominadas como Delta-ctenitoxin-Pn2c (Tx2-5) e U_{24}-ctenitoxin-Pn1a (Pn15C3). De acordo com Rezende (Rezende Junior *et al.*, 1991) a toxina Tx2-5 possui 5 pontes dissulfeto, 82 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 5.116,6 Da. A proteína Pn15C3 possui 128 aminoácidos e uma massa molecular maior de 14.778,05 (Richardson *et al.*, 2006). Outros peptídeos apresentaram homologia às diversas sequências de peptídeos de outros organismos, como apresentado na tabela 4 da seção 4.1.1 e tabela A2 (anexo A). A falta de um banco de dados mais completo para a aranha *P. nigriventer* foi uma das principais dificuldades encontradas neste estudo proteômico.

Com o estudo da atividade proteolítica do veneno da aranha *P. nigriventer,* foi possível observar uma intensa atividade gelatinolítica na faixa de 14 kDa a 25 kDa. A fim de caracterizarmos a natureza dessas proteases, utilizamos inibidores enzimáticos de serinoproteases (PMSF) e um inibidor clássico de metaloproteases (EDTA), como observado na figura 3. Na região de 14 kDa, não foi possível inibir a ação gelatinolítica dessas proteases, porém na região de 25 kDa, após incubação com PMSF, observamos uma discreta redução dessa atividade, levando a crer que se trata de uma serinoprotease.

A atividade proteolítica desse veneno foi estudada por outros autores, resultando na descrição de duas proteinases, denominadas como PN44 e PN47 (massa molecular de 26.776 Da) (Richardson *et al.*, 2006). Como mencionado anteriormente, identificamos a PN47 nas bandas 6, 11 e 12 da eletroforese unidimensional (fig. 2). A sequência de aminoácidos da PN 47 e a sequência N-terminal da PN44, mostram que ambas proteínas são serino proteases, em concordância com os nossos resultados.

Embora nos relatos de acidentes causados pelas aranhas do gênero *Phoneutria,* não mencionarem necrose, este é um efeito comum em acidentes por outras aranhas, como a *Loxosceles*. Existem sugestões que as enzimas proteolíticas são os agentes causadores dessas dermonecroses, de maneira secundária (Atkinson e Wright, 1992; Feitosa *et al.*, 1998; Young e Pincus, 2001). Outros pesquisadores do Instituto Butantan têm demonstrado que essas proteases estão envolvidas no desenvolvimento de hiperalgesia causada pelo veneno da *P. nigriventer,* mediada pelas taquicininas periféricas e receptores de aminoácidos excitatórios (Zanchet e Cury, 2003).

Os casos de envenenamento por *Phoneutria nigriventer* são complexos, com efeitos locais e sistêmicos, tais como intensa dor, paralisia espástica, disfunção autonômica, convulsões, priapismo, taquicardia, disturbos visuais, fasciculação, prurido e morte em acidentes mais graves (Schenberg e Lima, 1966). Muitos desses efeitos são ocasionados por toxinas específicas, direcionadas contra uma grande variedade de alvos farmacológicos, fazendo delas importantes agentes no estudo de novas moléculas com potencial aplicação na medicina e na agricultura (Troncone *et al.*, 1995b; Lewis e Garcia, 2003).

Na busca de novos peptídeos ativos da aranha *P. nigriventer,* submetemos a amostra ao fracionamento inicial por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC-Preparativa), e subsequente análise comportamental, conforme descrito na metodologia, seção 3. Diversas frações foram obtidas e avaliamos a integridade do veneno, identificando duas toxinas conhecidas, a Tx 3-4 (Fração 67) e a Tx 2-6 (Fração 87/88), com massas moleculares de 8.360 e 5.290 Da, respectivamente.

Ao analisarmos nossas amostras por espectrometria de massas (LC/ESI-MS) observamos diversas massas cuja identidade não pode ser correlacionada com as massas de nenhum peptídeo descrito em venenos até o momento além de massas correspondentes a peptídeos conhecidos do veneno da *P. nigriventer*. A variabilidade em venenos se deve a fatores intrínsecos e extrínsecos mencionados, além de outras possíveis causas de heterogeneidade em amostras de veneno como a possível degradação ou quebra por proteases endógenas (Richardson *et al.*, 2006), que fragmentam as estruturas primárias dos peptídeos, dificultando a identificação apenas pela massa molecular encontrada.

Diversas alterações fisiológicas foram observadas após a injeção de diferentes frações do veneno da *P. nigriventer.* Os principais sintomas descritos foram: excitabilidade, hipersalivação, tremor, prostração, letargia, diminuição dos reflexos, diarreia, respiração acentuada, convulsão, convulsão clônica, paralisia dos membros, ereção, animais piscando acentuadamente, animais lambendo as patas acentuadamente e morte.

Passamos a discutir os peptídeos possivelmente encontrados nesse estudo (tabela 7, seção 4.3) e já publicados anteriormente. Muitos componentes peptídicos encontrados, não foram estudados farmacologicamente.

De acordo com Richardson (Richardson *et al.*, 2006) a toxina Tx24A0C4, também conhecida como U_{13}–ctenitoxin–Pn1c, possui sugestiva atividade inseticida com efeitos tóxicos em moscas domésticas, mas não em camundongos (mamíferos). O alvo molecular desta toxina ainda é desconhecido, bem como a toxina Tx22A0C1 (U_{14}–ctenitoxin–Pn1a).

A toxina Tx22C5 (U_{20}–ctenitoxin–Pn1a) possui similaridade quanto a sequência de outras toxinas da *P. nigriventer* como a PnTx1 e PnTx3-4 (Richardson *et al.*, 2006). A Tx1 (μ-ctenitoxin-Pn1a) inibe reversivelmente os canais de sódio

neuronais dependentes de voltagem (Na 1.2) e não tem efeitos sobre as correntes de sódio quando aplicado a um potencial de ação hiperpolarizado. Em camundongos, a toxina induz sintomas excitatórios, paralisia espástica e morte. A estrutura primária da toxina tem forte homologia com a U_5-ctenitoxin-Pk1a (94% de identidade) e U_5-ctenitoxin-Pk1b (93% de identidade), ambas presentes na peçonha da *Phoneutria keyserlingi* (Diniz *et al.*, 1990; Rezende Junior *et al.*, 1991; Diniz *et al.*, 1993; Mattiello-Sverzut *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1999; Diniz *et al.*, 2006; Martin-Moutot, Mansuelle*, et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2006).

A toxina denominada Tx4(5-5), também conhecida como Γ- ctenitoxin-Pn1a, inibe reversivelmente o receptor de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) e tem pequeno ou nenhum efeito sobre o receptor cainato, alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico (AMPA) – ou ácido gama-aminobutírico (GABA). A toxina inibe a captação de glutamato de sinaptosomas de cérebro de rato e possui intensa atividade inseticida para moscas (*musca domestica),* baratas (*Periplaneta americana*), e grilos (*Acheta domesticus*). Não possui efeito quando injetada (290 pmol/g) em camundongos, intra cerebro-ventricular (De Figueiredo *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006).

De acordo com Kalapothakis (Kalapothakis, Penaforte, Beirao*, et al.*, 1998) a toxina Pn2-1A, também descrita como U_2-ctenitoxin-Pn1b, não possui função nem alvos moleculares determinados. Sua estrutura primária possui forte homologia (92% de identidade) com a U_7-ctenitoxin-Pk1a da aranha *P. keyserlingi.* Outra toxina homóloga, U_2-ctenitoxin-Pn1a, possui ação inseticida e letalidade para vertebrados.

As toxinas Pn3-3A (U_9-ctenitoxin-Pn1a), Tx16C1 e Pn10C5 (U_{23} – ctenitoxin – Pn1a) não possuem efeitos visiveis em camundongos ou insetos. Suas funções e alvos moleculares ainda não são conhecidos (Cardoso *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006). A toxina denominada Tx2-9 (U_5-ctenitoxin-Pn1a) é conhecida por causar elevação de cauda, coceira e redução na mobilidade de comundongos. Possui ação inseticida para moscas (*musca domestica*) tanto na fase larval quanto na adulta (Cordeiro *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 2006).

A neurotoxina conhecida como Tx2-1 causa coceira, lacrimação, hipersalivação, sudorese, agitação seguida por paralisia espástica dos membros posteriores e anteriores e morte em camundongos. A Tx2-1 possui ação inseticida para moscas domésticas tanto na fase larval quanto adulta e sua sequência primária

tem forte homologia (94% de identidade) com a toxina U7-ctenitoxin-Pk1a da aranha *P. keyserlingi* (Cordeiro *et al.*, 1992; Kalapothakis, Penaforte, Beirao*, et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 2006).

A toxina Tx3-5 (U_7-ctenitoxin- Pn1a) é conhecida por causar paralisia nos membros posteriores e gradual reduções nos movimentos e agressividade durante 24 horas (Cordeiro *et al.*, 1993; Cardoso *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006).

A toxina Tx4(6-1), também conhecida como δ-ctenitoxin-Pn1a, demonstra alta toxicidade para insetos como a Mosca doméstica e baratas, mas não apresenta qualquer efeito quando injetados intracerebroventricularmente em camundongos (Figueiredo *et al.*, 1995; Penaforte *et al.*, 2000; De Lima *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2006). Para a toxina Tx27C4 (U_{17} – ctenitoxin – Pn1a) foi sugerido causar paralisia espástica e morte em camundongos, mas o alvo molecular ainda é desconhecido (Richardson *et al.*, 2006).

As toxinas Tx2-5 (δ- ctenitoxin – Pn2b) e Tx2-6 (δ- ctenitoxin – Pn2a) com forte homologia (87% de identidade) inibem a inativação de canais de sódio voltagem dependente sendo letais para camundongos e moscas (Rezende Junior *et al.*, 1991; Cordeiro *et al.*, 1992).

As toxinas denominadas como Pn 3-6B (U_{12}-ctenitoxin-Pn1a), Tx 30C3 (U_{18}-ctenitoxin-Pn1a) e Pn 16C3 (U13-ctenitoxin-Pn1a) não possuem ainda alvos moleculares e funções determinadas. A Pn 3-6B tem a sequência primária homóloga (89% de identidade) à U8-ctenitoxin-Pr1a da aranha *Phoneutria reidyi.* Segundo Richardson (Richardson *et al.*, 2006) a Tx 30C3 causa paralisia em camundongos após injeção intracerebroventricular e a Pn 16C3 possui atividade inseticida.

Embora a maioria das massas moleculares encontradas nesse estudo não apresente concordância exata com massas de peptídeos já descritos, é importante mencionar a discrepância das massas publicadas por outros grupos. Como exemplo, podemos citar a própria Tx2-6 com valores distintos de massas moleculares (5.288,03 e 5.297,71) apresentados na tabela 1 (Introdução) por vezes, pelo mesmo grupo de pesquisa.

As estratégias de purificação adotadas neste trabalho, baseadas nas características hidrofóbicas das moléculas, não foram completamente satisfatórias, resultando em significativa perda de material proteico, dificultando as análises comportamentais e análises de massas moleculares subsequentes, sugerindo outras

possíveis estratégias de purificação das frações como a cromatografia por troca iônica. Segundo as estratégias aplicadas por Richardson (Richardson *et al.*, 2006) os picos obtidos pelo fracionamento inicial por RP-HPLC, são submetidos à purificação por troca catiônica (FPLC), obtendo frações mais homogêneas, com uma média de 3 peptídeos/proteínas por fração.

Finalmente, a grande variedade de toxinas presentes neste veneno amplia as perspectivas de descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico ou aplicação experimental. Assim, esperamos que os dados reportados neste trabalho possam servir de alicerce para projetos futuros contibuindo com a bioprospecção e desenvolvimento de novos fármacos.

6 CONCLUSÕES

1. O trabalho de “screening” do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* permitiu revisar os principais efeitos comportamentais produzidos pelas frações do veneno;

2. Observamos através da técnica de zimografia a presença de proteases, na faixa de 14 kDa, com intensa atividade gelatinolítica, distintas das metalo-proteinases e serinoproteases, que ainda não foram devidamente estudadas;

3. Algumas toxinas foram identificadas pela massa molecular e pelo efeito farmacológico, como a Tx 2-6 e a PF3.

4. Conseguimos correlacionar, através das massas obtidas, cerca de 21 peptídeos ativos em uma estimativa de mais de 150 peptídeos/proteínas constituintes desse veneno, o que nos estimula a melhor elucidar e caracterizar o veneno da *P. nigriventer.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, E.; VILLANOVA, F.; BORRA, P.; LEITE, K.; TRONCONE, L.; CORTEZ, I.; MESSINA, L.; PARANHOS, M.; CLARO, J.; SROUGI, M. Penile erection induced in vivo by a purified toxin from the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer*. **Brit. J. Urol. Int.,** v. 102, n. 7, p. 835-7, 2008.

ARAUJO, D. A.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; BEIRÃO, P. S. Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. **N-S. Arch. Pharmacol.,** v. 347, n. 2, p. 205-8, 1993.

ATKINSON, R. K.; WRIGHT, L. G. The involvement of collagenase in the necrosis induced by the bites of some spiders. **Comp. Biochem. Physiol. C.,** v. 102, n. 1, p. 125-8, 1992.

BARRIO, A.; VITAL-BRAZIL, O. Ein newes verfahren der giftentnahme bei spinnen. **Experientia,** v. 6, p. 112-114, 1949

BENTO, A. C.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, B.; DE NUCCI, G. Identification of a new vascular smooth muscle contracting polypeptide in *Phoneutria nigriventer* spider venom. **Biochem. Pharmacol.,** v. 46, n. 6, p. 1092-5, 1993.

BOMAN, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annu. Rev. Immunol.,** v. 13, p. 61-92, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.,** v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCARETCHI, F.; DRAGOSAVAC, S.; VIEIRA, R. J. Acute exposure to imidazoline derivatives in children. **J. Pediatr.** v. 79, n. 6, p. 519-24, 2003.

***De acordo com:**
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CASSOLA, A. C.; JAFFE, H.; FALES, H. M.; CASTRO, A. S.; MAGNOLI, F.; CIPOLLA-NETO, J. omega-phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *phoneutria nigriventer*. **Pflugers Arch.,** v. 436, n. 4, p. 545-552, 1998.

CORDEIRO, M. D. N.; DE FIGUEIREDO, S. G.; VALENTIM, A. D. C.; DINIZ, C. R.; VON-EICKSTEDT, V. R.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon,** v. 31, n. 1, p. 35-42, 1993.

CORDEIRO, M. D. N.; DINIZ, C. R.; VALENTIM, A. D. C.; VON-EICKSTEDT, V. R.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. **FEBS Lett.,** v. 310, n. 2, p. 153-6, 1992.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nat. Biotechnol.,** v. 26, n. 12, p. 1367-72, 2008.

CRAIG, R.; BEAVIS, R. C. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. **Bioinformatics,** v. 20, n. 9, p. 1466-7, 2004.

DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; OWNBY, C. L. Sequence analysis of Lys49 phospholipase A2 myotoxins: a highly conserved class of proteins. **Toxicon,** v. 34, n. 11-12, p. 1237-1242, 1996.

DE CASTRO JUNIOR, C. J.; PINHEIRO, A. C.; GUATIMOSIM, C.; CORDEIRO, M. N.; SOUZA, A. H.; RICHARDSON, M.; ROMANO-SILVA, M. A.; PRADO, M. A.; GOMEZ, M. V. Tx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis. **Neurosc. Lett.,** v. 439, n. 2, p. 170-2, 2008.

DE FIGUEIREDO, S. G.; DE LIMA, M. E.; NASCIMENTO, C. M.; DINIZ, C. R.; PATTEN, D.; HALLIWELL, R. F.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurones. **Toxicon,** v. 39, n. 2-3, p. 309-317, 2001.

DE LIMA, M. E.; STANKIEWICZ, M.; HAMON, A.; DE FIGUEIREDO, S. G.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.; PELHATE, M. The toxin Tx4(6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na(+) current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3. **J. Insect. Physiol.,** v. 48, n. 1, p. 53-61, 2002.

DE SOUZA, A. H.; CASTRO, C. J., JR.; RIGO, F. K.; DE OLIVEIRA, S. M.; GOMEZ, R. S.; DINIZ, D. M.; BORGES, M. H.; CORDEIRO, M. N.; SILVA, M. A.; FERREIRA, J.; GOMEZ, M. V. An Evaluation of the Antinociceptive Effects of Phalpha1beta, a Neurotoxin from the Spider *Phoneutria nigriventer*, and omega-Conotoxin MVIIA, a Cone Snail Conus magus Toxin, in Rat Model of Inflammatory and Neuropathic Pain. **Cell. Mol. Neurobiol.,** 2012.

DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. D. N.; JUNOR, L. R.; KELLY, P.; FISCHER, S.; REIMANN, F.; OLIVEIRA, E. B.; 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.,** v. 263, n. 2, p. 251-3, 1990.

DINIZ, M. R.; PAINE, M. J.; DINIZ, C. R.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. 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.,** v. 268, n. 21, p. 15340-2, 1993.

DINIZ, M. R.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M.; NASCIMENTO CORDEIRO, M.; PIMENTA, A. M.; DE LIMA, M. E.; DINIZ, C. R. Functional expression and purification of recombinant Tx1, a sodium channel blocker neurotoxin from the venom of the Brazilian "armed" spider, *Phoneutria nigriventer*. **Prot. Expres. Purif.,** v. 50, n. 1, p. 18-24, 2006.

DOS SANTOS, R. G.; VAN-RENTERGHEM, C.; MARTIN-MOUTOT, N.; MANSUELLE, P.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; MORI, Y.; DE LIMA, M. E.; SEAGAR, M. *Phoneutria nigriventer* omega-phonetoxin IIA blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with omega-conotoxin-binding sites. **J. Biol. Chem.,** v. 277, n. 16, p. 13856-13862, 2002.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C.; GRANER, E.; MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon,** v. 36, n. 7, p. 1039-51, 1998.

FIGUEIREDO, S. G.; GARCIA, M. E.; VALENTIM, A. C.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **Toxicon,** v. 33, n. 1, p. 83-93, 1995.

GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; GUATIMOSIM, C.; PRADO, M. A. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. **Cell. Mol. Neurobiol.,** v. 22, n. 5-6, p. 579-588, 2002.

GUATIMOSIM, C.; ROMANO-SILVA, M. A.; CRUZ, J. S.; BEIRAO, P. S.; KALAPOTHAKIS, E.; MORAES-SANTOS, T.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; GOMEZ, M. V.; PRADO, M. A. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. **Br. J. Pharmacol.,** v. 122, n. 3, p. 591-597, 1997.

HAEBERLI, S.; KUHN-NENTWIG, L.; SCHALLER, J.; NENTWIG, W. Characterisation of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). **Toxicon,** v. 38, n. 3, p. 373-80, 2000.

HANNA, S. L.; SHERMAN, N. E.; KINTER, M. T.; GOLDBERG, J. B. Comparison of proteins expressed by Pseudomonas aeruginosa strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microbiology,** v. 146 (Pt 10), p. 2495-508, 2000.

HERZIG, V.; JOHN WARD, R.; FERREIRA DOS SANTOS, W. Intersexual variations in the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891). **Toxicon,** v. 40, n. 10, p. 1399-406, 2002.

HERZIG, V.; WARD, R. J.; DOS SANTOS, W. F. Ontogenetic changes in *Phoneutria nigriventer* (Araneae, Ctenidae) spider venom. **Toxicon,** v. 44, n. 6, p. 635-40, 2004.

HETRU, C.; BULET, P. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. **Meth. Mol. Biol.,** v. 78, p. 35-49, 1997.

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Anal. Biochem.,** v. 102, n. 1, p. 196-202, 1980.

HOFFMANN, J. A.; HETRU, C. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. **Immunol. Today,** v. 13, n. 10, p. 411-5, 1992.

KALAPOTHAKIS, E.; PENAFORTE, C. L.; BEIRAO, P. S.; ROMANO-SILVA, M. A.; CRUZ, J. S.; PRADO, M. A.; GUIMARAES, P. E.; GOMEZ, M. V.; PRADO, V. F. Cloning of cDNAS encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon,** v. 36, n. 12, p. 1843-1850, 1998.

KALAPOTHAKIS, E.; PENAFORTE, C. L.; LEAO, R. M.; CRUZ, J. S.; PRADO, V. F.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; ROMANO-SILVA, M. A.; PRADO, M. A.; GOMEZ, M. V.; BEIRAO, P. S. Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*). **Toxicon,** v. 36, n. 12, p. 1971-1980, 1998.

KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **Br. J. Anaesth.,** v. 74, n. 3, p. 319-27, 1995.

KEYSERLING, E. G. **Die spinnen Amerikas.** Nurnberg: Verlag von Bauer, 1891.

KINI, R. M.; DOLEY, R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. **Toxicon,** v. 56, n. 6, p. 855-67, 2010.

KLEIFELD, O.; DOUCET, A.; PRUDOVA, A.; AUF DEM KELLER, U.; GIOIA, M.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; OVERALL, C. M. Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. **Nature protocols,** v. 6, n. 10, p. 1578-611, 2011.

KORDIS, D. Extensive intron gain in the ancestor of placental mammals. **Biology direct,** v. 6, p. 59, 2011.

KUHN-NENTWIG, L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. **Cel. Mol. L. Scie.,** v. 60, n. 12, p. 2651-68, 2003.

KUHN-NENTWIG, L.; SCHALLER, J.; NENTWIG, W. Purification of toxic peptides and the amino acid sequence of CSTX-1 from the multicomponent venom of *Cupiennius salei* (Araneae:Ctenidae). **Toxicon,** v. 32, n. 3, p. 287-302, 1994.

KUSHMERICK, C.; KALAPOTHAKIS, E.; BEIRAO, P. S.; PENAFORTE, C. L.; PRADO, V. F.; CRUZ, J. S.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; GOMEZ, M. V.; ROMANO-SILVA, M. A.; PRADO, M. A*. Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K+ currents controlling Ca2+ oscillation frequency in GH3 cells. **J. Neurochem.,** v. 72, n. 4, p. 1472-1481, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature,** v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LEAO, R. M.; CRUZ, J. S.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; BEIRAO, P. S. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. **Neuropharmacology,** v. 39, n. 10, p. 1756-1767, 2000.

LEITE, K. R.; ANDRADE, E.; RAMOS, A. T.; MAGNOLI, F. C.; SROUGI, M.; TRONCONE, L. R. *Phoneutria nigriventer* spider toxin Tx2-6 causes priapism and death: A histopathological investigation in mice. **Toxicon,** v. 60, n. 5, p. 797-801, 2012.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Rev. Drug disc.,** v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon,** v. 26, n. 9, p. 759-72, 1988.

MARANGONI, S.; BORGES, N. C.; MARANGONI, R. A.; ANTUNES, E.; VIEIRA, C. A.; NOVELLO, J. C.; DOMONT, G. B.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, B.; DE NUCCI, G. Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. **Toxicon,** v. 31, n. 4, p. 377-84, 1993.

MARTIN-MOUTOT, N.; HARO, L.; SANTOS, R. G.; MORI, Y.; SEAGAR, M. *Phoneutria nigriventer* omega-Phonetoxin IIA: a new tool for anti-calcium channel autoantibody assays in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. **Neurobiol. Dis.,** v. 22, n. 1, p. 57-63, 2006.

MARTIN-MOUTOT, N.; MANSUELLE, P.; ALCARAZ, G.; DOS SANTOS, R. G.; CORDEIRO, M. N.; DE LIMA, M. E.; SEAGAR, M.; VAN RENTERGHEM, C. *Phoneutria nigriventer* toxin 1: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with micro conotoxin binding sites. **Mol. Pharmacol.,** v. 69, n. 6, p. 1931-1937, 2006.

MARTINS, R. B., R. The non-Amazonian species of the Brazilian wandering spiders of the genus *Phoneutria Perty*, 1833 (Araneae: Ctenidae) with the description of a new species. **Zootaxa (Auckland),** v. 1526, p. 1-36, 2007.

MATAVEL, A.; CRUZ, J. S.; PENAFORTE, C. L.; ARAUJO, D. A.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, V. F.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; BEIRAO, P. S. Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2-6. **FEBS Lett.,** v. 523, n. 1-3, p. 219-223, 2002.

MATAVEL, A.; FLEURY, C.; OLIVEIRA, L. C.; MOLINA, F.; DE LIMA, M. E.; CRUZ, J. S.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; RAMOS, C. H.; BEIRAO, P. S. Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics. **Biochemistry (Mosc).** v. 48, n. 14, p. 3078-88, 2009.

MATTIELLO-SVERZUT, A. C.; FONTANA, M. D.; DINIZ, C. R.; DA CRUZ-HOFLING, M. A. Pathological changes induced by PhTx1 from *Phoneutria nigriventer* spider venom in mouse skeletal muscle in vitro. **Toxicon,** v. 36, n. 10, p. 1349-1361, 1998.

MINTZ, I. M.; ADAMS, M. E.; BEAN, B. P. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. **Neuron,** v. 9, n. 1, p. 85-95, 1992.

MIRANDA, D. M.; ROMANO-SILVA, M. A.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; MORAES-SANTOS, T.; DE MARCO, L.; PRADO, M. A.; GOMEZ, M. V. Spider neurotoxins block the beta scorpion toxin-induced calcium uptake in rat brain cortical synaptosomes. **Brain Res. Bull.,** v. 54, n. 5, p. 533-536, 2001.

MIRANDA, D. M.; ROMANO-SILVA, M. A.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; SANTOS, T. M.; PRADO, M. A.; GOMEZ, M. V. *Phoneutria nigriventer* toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. **Neuroreport,** v. 9, n. 7, p. 1371-1373, 1998.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; FURLAN, M. S.; CAPORRINO, M. C.; GREGO, K. F.; PORTES-JUNIOR, J. A.; CLISSA, P. B.; VALENTE, R. H.; MAGALHAES, G. S. Diversity of metalloproteinases in *Bothrops neuwiedi* snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. **BMC Genet.,** v. 12, p. 94, 2011.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; PAINE, M. J.; DENNISON, J. M.; POLITI, V.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R. D. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.,** v. 26, n. 9, p. 2000-5, 1996.

MOURA, J. R.; PRADO, M. A.; GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; ROMANO-SILVA, M. A. Investigation of the effect of PhTx2, from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, on the release of [3H]-acetylcholine from rat cerebrocortical synaptosomes. **Toxicon,** v. 36, n. 8, p. 1189-1192, 1998.

NUNES, K. P.; COSTA-GONCALVES, A.; LANZA, L. F.; CORTES, S. F.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, A. M.; WEBB, R. C.; LEITE, R.; DE LIMA, M. E. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. **Toxicon,** v. 51, n. 7, p. 1197-1206, 2008.

OLIVEIRA, L. C.; DE LIMA, M. E.; PIMENTA, A. M.; MANSUELLE, P.; ROCHAT, H.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S. G. PnTx4-3, a new insect toxin from *Phoneutria nigriventer* venom elicits the glutamate uptake inhibition exhibited by PhTx4 toxic fraction. **Toxicon,** v. 42, n. 7, p. 793-800, 2003.

OLIVERA, B. M.; MILJANICH, G. P.; RAMACHANDRAN, J.; ADAMS, M. E. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. **Annu. Rev. Biochem.,** v. 63, p. 823-67, 1994.

PENAFORTE, C. L.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A.; ROMANO-SILVA, M. A.; GUIMARAES, P. E.; DE MARCO, L.; GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E. Molecular cloning of cDNAs encoding insecticidal neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon,** v. 38, n. 10, p. 1443-1449, 2000.

PERRET, B. A. The venom of the East African spider *Pterinochilus sp*. **Toxicon,** v. 12, n. 3, p. 303-10, 1974.

POCOCK, J. M.; VENEMA, V. J.; ADAMS, M. E. Omega-agatoxins differentially block calcium channels in locust, chick and rat synaptosomes. **Neurochem. Int.,** v. 20, n. 2, p. 263-70, 1992.

PRADO, M. A.; GUATIMOSIM, C.; GOMEZ, M. V.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; ROMANO-SILVA, M. A. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. **Biochem. J.,** v. 314, n. Pt 1, p. 145-50, 1996.

REGO, E.; BENTO, A. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; ANTUNES, E.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, B.; DE NUCCI, G. Isolation and partial characterization of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom that relaxes rabbit corpus cavernosum in vitro. **Toxicon,** v. 34, n. 10, p. 1141-7, 1996.

REIS, H. J.; PRADO, M. A.; KALAPOTHAKIS, E.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; DE MARCO, L. A.; GOMEZ, M. V.; M.A. Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider *Phoneutria nigriventer*. **Biochem. J.,** v. 343 Pt 2, p. 413-418, 1999

REKOW, M. A.; CIVELLO, D. J.; GEREN, C. R. Enzymatic and hemolytic properties of brown recluse spider (Loxosceles reclusa) toxin and extracts of venom apparatus, cephalothorax and abdomen. **Toxicon,** v. 21, n. 3, p. 441-4, 1983.

REZENDE JUNIOR, L.; CORDEIRO, M. N.; OLIVEIRA, E. B.; DINIZ, C. R. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon,** v. 29, n. 10, p. 1225-33, 1991.

RICHARDSON, M.; PIMENTA, A. M.; BEMQUERER, M. P.; SANTORO, M. M.; BEIRAO, P. S.; LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; BLOCH, C., JR.; VASCONCELOS, E. A.; CAMPOS, F. A.; GOMES, P. C.; CORDEIRO, M. N. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.,** v. 142, n. 3-4, p. 173-187, 2006.

ROMANO-SILVA, M. A.; RIBEIRO-SANTOS, R.; RIBEIRO, A. M.; GOMEZ, M. V.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; BRAMMER, M. J. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca2+ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarization. **Biochem. J.,** v. 296, n. Pt 2, p. 313-9, 1993.

SANTOS, R. G.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; DE LIMA, M. E. Binding sites and actions of Tx1, a neurotoxin from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, in guinea pig ileum. **Braz. J. Med. Biol. Res.,** v. 32, n. 12, p. 1565-1569, 1999.

SCHENBERG, S.; LIMA, F. A. Pharmacology of the polypeptides from the venom of the spider *Phoneutria fera*. **Mem. Inst. Butantan,** v. 33, n. 2, p. 627-638, 1966.

SILVA, P. I., JR.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **J. Biol. Chem.,** v. 275, n. 43, p. 33464-70, 2000.

SIMÓ, M.; BRESCOVIT, A. D. Revison and cladistic analysis of the neotropical spider genus *Phoneutria Perty*, 1833 (Araneae, Ctenidae), with notes on the related Cteninae. **Bul. Brit. Arachn. Soc.,** v. 12, n. 2, p. 67-82, 2001.

SOUCCAR, C.; GONCALO MDO, C.; LAPA, A. J.; TRONCONE, L. R.; LEBRUN, I.; MAGNOLI, F. Blockade of acetylcholine release at the motor endplate by a polypeptide from the venom of *Phoneutria nigriventer*. **Br. J. Pharmacol.,** v. 116, n. 7, p. 2817-23, 1995a.

SOUCCAR, C.; GONCALO MDO, C.; LAPA, A. J.; TRONCONE, L. R.; LEBRUN, I.; MAGNOLI, F. Blockade of acetylcholine release at the motor endplate by a polypeptide from the venom of *Phoneutria nigriventer*. **Br. J. Pharmacol.,** v. 116, n. 7, p. 2817-23, 1995b.

SUTTON, R. B.; FASSHAUER, D.; JAHN, R.; BRUNGER, A. T. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 A resolution. **Nature,** v. 395, n. 6700, p. 347-353, 1998.

TRONCONE, L. R.; GEORGIOU, J.; HUA, S. Y.; ELRICK, D.; LEBRUN, I.; MAGNOLI, F.; CHARLTON, M. P. Promiscuous and reversible blocker of presynaptic calcium channels in frog and crayfish neuromuscular junctions from *Phoneutria nigriventer* spider venom. **J. Neurophysiol.,** v. 90, n. 5, p. 3529-37, 2003.

TRONCONE, L. R.; LEBRUN, I.; MAGNOLI, F.; YAMANE, T. Biochemical and pharmacological studies on a lethal neurotoxic polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom. **Neurochem. Res.,** v. 20, n. 7, p. 879-83, 1995a.

TRONCONE, L. R.; LEBRUN, I.; MAGNOLI, F.; YAMANE, T. Biochemical and pharmacological studies on a lethal neurotoxic polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom. **Neurochem. Res.,** v. 20, n. 7, p. 879-83, 1995b.

TRONCONE, L. R.; RAVELLI, K. G.; MAGNOLI, F. C.; LEBRUN, I.; HIPOLIDE, D. C.; RAYMOND, R.; NOBREGA, J. N. Regional brain c-fos activation associated with penile erection and other symptoms induced by the spider toxin Tx2-6. **Toxicon,** v. 58, n. 2, p. 202-8, 2011.

VAIYAPURI, S.; WAGSTAFF, S. C.; HARRISON, R. A.; GIBBINS, J. M.; HUTCHINSON, E. G. Evolutionary analysis of novel serine proteases in the venom gland transcriptome of Bitis gabonica rhinoceros. **PL. ONE,** v. 6, n. 6, p. 21532, 2011.

VENEMA, V. J.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; HATHAWAY, G. M.; ADAMS, M. E. Antagonism of synaptosomal calcium channels by subtypes of omega-agatoxins. **J. Biol. Chem.,** v. 267, n. 4, p. 2610-5, 1992.

VIEIRA, L. B.; KUSHMERICK, C.; HILDEBRAND, M. E.; GARCIA, E.; STEA, A.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; GOMEZ, M. V.; SNUTCH, T. P. Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. **J. Pharmacol. Exp. Therap.,** v. 314, n. 3, p. 1370-7, 2005.

VILLANOVA, F. E.; ANDRADE, E.; LEAL, E.; ANDRADE, P. M.; BORRA, R. C.; TRONCONE, L. R.; MAGALHAES, L.; LEITE, K. R.; PARANHOS, M.; CLARO, J.; SROUGI, M. Erection induced by Tx2-6 toxin of *Phoneutria nigriventer* spider: expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice. **Toxicon,** v. 54, n. 6, p. 793-801, 2009.

WOLFF, P.; TRONCONE, L. R. P.; LEBRUN, I.; MAGNOLI, F.; RAW, I.; HO, P. L. Further biochemical and pharmacological characterization of PF3, a neurotoxin peptide from the "armed" spider Phoneutria nigriventer. **J. Nat. Toxins,** v. 6, n. 2, p. 211-219, 1997.

YONAMINE, C. M.; CAMILLO, M. A. P.; TRONCONE, L. R. P. Biodistribution of crude bee venom and TX2-6 toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* in mice: a study using radiotracer technique. **J. Venom. Anim. Tox. incl. Trop. Dis.,** v. 11, n. 1, p. 39-50, 2005.

YONAMINE, C. M.; TRONCONE, L. R. P.; CAMILLO, M. A. P. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal *Phoneutria nigriventer* spider toxin. **Toxicon,** v. 44, n. 2, p. 169-172, 2004.

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, Badumna insignis and Lampona cylindrata. **Toxicon,** v. 39, n. 2-3, p. 391-400, 2001.

ZANCHET, E. M.; CURY, Y. Peripheral tackykinin and excitatory amino acid receptors mediate hyperalgesia induced by *Phoneutria nigriventer* venom. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 467, n. 1-3, p. 111-8, 2003.

ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K.; ROCHA, M. M.; FURTADO, M. F.; CAMARGO, A. C.; HO, P. L.; SERRANO, S. M. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **J. Prot. Res.,** v. 9, n. 5, p. 2278-91, 2010.

ANEXO A – Peptídeos identificados por LC-MS/MS nas diferentes bandas da eletroforese e por digestão em solução.

Tabela A1. Peptídeos identificados por LC-MS/MS nas diferentes bandas de proteínas do veneno da aranha *P. nigriventer*, indicadas na figura 2.

Banda n°	Proteínas/ Peptídeos	Organismo	Número de Acesso	Sequência Peptídica	Percentual de cobertura da sequência	Probabilidade de identificação de proteínas	Best X! Tandem - log(e) score
1	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	FQENPGVMSDTSTSLR	6,23%	99,90%	2,96
				FVDNIFQQYK			1,3
				ILPLFEQLTTLTR			3,57
	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	FQENPGVMSDTSTSLR	6,23%	99,80%	2,96
				FVDNIFQQYK			1,3
				ILPLFENLTSLTR			4,47
	Hemocyanin subunit G	*Nephila inaurata madagascariensis*	Q86N89	FQENPGVMSDTSTSLR	4,15%	91,50%	2,96
				FVDNIFQQYK			1,3
	Hemocyanin subunit 1	*Cupiennius salei*	Q95ZI0	DLVDVDVQEMER	8,04%	100,00%	3,51
				FQENPGVMSDTSTSLR			2,96
				FVDNIFQQYK			1,3
				TICGDAVSYCGAK			5
	Hemocyanin subunit 2	*Cupiennius salei*	Q95ZH9	FQENPGVMSDTSTSLR	2,56%	62,90%	2,96

(Continua)

Tabela A1. Peptídeos identificados por LC-MS/MS nas diferentes bandas de proteínas do veneno da aranha *P. nigriventer*, indicadas na figura 2 *(Continuação)*.

2	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	FQENPGVMSDTSTSLR	6,87%	100,00%	3,6
				GVTLPPIQEVFPDR			2,32
				ILPLFENLTSLTR			5,72
	Hemocyanin subunit 2	*Cupiennius salei*	Q95ZH9	ANILGTLIEASSSSPNK	6,87%	100,00%	3,41
				FQENPGVMSDTSTSLR			3,6
				FVDNIFQQFK			1,43
	Hemocyanin subunit G	*Nephila inaurata madagascariensis*	Q86N89	FQENPGVMSDTSTSLR	6,87%	99,90%	3,6
				GVTLPPIQEVFPDR			2,32
				TICNDAVSYCGAK			3,1
	Hemocyanin subunit 1	*Cupiennius salei*	Q95ZI0	FQENPGVMSDTSTSLR	4,57%	99,90%	3,6
				TICGDAVSYCGAK			2,37
	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	ADILGTIIEASSSSPNK	11,50%	100,00%	2,39
				FIPAETINLATK			3
				FQENPGVMSDTSTSLR			3,6
				GVTLPPIQEVFPDR			2,32
				ILPLFEQLTTLTR			5,74
3	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	ILPLFENLTSLTR	2,08%	99,60%	5,22
	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	ILPLFEQLTTLTR	2,08%	99,60%	4,59
	Techylectin-like protein	*Phoneutria nigriventer*	P85031	EFWLGNENIFGLSNQR	24,90%	100,00%	5,05
				GICNLNLALQLITDVR			4,17
				NDNFPGATSCAQLYK			5,18
				SYADGVIWR			0,886

(Continua)

Tabela A1. Peptídeos identificados por LC-MS/MS nas diferentes bandas de proteínas do veneno da aranha *P. nigriventer*, indicadas na figura 2 *(Continuação)*.

4	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	ILPLFEQLTTLTR	2,08%	99,70%	5,22
	U10-ctenitoxin-Pk1a	*Phoneutria keyserlingi*	P85860	NYILYQHNNLR	13,60%	100,00%	3,62
				SYGVDHVPR	13,60%	100,00%	2,31
	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	ILPLFENLTSLTR	2,08%	99,70%	4,47
5	Putative uncharacterized protein	*Amblyomma maculatum*	G3MJV7	DQHLLLSDPTLPAHFSWTLDR	6,00%	99,00%	-1,73
6	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	ILPLFEQLTTLTR	2,08%	99,70%	4,21
	U21-ctenitoxin-Pn1a	*Phoneutria nigriventer*	P84033	DACQFDSGGPLFQYDKK	24,50%	100,00%	3,59
				DGFANDIALIK			1,47
				DSEFEYIQVVPSMLCAGGNGK			5,38
				QVTLPLVPWQK			2,7
	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	ILPLFENLTSLTR	2,08%	99,70%	5,28
7	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	ILPLFEQLTTLTR	2,08%	99,70%	0,796
	U10-ctenitoxin-Pk1a	*Phoneutria keyserlingi*	P85860	SYGVDHVPR	6,12%	100,00%	3,55
	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	ILPLFENLTSLTR	2,08%	99,70%	4,37
8	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	ILPLFENLTSLTR	2,08%	99,70%	3,43
9	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	GVTLPPIQEVFPDR	4,31%	99,90%	2,6
				ILPLFEQLTTLTR			4,89
	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	GVTLPPIQEVFPDR	4,31%	99,80%	2,6
				ILPLFENLTSLTR			4,7
	Hemocyanin subunit G	*Nephila inaurata madagascariensis*	Q86N89	GVTLPPIQEVFPDR	2,24%	33,10%	2,6

(Continua)

Tabela A1. Peptídeos identificados por LC-MS/MS nas diferentes bandas de proteínas do veneno da aranha *P. nigriventer*, indicadas na figura 2 *(Continuação)*.

10	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	FVDNIFQQYK	3,67%	99,80%	1,96
				ILPLFEQLTTLTR			4,55
	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	FVDNIFQQYK	3,67%	99,80%	1,96
				ILPLFENLTSLTR			4,14
	Hemocyanin subunit G	*Nephila inaurata madagascariensis*	Q86N89	FVDNIFQQYK	1,60%	18,80%	1,96
	Hemocyanin subunit 1	*Cupiennius salei*	Q95ZI0	FVDNIFQQYK	1,58%	26,90%	1,96
	Hemocyanin subunit 2	*Cupiennius salei*	Q95ZH9	FVDNIFQQFK	1,60%	99,70%	1,08
11	Techylectin-like protein	*Phoneutria nigriventer*	P85031	EFWLGNENIFGLSNQR	36,40%	100,00%	6,07
				GICNLNLALQLITDVR			4,7
				GYHESLGWTEIK			3,64
				NDNFPGATSCAQLYK			5
				NLALQLITDVR			3,92
				SPPLPIDCEEVLQR			1,12
				SYADGVIWR			1,21
	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	FVPAETINLATK	6,23%	100,00%	4,17
				GVTLPPIQEVFPDR			0,292
				ILPLFENLTSLTR			6,46
	Hemocyanin subunit G	*Nephila inaurata madagascariensis*	Q86N89	GVTLPPIQEVFPDR	2,24%	17,10%	0,292
	U21-ctenitoxin-Pn1a	*Phoneutria nigriventer*	P84033	QVTLPLVPWQK	4,49%	99,10%	1,38
	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	GVTLPPIQEVFPDR	2,24%	27,70%	0,292

(Continua)

Tabela A1. Peptídeos identificados por LC-MS/MS nas diferentes bandas de proteínas do veneno da aranha *P. nigriventer*, indicadas na figura 2 *(Continuação)*.

12	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	ILPLFEQLTTLTR	2,08%	99,70%	2,92
	U21-ctenitoxin-Pn1a	*Phoneutria nigriventer*	P84033	DACQFDSGGPLFQYDKK	24,50%	100,00%	5,11
				DGFANDIALIK			1,72
				DSEFEYIQVVPSMLCAGGNGK			2,49
				QVTLPLVPWQK			3,54
	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	ILPLFENLTSLTR	2,08%	99,70%	3,49
13	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	ILPLFEQLTTLTR	2,08%	99,70%	4,46
	U20-ctenitoxin-Pn1a	*Phoneutria nigriventer*	P84093	CSVGNSGTGYSVCLK	36,30%	100,00%	6,66
				DNAYCSCYNFFGIK			6,52
	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	ILPLFENLTSLTR	2,08%	99,70%	5,51
14	Delta-ctenitoxin-Pn2a	*Phoneutria nigriventer*	P29425	GECVCGGPCICR	26,80%	100,00%	2,6
				QGYFWIAWYK			3,07
	Hemocyanin subunit 5'	*Cupiennius salei*	Q95ZH5	ILPLFEQLTTLTR	2,08%	99,50%	3,85
	Omega-ctenitoxin-Pn3a	*Phoneutria nigriventer*	P81790	CEVGTTATSYGICMAK	36,20%	100,00%	5,48
				DNAFCSCSVIFGYK			5,46
				SCINVGDFCDGK			3,04
	Hemocyanin subunit 4	*Cupiennius salei*	Q95ZH7	ILPLFENLTSLTR	2,08%	99,50%	3,92
15	Kappa-ctenitoxin-Pn1a	*Phoneutria nigriventer*	O76200	AECAAVYER	11,00%	99,00%	1,16

Tabela A2. Identificação de peptídeos por LC-MS/MS através de digestão tripsínica em solução.

Proteínas identificadas	Numero de acesso*	Peptídeos identificados	Organismo	NPU**
Cytochrome c oxidase subunit 1	**A7WU46**	SAMMGTAMSALIR	*Geolycosa micanopy*	1
Cytochrome c oxidase subunit 1	**H9CDJ0**	GASSIMGAVNFITTIINMRLVGMSMEK	*Arctosa littoralis*	1
Empty spiracles protein	**Q5XU01**	AFSPTQLLK	*Euscorpius flavicaudis*	1
Hemocyanin	**A9QQD6**	YPDLKPMGFPFDRPITAR	*Lycosa singoriensis*	1
Hemocyanin subunit 1	**Q95ZI0**	DLVDVDVQEMER	*Cupiennius salei*	1
Hemocyanin subunit 2	**Q95ZH9**	FVDNIFQQFK	*Cupiennius salei*	2
		GITLPPIQEVFPDR		
Hemocyanin subunit 4	**Q95ZH7**	FVPAETINLATK	*Cupiennius salei*	1
Hemocyanin subunit 5	**Q95ZH5**	FIPAETINLATK	*Cupiennius salei*	1
Neural cell adhesion molecule L1	**B7PCC8**	GVVMRDSGNYTCVASNRAQAVNK	*Ixodes scapularis*	1
Putative dystrophin-like protein	**L7LZ01**	RDLMLQLEALMK	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Putative uncharacterized protein	**B7PHI9**	ASDKTITEDCGFLALLEYGDMVLADR	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**B7PIY3**	MNHFQCSMQYAQVMILR	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**B7PQG6**	RWFLVSASTVLLCLCLGAVR	*Ixodes scapularis*	1
Secreted salivary gland peptide	**B7QH82**	KFFNDIVDHVFGEVLNLACAKYTK	*Ixodes scapularis*	1
Techylectin-like protein	**P85031**	GDAGDSMIGVHNEQK	*Phoneutria nigriventer*	1
Actin	**B2YGD3**	KDLYANTVLSGGTTMYUGIADR	*Galianora bryicola*	1
Acyl-CoA synthetase	**B7PHG0**	TVEKVCAWIK	*Ixodes scapularis*	1
Arylformamidase	**B7PSM5**	MDAEYMPSVWGVR	*Ixodes scapularis*	1
Cytochrome c oxidase subunit 2	**D7SGR9**	MTNMNSFWMQNFNNIMMK	*Panonychus ulmi*	1
Delta-ctenitoxin-Pn2c	**O76199**	QGNFLIAWYK	*Phoneutria nigriventer*	1
Hemocyanin	**A9QQD6**	LDLSHGINFGTGHK	*Lycosa singoriensis*	1
Hemocyanin G chain	**Q9NFL4**	FVDNIFQEYK	*Aphonopelma californicum*	1

Tabela A2. Identificação de peptídeos por LC-MS/MS através de digestão tripsínica em solução.

Hemocyanin subunit 1	**Q95ZI0**	TYDDVVVEIEDTGNIR	*Cupiennius salei*	3
		TYDDVVVEIEDTGNIRDPEYK		
		MVPFHNFEEK		
Hemocyanin subunit 5	**Q95ZH5**	ILPLFEQLTTLTR	*Cupiennius salei*	1
Hemocyanin subunit 6	**Q95ZH2**	FVDNIFQQYK	*Cupiennius salei*	10
		ILPLFENLTSLTR		
		LAHAGHLPR		
		LMIELDKFHK		
		LSNGLNR		
		DLPDVDVQDMER		
		FQENPGVMSDTSTSLR		
		FVDNIFQQYK		
		GVTLPPIQEVFPDR		
		DLPDVDVQDMER		
Innexin	**B7PZQ9**	IQALMMDLDVGMCGDAEKK	*Ixodes scapularis*	1
Involucrin	**B7Q576**	MKTAEIKIAEMK	*Ixodes scapularis*	1
Leucine-rich repeat (LRR) protein	**B7QEK2**	VSELTLTGR	*Ixodes scapularis*	1
Lospin 3	**A7UI18**	GTWLTMFRASETK	*Amblyomma americanum*	1
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	**Q6JT24**	MPMLFMLFMK	*Haplopelma schmidti*	1
P450 CYP319A1	**B7QBU2**	MYRFYVGPLPNVMIFKAELVEAVLTSQSTMSK	*Ixodes scapularis*	1
Protein disulfide isomerase	**B7Q9F1**	DGVILFK	*Ixodes scapularis*	1
Putative fringe glycosyltransferase	**L7LYZ5**	MSVELDFFLDSNKKWMCHFDDDNYVNVPR	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Putative inactive phospholipase c-like protein 2	**L7MKG3**	GASSKATAIDPYVTVQVFGIPTDCAEAR	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Putative pnuts	**L7MKZ7**	RVAVVENFFEIIYGVHVEMDGRGGK	*Rhipicephalus pulchellus*	1

Tabela A2. Identificação de peptídeos por LC-MS/MS através de digestão tripsínica em solução.

Putative tick serine protease	**L7MMY4**	MTSIMMK	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Putative tick transposon	**L7MC25**	LMSLGVHNTMEEMAEAQQMAQQERLTRTR	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Putative uncharacterized protein	**B7PH95**	MISACCSPSCAYATGSMCCYDRCPKTTLR	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**B7PS90**	SAMTMMDLIYYNPPGNPMPSNDEAKCKNEK	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**B7Q8L5**	KATDAILLQELK	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**B7QHV7**	ATQERYAPSTPVKIHMAVGVYHK	*Ixodes scapularis*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MFU0**	CELHIYESEIKK	*Amblyomma maculatum*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MGW9**	LFFIGNAMTWCGR	*Amblyomma maculatum*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MHC7**	RGGEVTCMWDDQVAQMFRDAIAER	*Amblyomma maculatum*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MIL2**	DSVPSRILIDVSKIDMTTTVLGFK	*Amblyomma maculatum*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MNZ1**	MSMDVERWTKSTK	*Amblyomma maculatum*	1
Putative uncharacterized protein	**G3MS29**	MVASPNEFPLLYMYEQWQNDRK	*Amblyomma maculatum*	1
Sodium-dependent multivitamin transporter	**B7PU18**	FAVFGVLMVVVLGLGLFFSFRR	*Ixodes scapularis*	1
Techylectin-like protein	**P85031**	GYHESLGWTEIK	*Phoneutria nigriventer*	2
		SYADGVIWR		
U10-ctenitoxin-Pk1a	**P85860**	GNVEGEEIYK	*Phoneutria keyserlingi*	2
		SYGVDHVPR		
U21-ctenitoxin-Pn1a	**P84033**	DGFANDIALIK	*Phoneutria nigriventer*	3
		GGGPISAELR		
		YPWMVSIHER		
U24-ctenitoxin-Pn1a	**P84032**	KQLWEFNK	*Phoneutria nigriventer*	1
Uncharacterized protein	**L7LZ58**	QWQEMMIISLR	*Rhipicephalus pulchellus*	1
Zinc finger protein	**B7P0R7**	WQCMECKMCNICMATDNEEKMMFCDR	*Ixodes scapularis*	1

ANEXO B – Espectros de massas obtidos por LC/ESI-MS

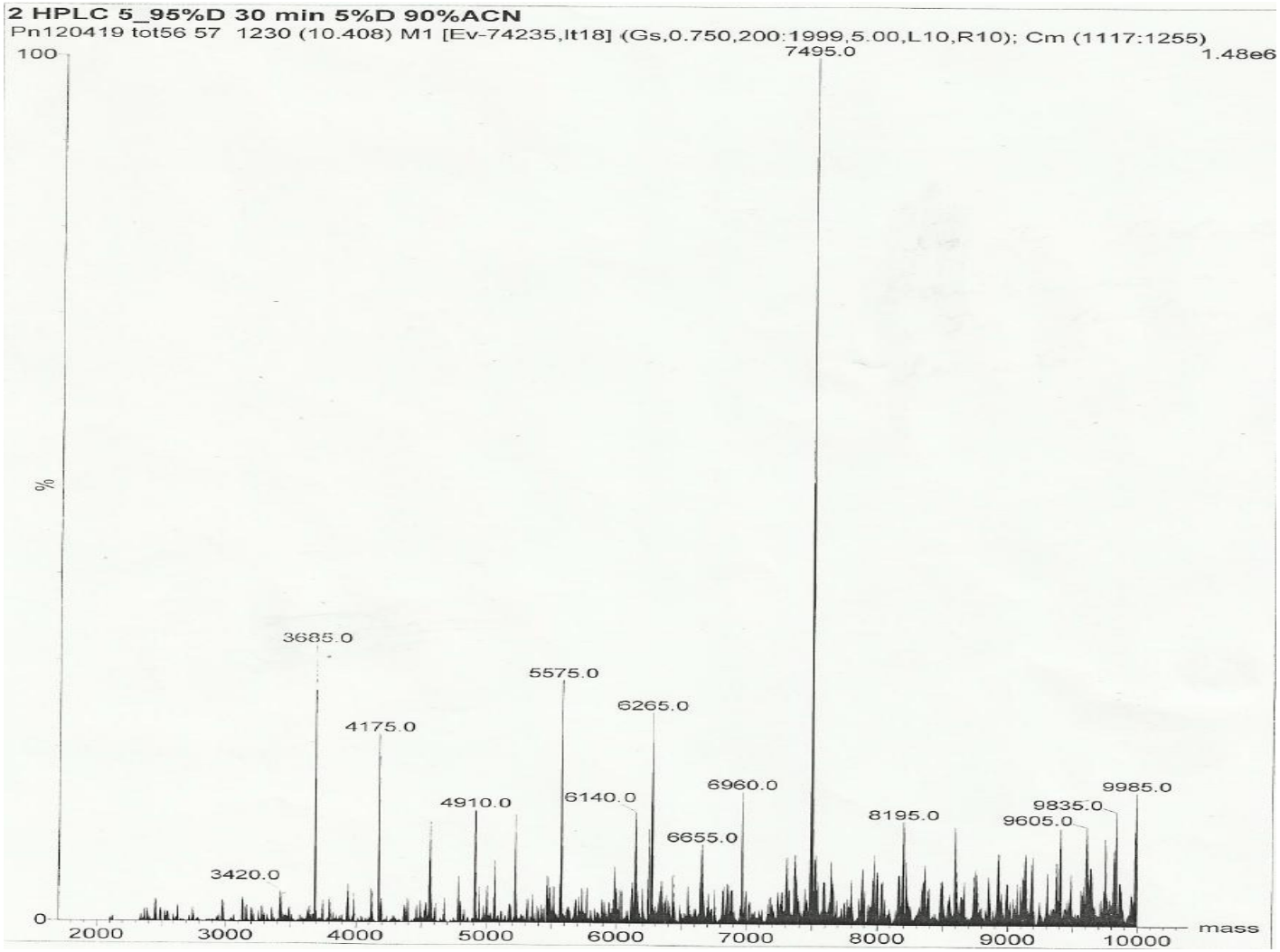

Figura B.1 – Espectro de massas (deconvoluídos) por LC-ESI/MS da fração 56/57

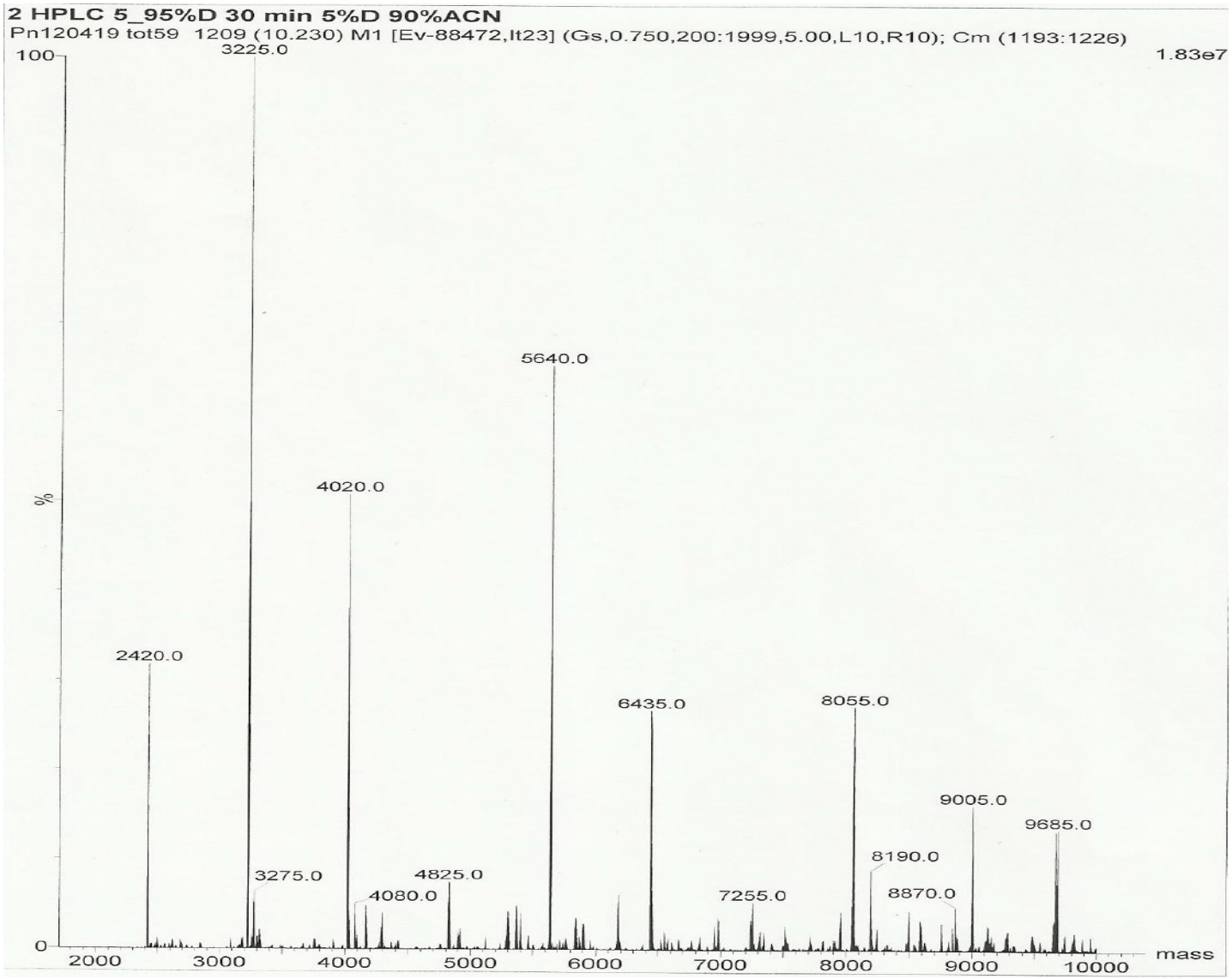

Figura B.2 – Espectro de massas (deconvoluídos) por LC-ESI/MS da fração 59

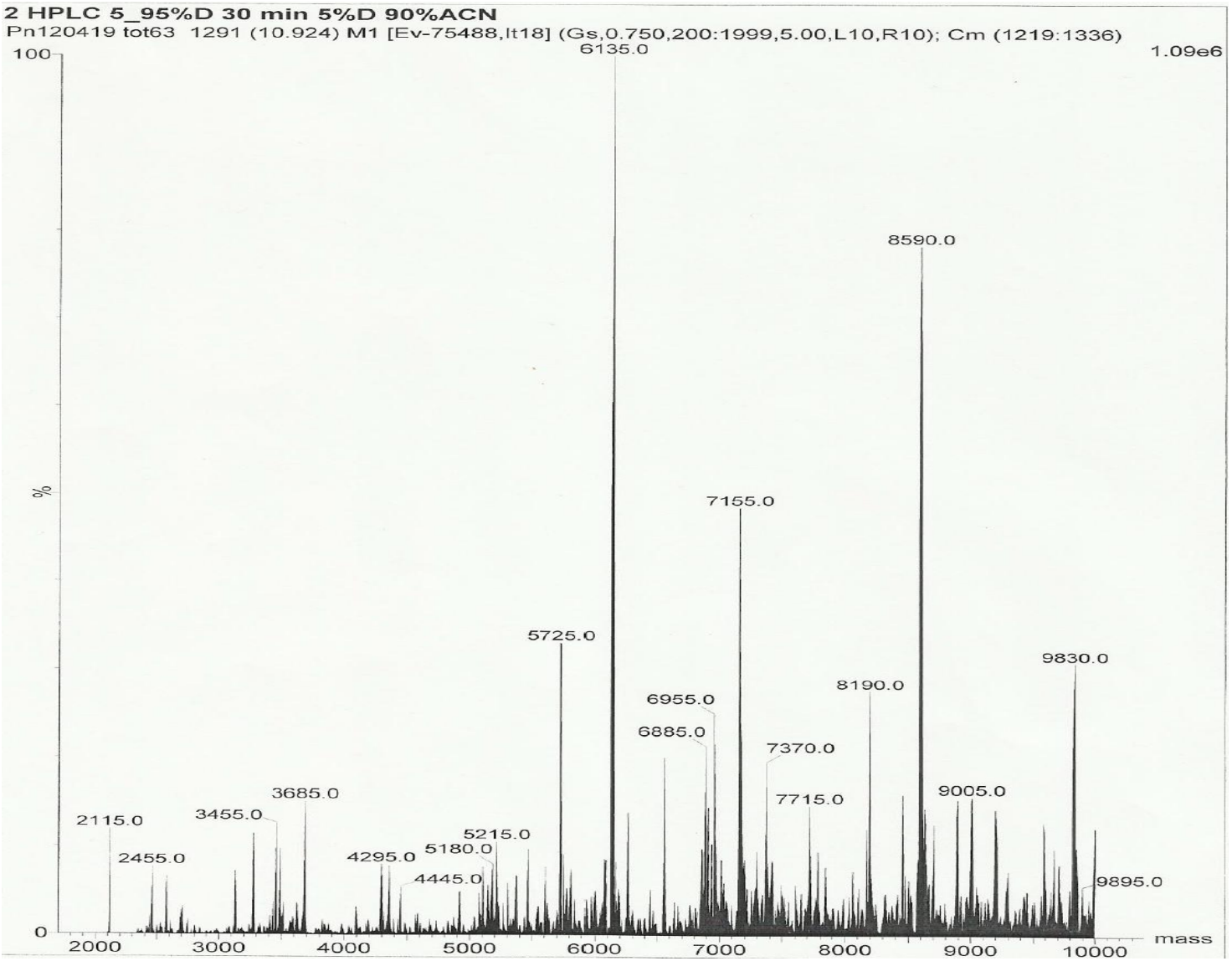

Figura B.3 – Espectro de massas (deconvoluídos) por LC-ESI/MS da fração 63

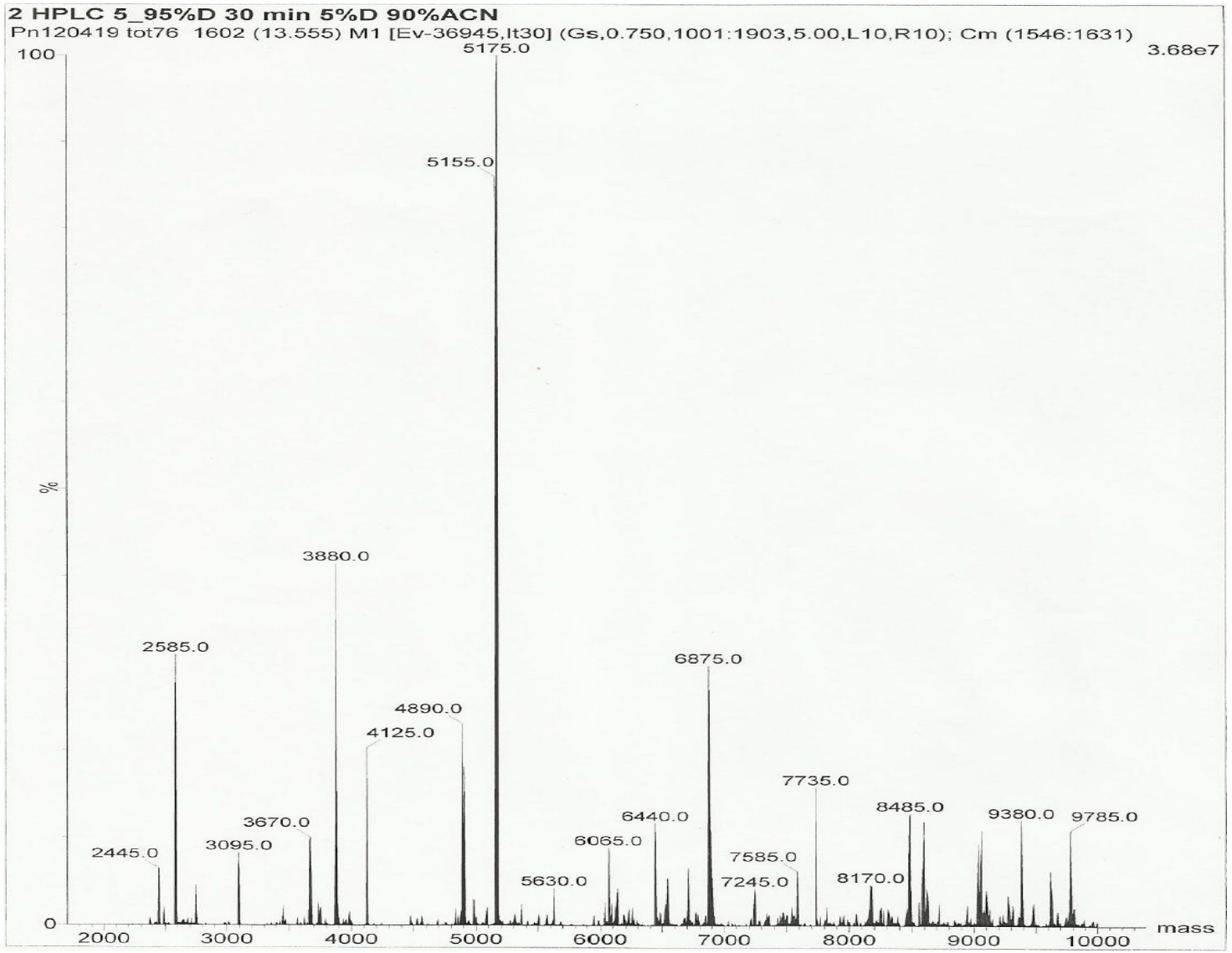

Figura B.4 – Espectro de massas (deconvoluídos) por LC-ESI/MS da fração 76

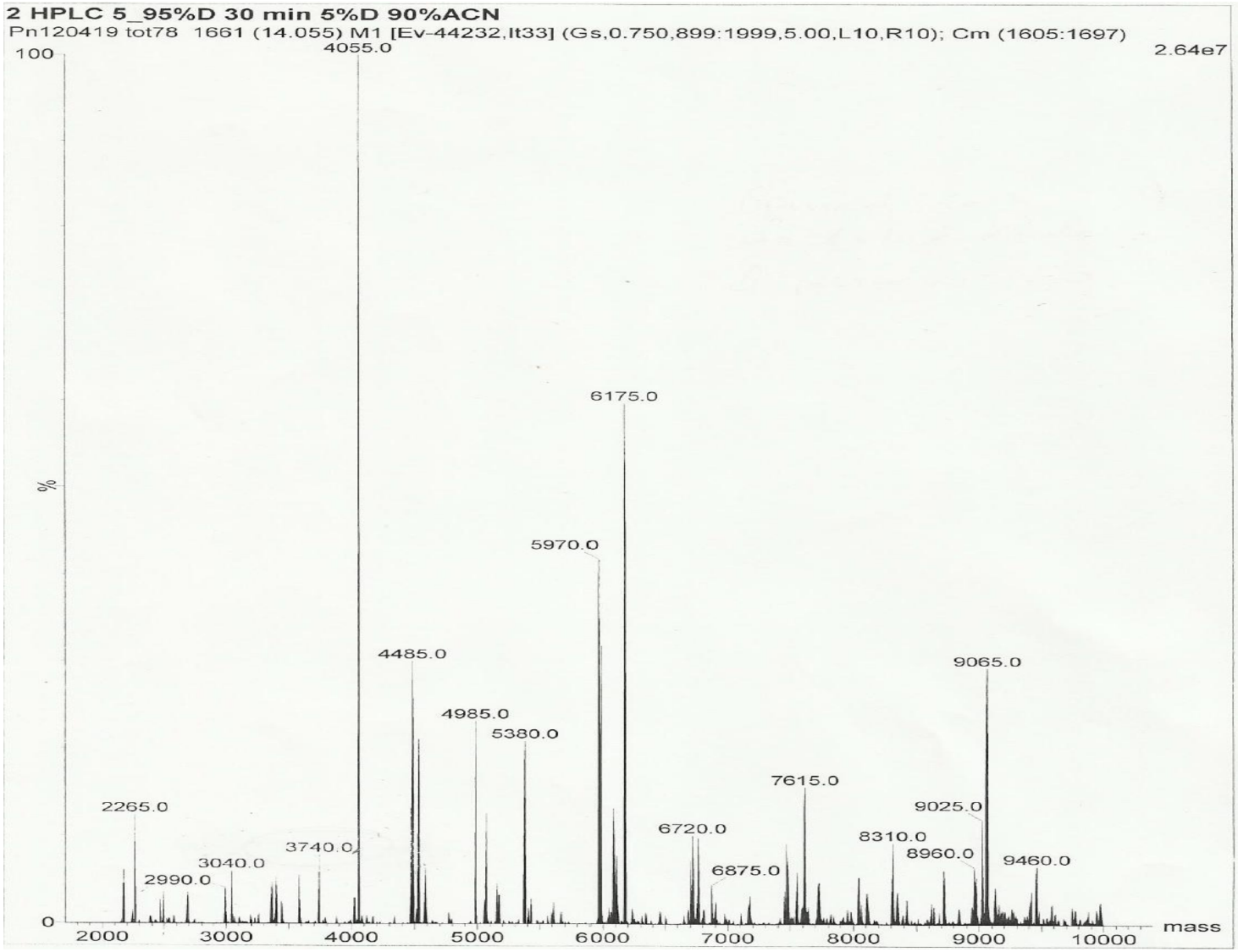

Figura B.5 – Espectro de massas (deconvoluídos) por LC-ESI/MS da fração 78

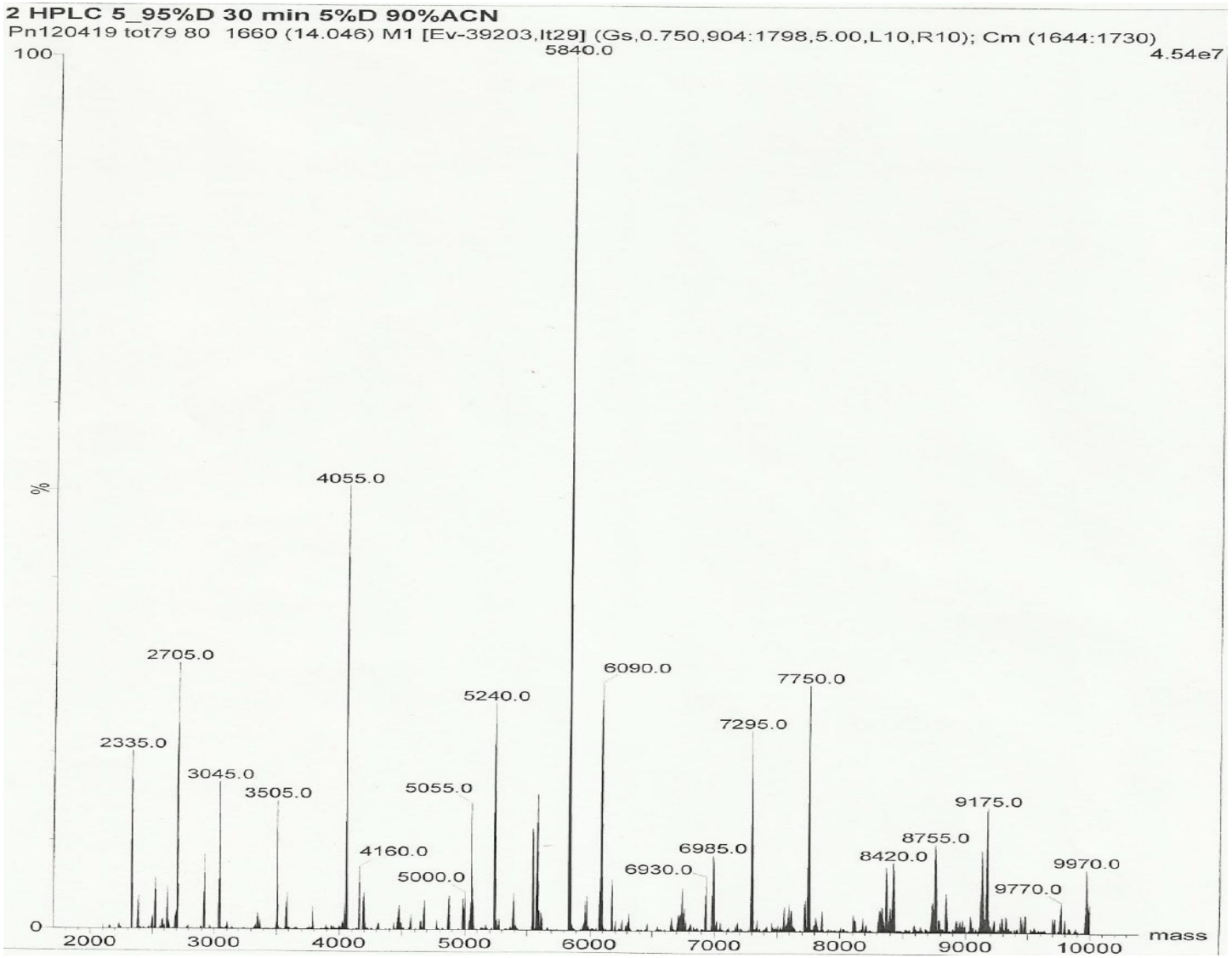

Figura B.6 – Espectro de massas (deconvoluídos) por LC-ESI/MS da fração 79/80

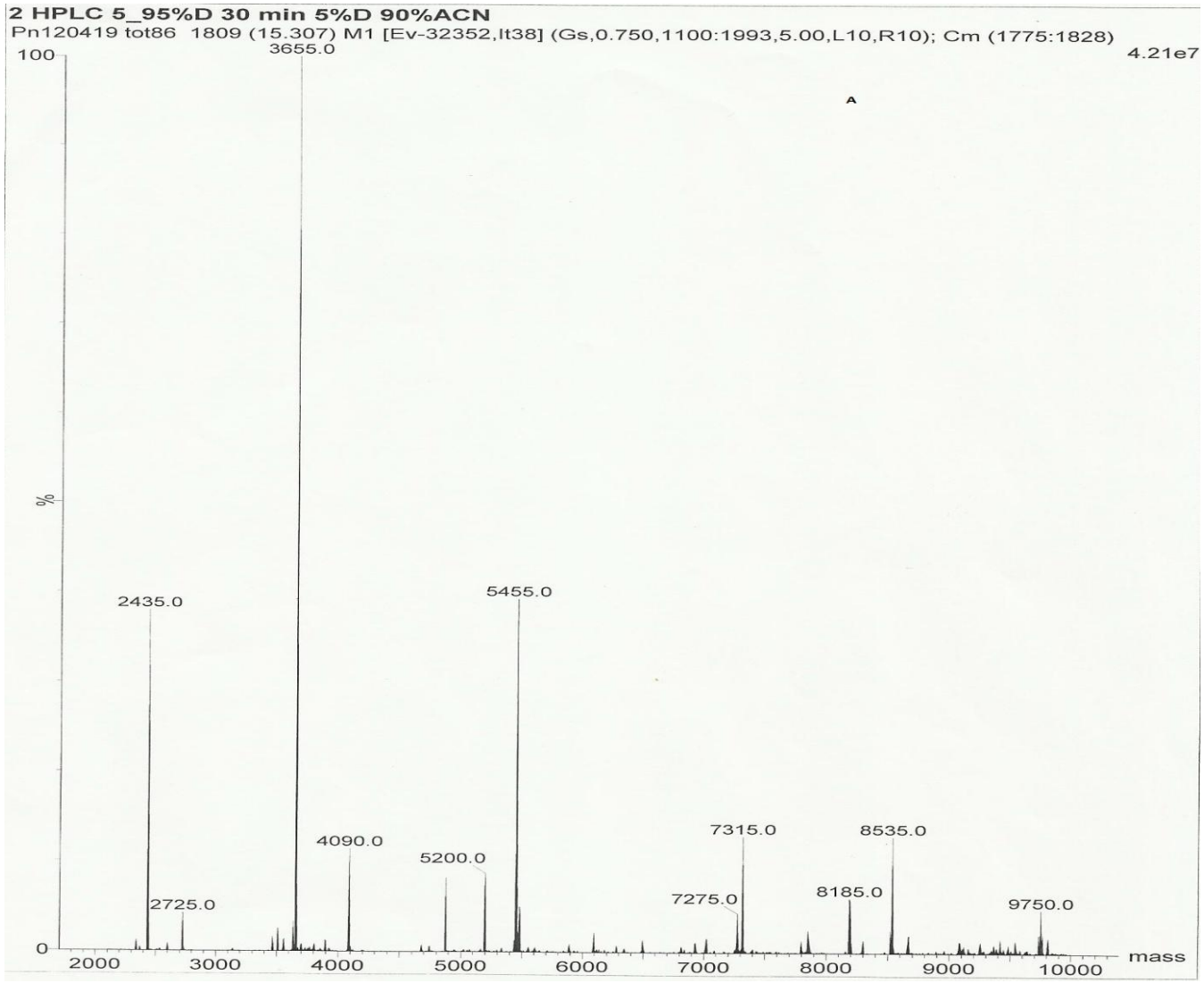

Figura B.7 – Espectro de massas (deconvoluídos) por LC-ESI/MS da fração 86/A

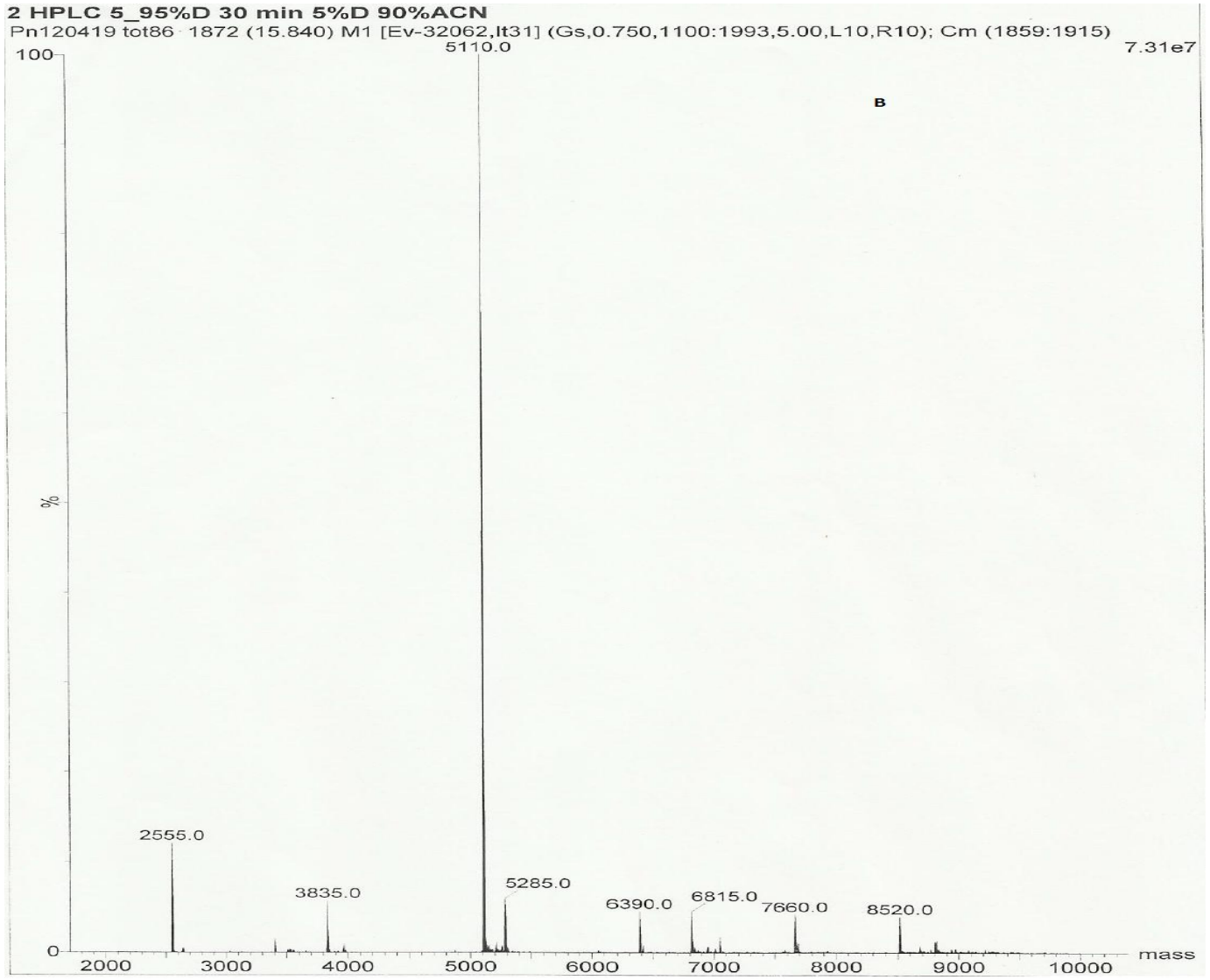

Figura B.8 – Espectro de massas (deconvoluídos) por LC-ESI/MS da fração 86/B

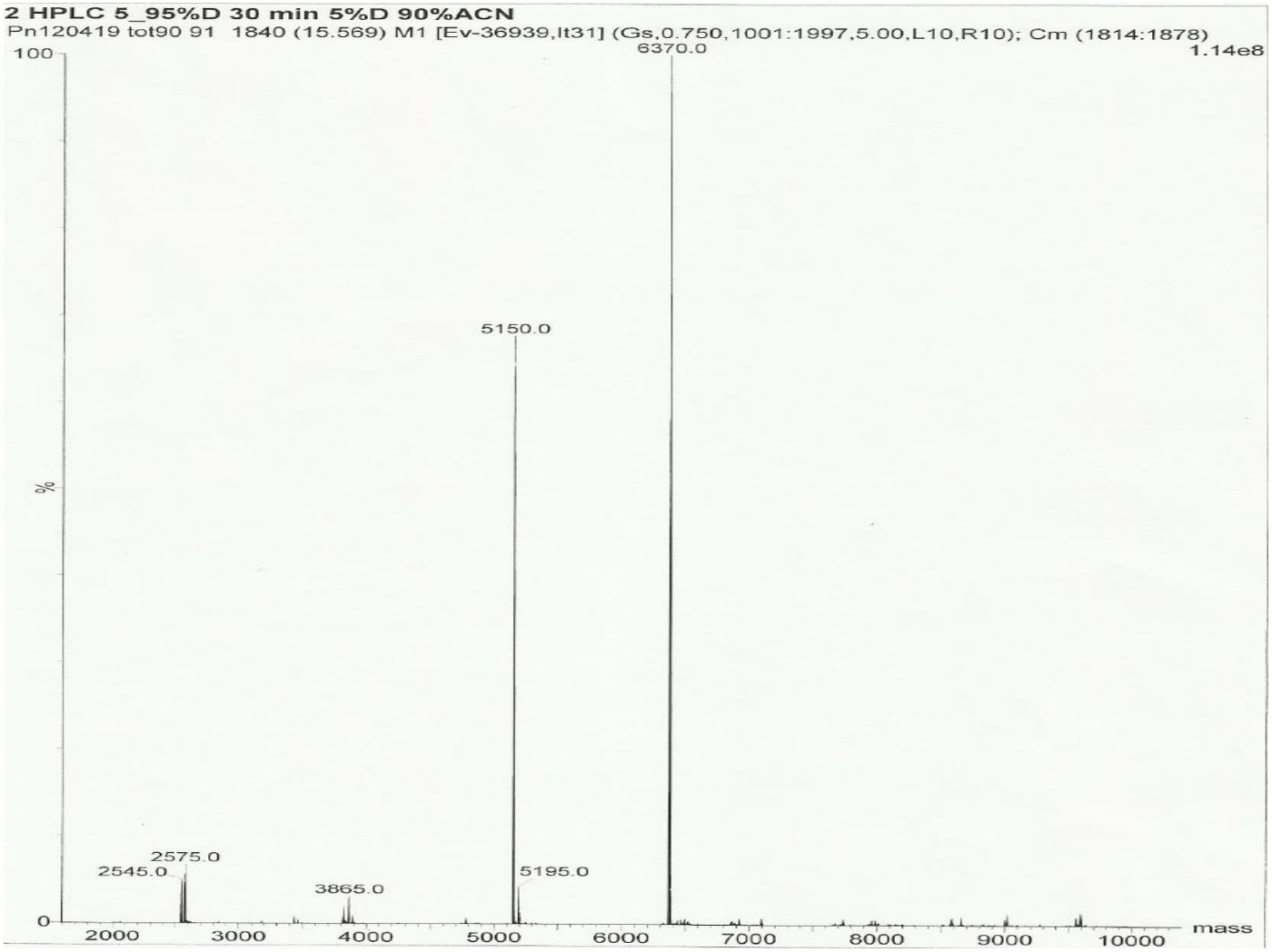

Figura B.9 – Espectro de massas (deconvoluídos) por LC-ESI/MS da fração 91

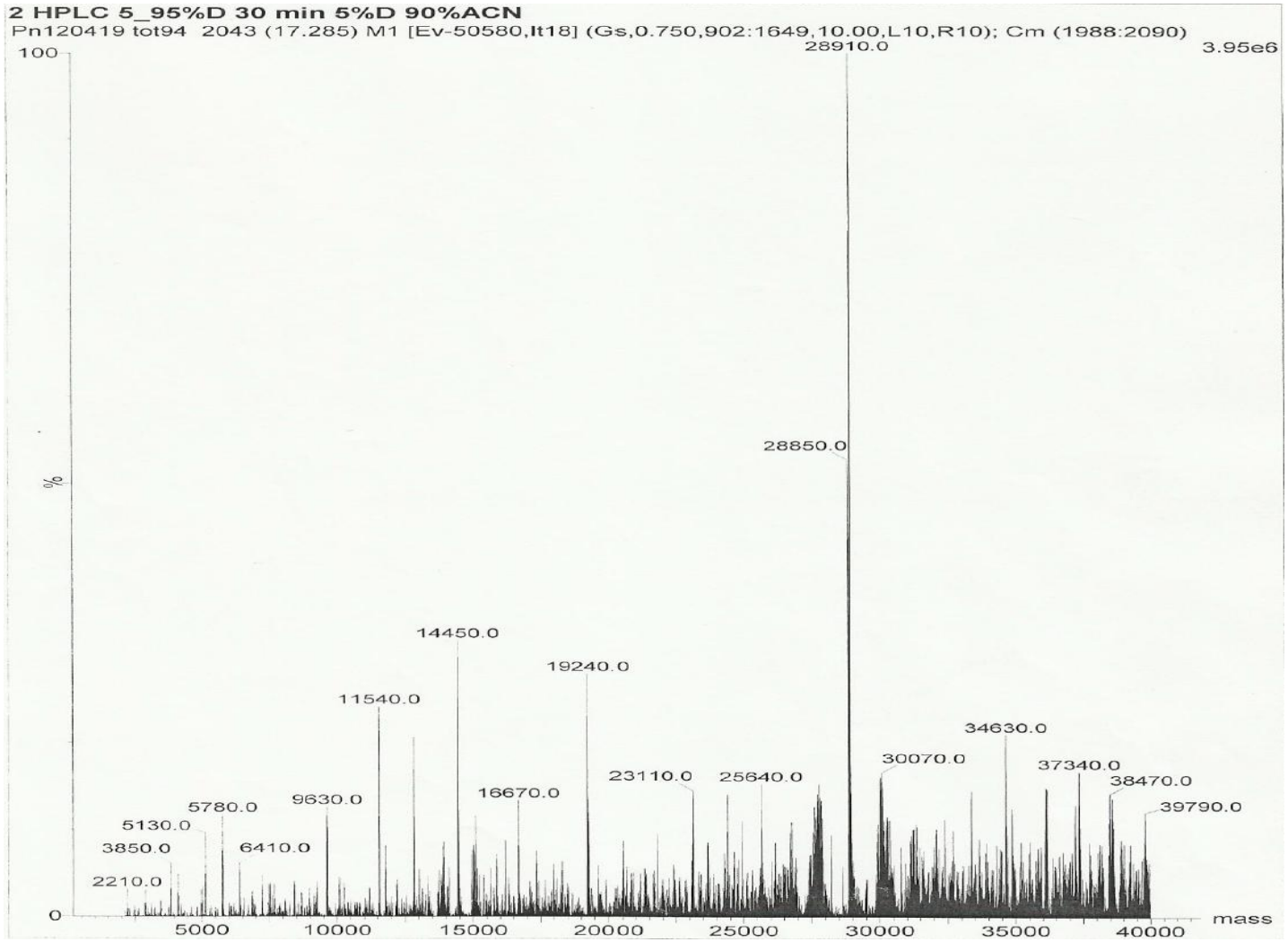

Figura B.10 – Espectro de massas (deconvoluídos) por LC-ESI/MS da fração 94

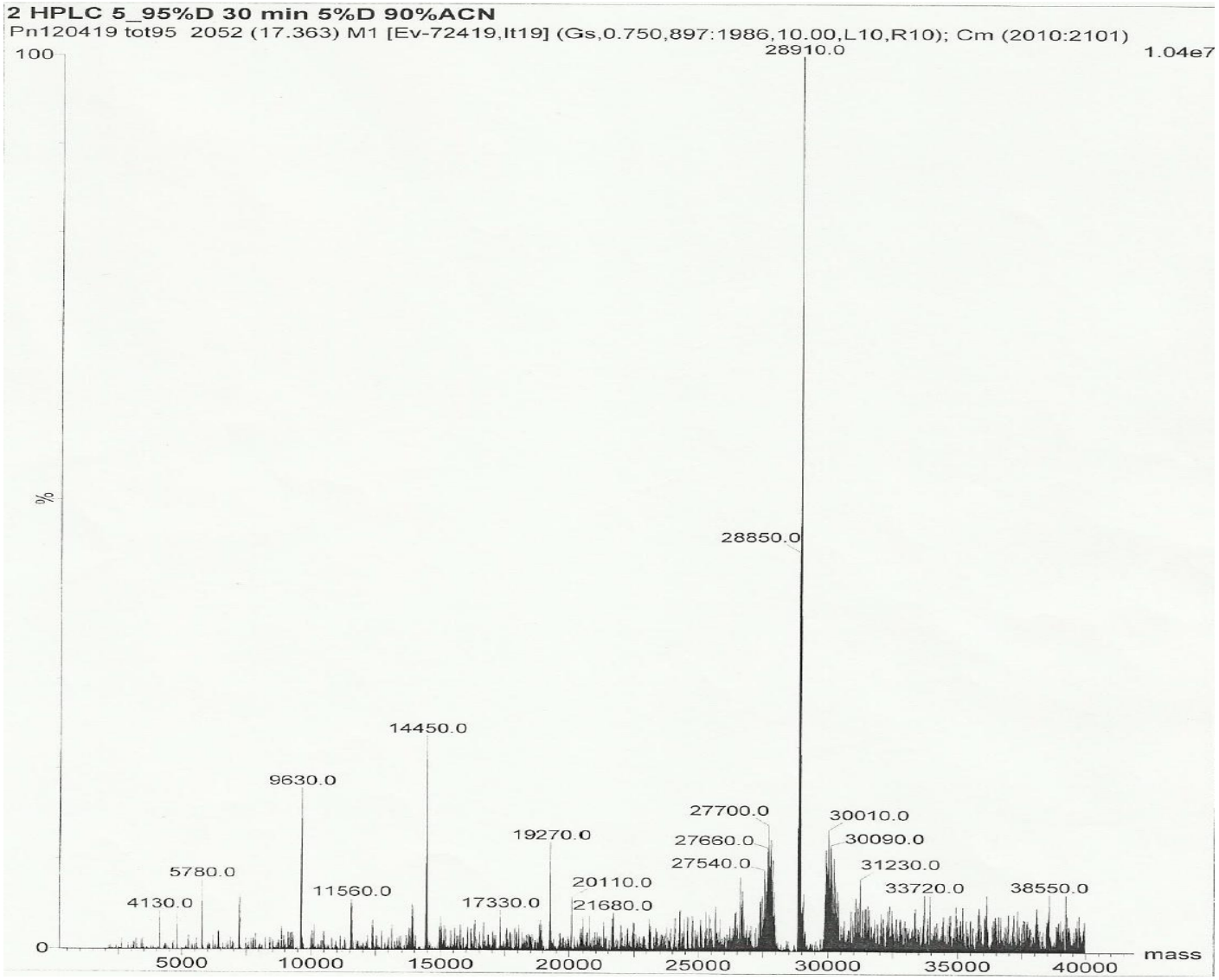

Figura B.11 – Espectro de massas (deconvoluídos) por LC-ESI/MS da fração 95