



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular



FERNANDO HITOMI MATSUBARA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UM PEPTÍDEO
DA FAMÍLIA DAS NOTINAS PRESENTE NO VENENO DA
ARANHA MARROM (*Loxosceles intermedia*)**

**CURITIBA
2011**

FERNANDO HITOMI MATSUBARA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UM PEPTÍDEO
DA FAMÍLIA DAS NOTINAS PRESENTE NO VENENO DA
ARANHA MARROM (*Loxosceles intermedia*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Olga Meiri Chaim

CURITIBA

2011

Aos meus pais pela oportunidade que me concederam de poder me dedicar integralmente aos estudos. Pelo apoio incondicional e generosidade constante.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, por todos os ensinamentos, incentivos e confiança nesses 2 anos. Por proporcionar a oportunidade de me integrar ao Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos e conviver com um grupo especial de pessoas.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Olga Meiri Chaim, por ser um exemplo de competência e dedicação. Por ser generosa e, sobretudo, humana, aconselhando e motivando a todo instante. Muito obrigado!

À Luiza Helena Gremski, pela prontidão em me ajudar em todos os experimentos. Por ser um exemplo de profissionalismo e disciplina. Muito obrigado por toda a paciência e disposição!

À Prof^a. Dr^a. Andréa Senff Ribeiro, por todos os conselhos acadêmicos e pessoais. Pelos incentivos e momentos descontraídos!

À Dilza Trevisan Silva, por todo o auxílio técnico e pela grande amizade! Por tornar todos os momentos divertidos e leves! Pelo companheirismo em absolutamente todas as horas!

À Valéria Pereira Ferrer, por todo o auxílio técnico e pela grande amizade! Por ser exemplo de conduta ética e pela paciência. Por transmitir serenidade nos momentos mais tensos!

Ao Youssef Bacilla Sade, por sua ajuda nos experimentos e pelos conselhos e incentivos mesmo via internet. Pelo exemplo de competência e determinação!

À Soraya F. de Andrade, por ter participado ativamente de muitos experimentos. Obrigado pelos esforços e pelos momentos engraçados!

Aos amigos do LME: Gabriel, Thiago, Fernanda, Mari Bóia, Dani Buch, Larissa, Dani Chaves, Marta, Mari Magnoni e Jenifer. Muito obrigado por todos os momentos de companheirismo e pelo harmonioso convívio que compartilhamos durante os últimos anos! Agradeço todos os auxílios técnicos, os papos divertidos e os conselhos pessoais!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR! Em especial aos professores Silvio Marques Zanata, Adriana Frohlich Mercadante, Lia Sumie Nakao, Stênio Perdigão Fragoso e Edvaldo Trindade por todos os ensinamentos e esclarecimentos de dúvidas!

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia, em especial à Chelin, Bia, Márcia e Michele, por todo auxílio nas discussões de protocolos e nos empréstimos de reagentes!

À Marlene, secretária do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR por todo o auxílio nas questões burocráticas!

Aos meus amigos Ana Paula Liboni, Emanuele Galvão, Carolina Nachi, Bruno Richter, Paulo Henrique Ferreira, Kristie Yamamoto, Eik Sorgi, Daniel Ferri, Mariana Nicolielo, Isabela Domiciano, Ana Carolina, Wanessa Paladini e Carla Alves! Obrigado por todos os incentivos! A amizade de vocês foi fundamental para a conclusão dessa etapa!

A todos os meus familiares por me motivarem a concretizar os meus objetivos pessoais e profissionais!

À CAPES, Fundação Araucária, SETI e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

Siga o caminho do pensador independente e que corre riscos. Exponha suas idéias ao perigo da controvérsia. Fale o que tenha em mente e tema menos ser tachado como "louco" do que o estigma do conformismo.

Thomas John Watson

RESUMO

O conteúdo total do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* permanece ainda desconhecido, entretanto, muitos estudos têm mostrado que se constitui uma mistura complexa de compostos biologicamente ativos. Por meio de análises eletroforéticas, observa-se a predominância de moléculas de baixa massa molecular (3-45 kDa), enquanto moléculas de alta massa molecular são menos abundantes. Os venenos de aranhas estão funcionalmente relacionados à defesa contra predadores e também à paralisia e captura de presas, especialmente insetos. As aranhas desenvolveram um arsenal de moléculas inseticidas, resultando em uma biblioteca combinatória de peptídeos que tem sido aprimorada durante sua evolução. Comumente, tais peptídeos consistem em moléculas de cadeia única com massa molecular variando de 3 a 10 kDa, ricos em resíduos de cisteína, os quais estabelecem pontes dissulfeto intramoleculares características. Essas pontes se organizam em um motivo estrutural característico denominado “nó de cistina inibidor” ou ICK (Inhibitor Cystine Knot) e, por isso, os peptídeos que o contêm são denominados notinas (“*knottins*”). Recentemente, análises do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* (GREMSKI *et al.*, 2010) revelaram ESTs com similaridade a notinas previamente descritas como LiTx (De CASTRO *et al.*, 2004). Sequências relacionadas à LiTx3 foram as mais abundantes no transcriptoma de *L. intermedia*, representando aproximadamente 13,9% de todas as ESTs obtidas e compreendendo 32% dos mRNAs codificantes de toxinas. Devido a alta proporção de sequências codificantes para peptídeos semelhantes a LiTx3, o presente estudo teve como objetivo a clonagem e expressão de um peptídeo dessa família. *Primers* foram desenhados para a realização das técnicas de 3' e 5' RACE, o qual teve como resultado a obtenção da sequência nucleotídica completa do cDNA correspondente ao peptídeo em estudo. A sequência do propeptídeo associado ao peptídeo maduro foi amplificada e modificada por PCR com primers contendo sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *BamHI* e inseridos no vetor de expressão pET-14b. A construção foi transformada em cepa de *E. coli* AD494(DE3). Um teste de expressão foi realizado para determinar as condições ótimas de expressão do peptídeo. Verificou-se que a indução com 0,5mM de IPTG, por 3 horas e meia, a 30°C era a melhor

condição de expressão. A partir desse resultado, uma expressão em larga escala foi realizada, obtendo-se o peptídeo recombinante na fração solúvel, após cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺-NTA. A diversidade de peptídeos presentes no veneno de *L. intermedia* representa uma fonte importante de possíveis novas ferramentas moleculares com aplicação farmacológica e/ou biotecnológica.

Palavras-chave: Notinas, clonagem, expressão heteróloga, aplicações biotecnológicas.

ABSTRACT

The whole content of *Loxosceles* spider venom still remains unknown, but several studies have shown that it is a complex mixture of biologically active and inactive components. By electrophoretic analysis, the predominance of low molecular mass molecules (3-45kDa) can be observed, while high molecular mass ones are less abundant. Spider venoms are functionally related to defense against predators as well as to paralyze and capture a natural prey, especially insects. Spiders have developed an arsenal of insecticidal molecules, resulting in a combinatorial peptide library of peptides that has been improved during evolution. Commonly, such peptides consist of single chain molecules ranging between 3-10 kDa and are rich in cysteine residues, which form intramolecular disulfide bridges. These bridges establish a structural motif “Inhibitor Cysteine Knot” (ICK), then, these peptides are named “knottins”. Recently, a transcriptome analysis of *L. intermedia* venomous gland (GREMSKI *et al.*, 2010) has revealed ESTs with similarity to knottins previously described as LiTx (De CASTRO *et al.*, 2004). LiTx3-related sequences were the most abundant in the *L. intermedia* transcriptome representing about 13.9% of all ESTs obtained and comprise 32% of toxin-encoding messengers. Due to the high proportion of sequences encoding LiTx3 peptide, the present study aimed to clone and express a peptide of this family. Primers were designed to perform 3'RACE and 5'RACE methods, obtaining the full nucleotide sequence of this peptide. The sequence corresponding to the propeptide associated with the mature peptide was amplified and modified by PCR with specific primers containing restriction sites for *Xho*I and *Bam*HI enzymes and inserted in pET-14b vector. The construct was transformed in *E. coli* AD494(DE3) strain. A small scale expression was performed and the optimum parameters for recombinant protein expression were determined: 0,5mM of IPTG induction during 3h and 30min at 30°C. A large scale expression was done to obtain enough quantity of this molecule for biological assays. After affinity chromatography in Ni-NTA resin, the recombinant peptide was obtained in the soluble fraction. The diversity of peptides present in the *L. intermedia* venom glands represents an amazing source of novel molecular tools with pharmacological and biotechnological applications.

Keywords: Knottins, cloning, expression, biotechnological application.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DAS ARANHAS.....	19
FIGURA 2: VISÃO GERAL DA FILOGENIA DAS ARANHAS.....	20
FIGURA 3: IDENTIFICAÇÃO DAS ARANHAS-MARRONS (GÊNERO <i>Loxosceles</i>).....	22
FIGURA 4: QUADRO DERMONECRÓTICO DO LOXOSCELISMO.....	25
FIGURA 5: QUADRO SISTÊMICO DO LOXOSCELISMO – INDÍCIOS DE DANO RENAL.....	27
FIGURA 6: APARATO INOCULADOR E GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i>	28
FIGURA 7: ESTRUTURA DAS ACILPOLIAMINAS.....	35
FIGURA 8: NOTINAS E MOTIVO ESTRUTURAL NÓ DE CISTINA INIBIDOR (ICK).....	38
FIGURA 9: ω -ACTX-Hv2a – Notina de <i>Hadronyche versuta</i>	39
FIGURA 10: TRANSCRIPTOMA DE <i>L. intermedia</i>	43
FIGURA 11: SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS PREDITAS DE NOTINAS OBTIDAS NO TRANSCRIPTOMA DE <i>L. intermedia</i>	44
FIGURA 12: PERFIL DO RNA TOTAL ÍNTEGRO OBTIDO POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	56
FIGURA 13: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DO 3'RACE E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTES AO PEPTÍDEO LiKp.....	57
FIGURA 14: ALINHAMENTO VIA CAP3 SEQUENCE ASSEMBLY PROGRAM DOS CLONES POSITIVOS OBTIDOS POR MEIO DO PCR DE COLÔNIA PARA O 3'RACE REFERENTE AO PEPTÍDEO LiKp.....	58
FIGURA 15: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DO 5'RACE E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTES AO PEPTÍDEO LiKp.....	59
FIGURA 16: ALINHAMENTO VIA CAP3 SEQUENCE ASSEMBLY PROGRAM DOS CLONES POSITIVOS OBTIDOS POR MEIO DO PCR DE COLÔNIA PARA O 5'RACE REFERENTE AO PEPTÍDEO LiKp.....	60
FIGURA 17: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DO 5'RACE II E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTES AO PEPTÍDEO LiKp.....	60

FIGURA 18: ALINHAMENTO VIA CAP3 SEQUENCE ASSEMBLY PROGRAM DOS CLONES POSITIVOS OBTIDOS POR MEIO DO PCR DE COLÔNIA PARA O 5'RACE REFERENTE AO PEPTÍDEO LiKp.....	61
FIGURA 19: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DO PCR E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTES AO cDNA COMPLETO DO PEPTÍDEO LiKp.	62
FIGURA 20: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS DO PEPTÍDEO LiKp (PepIns) E DA LiTx3 DESCRITA POR DE CASTRO E COLABORADORES (2004).	63
FIGURA 21: PREDIÇÃO DO PEPTÍDEO SINAL DO PEPTÍDEO INSETICIDA PELO PROGRAMA SIGNALP 3.0 SERVER.....	64
FIGURA 22: ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS PEPTÍDEOS.	65
FIGURA 23: ESTABELECIMENTO DE PONTES DISSULFETO.....	66
FIGURA 24: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SÍTIO DE MÚLTIPLA CLONAGEM DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-14b.	68
FIGURA 25: SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA E SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA PREDITA DO PEPTÍDEO LiKp.	68
FIGURA 26: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DO PCR E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTES À CLONAGEM DA SEQUÊNCIA DO PROPEPTÍDEO ASSOCIADO AO PEPTÍDEO MADURO...	69
FIGURA 27: TESTE DE MINI-EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO LiKp: PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXPRESSÃO.....	70
FIGURA 28: PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE POR MEIO DE CROMATOLOGRAFIA DE AFINIDADE EM RESINA Ni ²⁺ -NTA AGAROSE.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS: Persulfato de amônio

BLAST : do inglês, “Basic Local Alignment Search Tool”

BOD: Demanda biológica de oxigênio (“Biological Oxygen Demand”)

BSA : Albumina de soro bovina (“Bovine Serum Albumin”)

cDNA: DNA complementar

CPPI: Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná.

DEPC: dietilpirocarbonato

dNTPs: mistura de desoxirribonucleotídeo trifosfatados (A, T, G, C)

D.O.: densidade óptica

EST: Expressed Sequence Tag

Expasy: o inglês, “Expert Protein Analysis Sy

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

IRA: Insuficiência renal aguda.

LB: Luria-Bertani

mRNA: RNA mensageiro

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MgSO₄: Sulfato de Magnésio

NaCl: Cloreto de sódio

NaH₂PO₄: Fosfato de sódio monobásico

NCBI: do inglês, “National Center for Biotechnology Information”

Ni-NTA: Níquel-ácido nitrilotriacético

PBS: Solução salina tamponada com fosfato (“Phosphate Buffer Saline”)

PCR: reação em cadeia da polimerase

pI: ponto isoelétrico

pH: potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

rRNA: RNA ribossômico

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

SDS: dodecil sulfato de sódio (“sodium dodecyl sulfate”)

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (“Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrilamide Gel Electrophoresis”)

T.A.: Temperatura ambiente

TEMED: N,N,N',N'- tetrametil-etilenodiamina

kDa: quilodaltons (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons)

L: litro

M: molar

mA: miliamperere

mg: miligrama

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

nm: nanômetro

p/v: proporção peso/volume

V: volts

v/v: proporção volume/volume

µg: micrograma

µL: microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Aranhas: características anatômicas e filogenia	19
3.2 Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> : identificação e biologia.....	21
3.3 Epidemiologia da aranha-marrom	23
3.4 Loxoscelismo.....	24
3.5 Veneno loxoscélico	27
3.6 Aplicações biotecnológicas das toxinas loxoscélicas	30
3.7 Neurotoxinas	34
3.7.1 Acilpoliaminas	34
3.7.2 Neurotoxinas de alta massa molecular.....	35
3.7.3 Peptídeos da família das Notinas.....	37
3.7.4 Notinas em veneno de <i>L. intermedia</i>	42
4 METODOLOGIA	45
4.1 Obtenção das glândulas produtoras de veneno <i>L. intermedia</i> e extração do RNA total.....	45
4.2 Quantificação e Análise da Integridade do RNA Total Extraído	46
4.3 Transcrição Reversa Acoplada à Reação em Cadeia da Polimerase: RT-PCR	46
4.4 5'RACE (<i>Rapid Amplification of 5' cDNA Ends</i>) para amplificação da extremidade 5' do cDNA relativo ao LiKp.....	47
4.5 3'RACE (<i>Rapid Amplification of 3' cDNA Ends</i>) para amplificação da extremidade 3' do cDNA relativo ao LiKp.....	48
4.6 Extração dos fragmentos do gel de agarose.....	48
4.7 Reação de Ligação	49

4.8	Tranformação Bacteriana por Eletroporação.....	49
4.9	Plaqueamento das Bactérias Transformadas.....	49
4.10	PCR de Colônia.....	50
4.11	Pré-inóculo para Processamento de Sequenciamento	50
4.12	PCR com <i>Pfu</i> DNA Polimerase e Clonagem da Sequência Completa do LiKp em Vetor de Clonagem	51
4.13	Subclonagem do cDNA Referente ao Peptídeo LiKp em Vetor de Expressão pET-14b.....	51
4.14	Expressão do Peptídeo LiKp Recombinante.....	52
4.15	Purificação do Peptídeo LiKp Recombinante	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Determinação da sequência a ser clonada e expressada.....	54
5.2	Extração, quantificação e análise da integridade do RNA.....	55
5.3	Clonagem do peptídeo Notina.....	56
5.4	Subclonagem em vetor de expressão pET-14b	67
5.5	Teste de expressão em bactérias <i>E. coli</i> AD494(DE3)	69
5.6	Expressão em larga escala do peptídeo notina recombinante.....	70
6	CONCLUSÃO	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

Durante sua evolução, os animais têm desenvolvido diferentes estratégias para capturar a presa da qual se alimentam e também vários meios de se defender dos predadores. Para isso, muitos animais produzem uma diversidade de venenos e secreções que os tornam aptos a se adaptarem ao ambiente. É difícil estimar o número exato de espécies venenosas ou o número de toxinas por elas produzidas, entretanto, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar os componentes presentes nos venenos (JUNG *et al.*, 2010; KAPOOR, 2010; LU; LAI; ZHANG, 2010).

As análises dos venenos de diversas aranhas revelaram uma grande heterogeneidade em sua composição. Em geral, os venenos são misturas complexas de moléculas biologicamente ativas e inativas, tendo sido descritos peptídeos, proteínas, poliaminas neurotóxicas, enzimas, ácidos nucléicos, amins biogênicas, lipídios, aminoácidos livres e sais inorgânicos (JACKSON; PARKS, 1998; RASH; HODGSON, 2002; da SILVA *et al.*, 2004).

O veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* é um líquido incolor e cristalino constituído, principalmente, por proteínas com ação tóxica e/ou enzimática. Por meio de análises eletroforéticas, verifica-se a predominância de proteínas de baixa massa molecular (3-45 kDa) em detrimento das proteínas de alta massa molecular, as quais são bem menos expressas (VEIGA *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2005; GREMSKI *et al.*, 2010). A atividade sinérgica de tais moléculas é apontada como responsável pelos efeitos deletérios ocasionados pelo envenenamento (GEREN *et al.*, 1976; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005).

Muitos componentes do veneno loxoscélico já foram identificados e caracterizados a nível bioquímico e/ou biológico, a exemplo das fosfolipases-D (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008), metaloproteases (da SILVEIRA *et al.*, 2002; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010); hialuronidases (da SILVEIRA *et al.*, 2002) e serinoproteases (VEIGA *et al.*, 2000). Embora todas essas toxinas tenham sido descritas, o conteúdo total do veneno ainda não é esclarecido.

Os constituintes dos venenos de aranhas mais estudados são os peptídeos. Tais toxinas, em sua maioria, são moléculas pequenas e compactas, com massa molecular variando de 3 a 10 kDa e apresentam 3 a 5 pontes dissulfeto intracadeia, as quais estabelecem um motivo estrutural denominado “nó de cistina inibidor”, ICK (Inhibitor Cystine Knot) (KOZLOV *et al.*, 2005). Devido à formação desse nó (*knot*, no inglês) em sua estrutura, esses peptídeos são denominados Notinas (do inglês, *knottins*). As notinas atuam sobre o sistema nervoso, auxiliando na paralisia e captura da presa, em geral, insetos. O mecanismo de ação das notinas está associado à interação com canais iônicos específicos dos neurônios do sistema nervoso central e periférico, modulando a geração e propagação de potenciais de ação através das membranas (de LIMA *et al.*, 2007). Muitas notinas são capazes de interagir e exercer atividade sobre canais iônicos de mamíferos devido às homologias existentes com os canais iônicos de insetos (ESTRADA; VILLEGAS; CORZO, 2007).

As notinas do veneno de *L. intermedia* foram pouco estudadas até hoje. Em um dos poucos estudos descritos na literatura, De Castro e colaboradores (2004) caracterizaram 3 peptídeos dessa família com atividade inseticida sobre pragas agrícolas. O trabalho mais recente que identifica tais peptídeos em *L. intermedia* é o transcriptoma desenvolvido por Gremski e colaboradores (2010), o qual revelou que os transcritos para notinas foram os mais abundantes.

A propriedade das notinas de interagir com canais iônicos do sistema nervoso de insetos e mamíferos revela um grande potencial de utilização dessas moléculas para propósitos biotecnológicos e terapêuticos. A especificidade das notinas sobre canais iônicos de insetos pode levar ao desenvolvimento de um bioinseticida eficaz no combate a pragas de interesse econômico e insetos vetores de doenças emergentes. Por atuarem sobre canais iônicos de mamíferos, podem auxiliar no mapeamento de sítios moleculares específicos envolvidos em processos fisiológicos e neuropatologias, além de fornecerem informações importantes para o desenvolvimento de novas drogas (BAILEY; WILCE, 2001; ESCOUBAS; QUINTON; NICHOLSON, 2008).

Dado o grande potencial de utilização das toxinas presentes em venenos para diversas finalidades, muitos estudos têm sido conduzidos com o propósito de identificar, isolar e testar suas propriedades. Metodologias relativas à manipulação de DNA e RNA são frequentemente empregada, pois permitem a construção de vastas bibliotecas de transcritos, as quais identificam os constituintes moleculares presentes nos venenos (GREMSKI *et al.*, 2010). A partir da elucidação do conteúdo total, abordagens de clonagem e expressão heteróloga podem ser realizadas, obtendo-se as toxinas isoladas para a realização de ensaios biológicos e prospecção das possíveis aplicações na indústria farmacêutica e agroquímica, por exemplo. Portanto, a grande representatividade das notinas no veneno de *L. intermedia* aliada às inúmeras possibilidades de emprego dessas moléculas as tornam importantes alvos de estudos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Obtenção de um peptídeo da família das notinas presente no veneno de *Loxosceles intermedia* em sua forma recombinante purificada.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção da sequência completa do cDNA referente ao peptídeo do tipo notina presente no veneno da aranha-marrom *Loxosceles intermedia*;
- Obtenção do peptídeo da família das notinas subclonado em vetor de expressão plasmidial;
- Padronização das melhores condições de expressão heteróloga para o peptídeo em questão em modelo bacteriano;
- Obtenção do peptídeo recombinante purificado para a posterior realização de ensaios biológicos *in vivo* e *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aranhas: características anatômicas e filogenia

As aranhas são artrópodes terrestres que possuem o corpo dividido em cefalotórax e abdômen, unidos por um estreito pedicelo (Figura 1A) (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

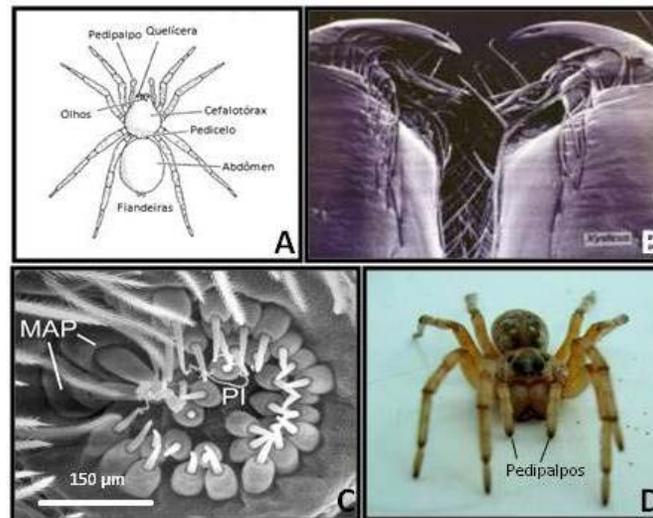


FIGURA 1: CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DAS ARANHAS. (A) Esquema mostrando a morfologia externa (Adaptado de: BRUSCA; BRUSCA, 2003); (B) Detalhe das quelíceras de um espécime mostrando a presa com o orifício por onde sai o veneno (Adaptado de: BRUSCA; BRUSCA, 2003); (C) Detalhe de fiandeira de uma aranha do gênero *Matachias australis* (Adaptado de: California Academy of Science, disponível no site <http://researcharchive.calacademy.org/research/entomology/Entomology_Resources/Arachnida/Atlas_of_Entelegynae.html>, acessado em 10/12/2009); (D) Detalhe do pedipalpo de aranha do gênero *Tetrallycosa* (Adaptado de: Catalogue of Organisms, disponível no site <http://coo.fieldofscience.com/2010_06_01_archive.html>, acessado em 10/12/2010).

O cefalotórax suporta os olhos, as glândulas de veneno, um par de quelíceras, um par de pedipalpos e os 4 pares de pernas. As quelíceras (Figura 1B) são apêndices subdivididos em um segmento basal e um segmento distal, a presa, a qual geralmente porta um poro associado ao ducto da glândula de veneno. Os pedipalpos (Figura 1D) são apêndices relacionados a diferentes funções de acordo com a espécie de aranha (sensorial, manuseio de alimentos, transferência de espermatozóides, locomoção, entre outras). O abdômen

caracteriza-se por conter em sua extremidade posterior estruturas denominadas fiandeiras (Figura 1C), as quais produzem o material utilizado para a confecção das teias. Além disso, o abdômen também abriga os sistemas respiratório, circulatório, digestivo e reprodutor (RASH; HODGSON, 2002; BRUSCA; BRUSCA, 2003; KING, 2004; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

As aranhas pertencem a um grupo evolutivamente antigo, com o mais velho fóssil datado de 300 milhões de anos e, à exceção dos insetos, são os invertebrados terrestres mais diversos e bem-sucedidos (RASH; HODGSON, 2002; KING, 2004). Estima-se que 40 mil espécies já tenham sido descritas e que mais 100 mil ainda não foram caracterizadas (PLATNICK, 1993; ESCOUBAS; DIOCHORT; CORZO, 2000).

Taxonomicamente, as aranhas estão incluídas no filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Araneae. A ordem Aranea pode ainda ser dividida nas subordens Mesothelae e Opisthothelae (Figura 2) (KING, 2004).

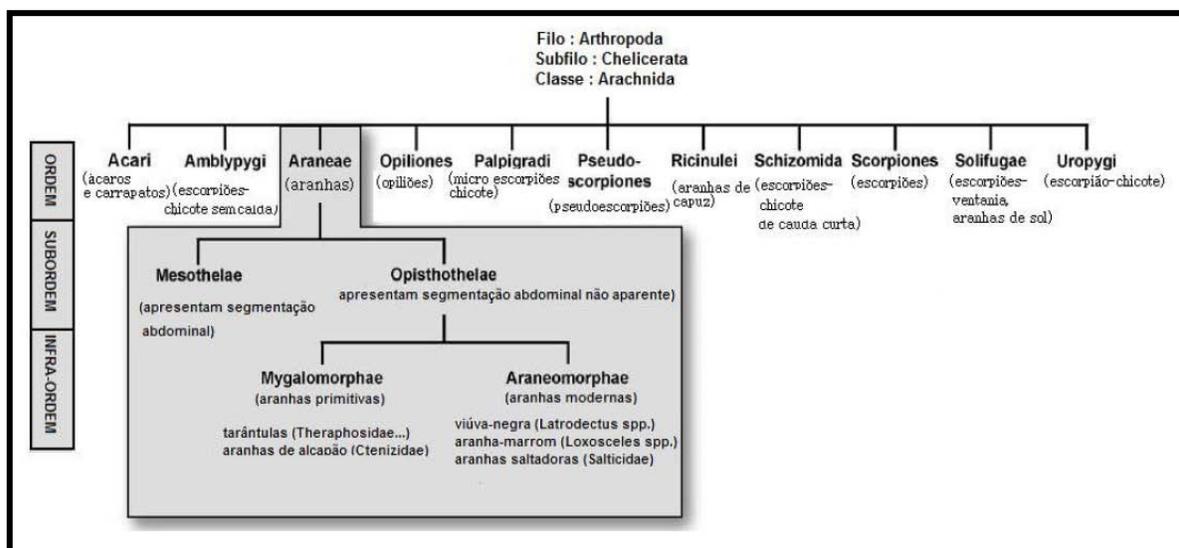


FIGURA 2: VISÃO GERAL DA FILOGENIA DAS ARANHAS. (Adaptado de: KING, 2004; GUIMARÃES, 2009).

As aranhas Mesothelae apresentam segmentação abdominal aparente e constituem uma única família, Liphistiidae, com 85 espécies documentadas. As aranhas Opisthothelae apresentam segmentação abdominal não aparente e são subdivididas em Mygalomorphae e Araneomorphae de acordo com a posição das

quelíceras. As Mygalomorphae portam quelíceras projetadas à frente do cefalotórax, com as presas voltadas para baixo, enquanto que as Araneomorphae possuem quelíceras e presas que se movem lateralmente, como pinças (CODDINGTON; LEVI, 1991; RASH; HODGSON, 2002; KING, 2004).

Apesar da imensa diversidade biológica e ecológica das aranhas, somente poucas espécies estão relacionadas com acidentes envolvendo humanos (ISBISTER; WHITE, 2004). As espécies de aranhas mais perigosas presentes no Brasil estão incluídas na infra-ordem Araneomorphae e pertencem aos gêneros *Latrodectus* (viúva negra), *Phoneutria* (aranha armadeira) e *Loxosceles* (aranha-marrom). Muitos casos de envenenamento e até mesmo de mortalidade registrados estão associados com aranhas dos gêneros citados (ESCOUBAS; DIOCHORT; CORZO, 2000).

3.2 Aranhas do gênero *Loxosceles*: identificação e biologia

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, subordem Araneomorphae, ordem Araneae, classe Arachnida, subfilo Chelicerata e filo Arthropoda (PLATNICK, 2009). São popularmente conhecidas como aranhas-marrons por apresentarem coloração característica que varia de marrom claro a marrom escuro; esta variação entre as diferentes aranhas do gênero *Loxosceles* auxilia na distinção e identificação das espécies. Podem também ser identificadas por um desenho em forma de violino na superfície dorsal do cefalotórax e, por isso, são também conhecidas como aranhas-violino (Figura 3A) (FUTRELL, 1992; MÁLAQUE *et al.*, 2002; SWANSON; VETTER, 2006; VETTER; ISBISTER, 2008). Outro método consistente de identificação das aranhas-marrons é o padrão dos olhos: elas exibem 6 olhos arranjados em pares sobre o cefalotórax, em uma disposição em semicírculo característica deste gênero (Figura 3B) (FUTRELL, 1992; VETTER; VISSCHER, 1998; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). O padrão de distribuição dos olhos é invariável entre as espécies do gênero, enquanto que o formato de violino pode variar de acordo com o tamanho e coloração das diferentes espécies (SWANSON; VETTER, 2006).

Morfologicamente, apresentam comprimento corporal variando de 8 a 15 mm e pernas medindo de 8 a 30 mm (da SILVA *et al.*, 2004). Apresentam acentuado dimorfismo sexual, sendo que as fêmeas, normalmente, apresentam corpo maior e pernas mais curtas que os machos (Figura 3C) (GILBERT, 1997). Ambos os sexos são venenosos, mas acredita-se que em acidentes com humanos, o efeito tóxico do veneno das fêmeas é mais intenso uma vez que estas produzem uma quantidade maior de veneno (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

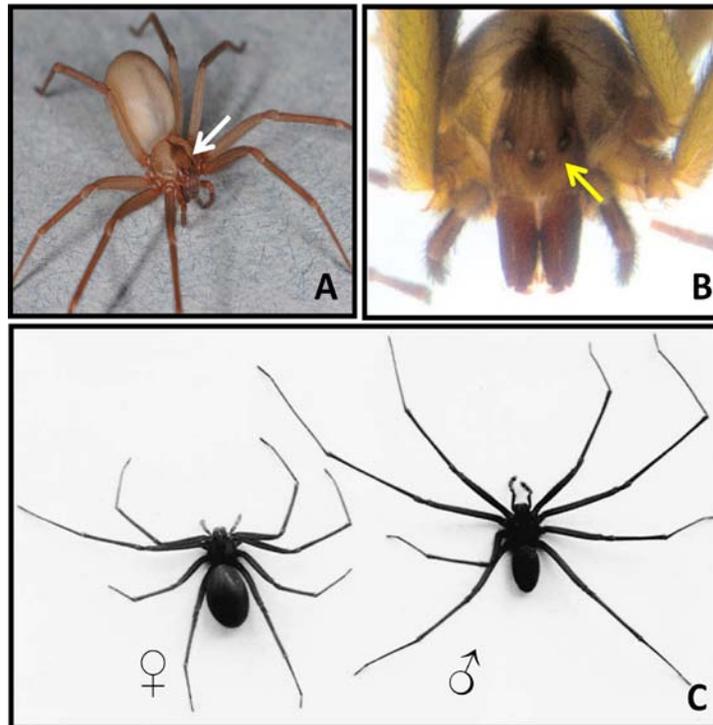


FIGURA 3: IDENTIFICAÇÃO DAS ARANHAS-MARRONS (GÊNERO *Loxosceles*). (A) Em detalhe (seta branca), desenho de violino característico sobre o cefalotórax de aranhas do gênero *Loxosceles* (Adaptado de: VETTER, 2008). (B) Disposição característica dos olhos: 6 olhos distribuídos em pares (Adaptado de: SWANSON; VETTER, 2006). (C) Dimorfismo sexual nas aranhas *Loxosceles* (Adaptado de: da SILVA *et al.*, 2004).

O gênero *Loxosceles* é amplamente distribuído pelo mundo, estando presente nas Américas, Europa, África, Ásia e Oceania (da SILVA *et al.*, 2004). Possui mais de 100 espécies que têm como centro de origem a África e as Américas (MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005). Atualmente verifica-se a existência de 10 espécies de aranha-marrom no Brasil (PLATNICK, 2007), sendo

que quatro dessas espécies registradas estão presentes no estado Paraná: *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. hirsuta* (FISCHER; VASCONCELLOS-NETO, 2005; MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005).

As aranhas-marrons são sedentárias e possuem hábitos noturnos (ANDRADE *et al.*, 1999), alimentando-se de pequenos insetos e servindo de alimento para anfíbios, répteis e aves. Ao atingirem um ano de vida, adquirem maturidade sexual (FISCHER, 1996). Apresentam grande tolerância a temperaturas extremas e são encontradas em regiões frias e desérticas (FISCHER; VESCONCELLOS-NETO, 2005). Em habitat natural podem ser encontradas em lugares escuros como, por exemplo, em telhas empilhadas, em entulhos, em cavidades de rochas e em restos de vegetais. No ambiente intradomiciliar, essas aranhas podem ser encontradas atrás de quadros, sob a mobília, em gavetas e entre as roupas. Costumam se adaptar a lugares sombrios e com pouca higiene (FUTRELL, 1992; FISCHER; VASCONCELLOS-NETO, 2005).

Essas aranhas não são agressivas e a maior incidência de acidentes com o homem deve-se ao fato da aranha marrom ter adquirido hábitos intradomiciliares. Grande parte dos acidentes ocorre quando as pessoas comprimem inadvertidamente a aranha ao vestir-se, enxugar-se ou durante o sono, ocorrendo a picada no homem apenas como forma de defesa (FUTRELL, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1993).

3.3 Epidemiologia da aranha-marrom

Acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles* têm sido descritos desde a década de 1950 (ROSENFELD *et al.*, 1957; ATKINS *et al.*, 1958). Atualmente, o loxoscelismo é considerado a forma mais importante de araneísmo no Brasil devido ao alto número de acidentes notificados no sul e sudeste do país, onde as espécies *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* são principalmente encontradas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

No Brasil, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (SINAN), dos acidentes araneídeos (acidentes causados por aranhas dos gêneros *Phoneutria*, *Loxosceles*, *Lactrodectus* e outras aranhas) notificados entre 2001 e 2008 (n= 138.153), 42,6% dos casos (n= 58.823) são atribuídos a aranhas do gênero *Loxosceles* (SINAN, 2009). No ano de 2010, o SINAN registrou 10120 acidentes com aranhas reconhecidas, sendo, aproximadamente, 43% dessas ocorrências associados a aranhas do gênero *Loxosceles*. As notificações de acidentes loxoscélicos realizadas pelo Estado do Paraná representaram 75,9% (n= 44.656) dos dados do país, sendo a espécie *L. intermedia* a que predomina nas áreas urbanas do Paraná e Santa Catarina (RIBEIRO *et al.*, 1993). De acordo com dados fornecidos pela Secretaria Estadual de Saúde do Paraná (comunicação pessoal, 2011), 7677 acidentes com aranhas foram registrados nos anos de 2009 e 2010 na região de Curitiba. Desses, 6146 estão associados à *Loxosceles*, o que representa, aproximadamente, 81% dos casos notificados. Dada a alta incidência de acidentes, Curitiba e Região Metropolitana são consideradas áreas endêmicas para os acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles*.

3.4 Loxoscelismo

Loxoscelismo é o termo utilizado para designar as manifestações clínicas decorrentes de envenenamentos com aranhas do gênero *Loxosceles* (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Esses envenenamentos geram nos acidentados um conjunto de sinais e sintomas que podem ser caracterizados em duas variantes clínicas distintas: o quadro cutâneo ou dermonecrótico (84% - 97%) e o quadro cutâneo-visceral ou sistêmico (3% - 16%) (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004; da SILVA *et al.*, 2004). O desenvolvimento de um quadro ou outro, ou de ambos e a gravidade do acidente vai depender de alguns fatores relacionados com a espécie da aranha (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001), sexo do animal (OLIVEIRA *et al.*, 1999), seu estágio de desenvolvimento (ANDRADE *et al.*, 1999), quantidade de veneno inoculado, assim como a idade (SEZERINO *et al.*,

1998) e características genéticas do indivíduo acidentado (BARRETO *et al.*, 1985), bem como o estado nutricional, local da picada, susceptibilidade ao veneno e o tempo que este indivíduo leva para procurar um tratamento adequado (GAJARDOTOBAR, 1966; SCHENONE *et al.*, 1989; BARBARO; EICKSTEDT; MOTA, 1994).

O quadro dermonecrótico caracteriza-se por um ponto avermelhado e pouco dolorido no local da picada, que evolui para uma lesão dermonecrótica com espalhamento gravitacional (Figura 4B), em torno de 12 a 48 horas após a picada (APPEL *et al.*, 2005; MILLER; ORTEGON; MCDANIEL, 2007). Após 12 a 24 horas, surge uma área de tecido isquêmico, circundada por um halo vermelho e zonas pálidas, denominados placa marmórea (Figura 4A). Com, o decorrer do tempo, a lesão necrótica adquire coloração violeta escura e um nítido espalhamento gravitacional, aumentando ainda mais área de necrose tecidual. A agressão causada ao acidentado pode produzir ferimentos por longos períodos de tempo, com ulcerações cutâneas persistentes (FUTRELL, 1992; MÀLAQUE *et al.*, 2002; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). Ospedal e colaboradores (2002) descreveram análises histopatológicas que indicam deposição de rede de fibrina intravascular, trombose dos vasos sanguíneos da derme, degeneração das paredes dos vasos, infiltração e agregação de células inflamatórias, bem como infiltrado de neutrófilos, edema e mionecrose de fibrilas no tecido muscular esquelético associado. Esse quadro dermonecrótico, dentro de 3 a 7 dias, pode evoluir para uma grande úlcera auto-limitada. Em alguns casos, é necessária uma cirurgia reparadora no local da lesão (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005).

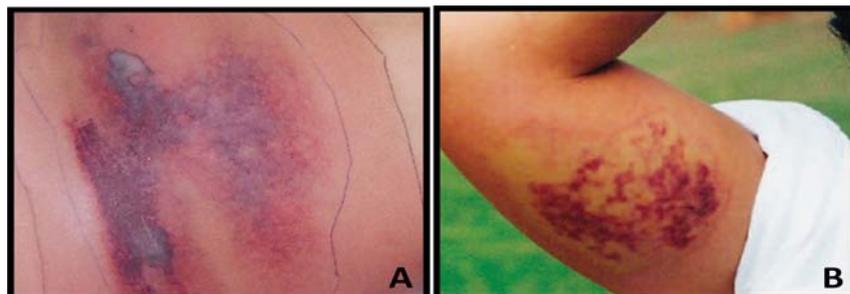


FIGURA 4: QUADRO DERMONECRÓTICO DO LOXOSCELISMO. (A) Necrose e Placa marmórea (área de tecido isquêmico, circundada por um halo vermelho e zonas pálidas).

Adaptado de: CABRERIZO *et al.*, 2009. (B) Espalhamento gravitacional. Adaptado de: HOGAN; WINKEL; BARBARO, 2004.

O quadro sistêmico do loxoscelismo caracteriza-se por astenia, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléia, insônia e, nos casos mais graves, ocorrem convulsões e coma. Pode também ocorrer prurido generalizado e petéquias (MARTINEZ-VARGAS, 1987; SCHENONE *et al.*, 1989; FUTRELL, 1992; BRAVO *et al.*, 1993). Nos casos de gravidade ainda maior, verificam-se alterações no quadro hematológico como, por exemplo, anemia hemolítica, agregação plaquetária causando trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada (DENNY *et al.*, 1964; BASCUR; YEVENES; BARJA, 1982; da SILVA *et al.*, 2004). A insuficiência renal aguda (IRA) também é uma grave complicação do quadro sistêmico, caracterizada por hematúria e hemoglobinúria, muitas vezes refletindo as desordens hematológicas. Em 62% dos casos de loxoscelismo sistêmico, há comprometimento da função renal desencadeada pela insuficiência renal aguda, e conseqüentemente, necrose tubular (SCHENONE *et al.*, 1989; CHAIM *et al.*, 2006). Atribui-se um papel central ao efeito hemolítico para a injúria renal, sugerindo que a presença de hemoglobina livre precipitada ao longo dos néfrons pode retardar o fluxo do fluido tubular e induzir uma resposta patológica identificada pela redução da filtração glomerular, resultando na IRA (COUTINHO, 1996). Dessa forma, a falência renal resultante estaria associada com a diminuição da perfusão renal, em virtude da obstrução da luz tubular, sendo a principal causa de óbito dos pacientes envenenados (WILLIAMS *et al.*, 1995; FUTRELL, 1992; LUNG; MALLORY, 2000; da SILVA *et al.*, 2004).

Luciano e colaboradores (2004) demonstraram a atividade nefrotóxica direta das toxinas presentes no veneno de *L. intermedia* em nível de estruturas glomerulares e tubulares. Análises por microscopia de luz revelaram, em relação aos túbulos, hialinização dos túbulos distais e proximais, vacuolização de células epiteliais dos túbulos e edema intersticial. Foi possível também a observação da ligação direta do veneno ao longo das estruturas tubulares e glomerulares, promovendo colapso glomerular além da deposição de material proteináceo no lúmen dos túbulos (Figura 5A) e a presença de eritrócitos no espaço de Bowman

(Figura 5B), evidenciando dano renal. Dados de microscopia eletrônica de transmissão revelaram alterações incluindo desordens da membrana basal, citotoxicidade de células endoteliais e epitélio glomerular.

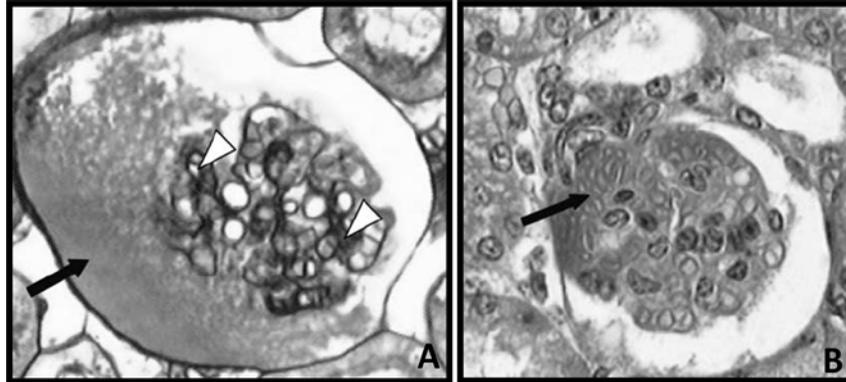


FIGURA 5: QUADRO SISTÊMICO DO LOXOSCELISMO – INDÍCIOS DE DANO RENAL. (A) Deposição de material proteináceo (seta) e colapso da membrana basal (cabeças de seta), indicando dano renal. (B) Presença de eritrócitos no interior da cápsula de Bowman (seta).

3.5 Veneno loxoscélico

O veneno loxoscélico é um líquido incolor e cristalino, produzido por glândulas situadas no cefalotórax da aranha e que se comunicam com o exterior através do aparelho inoculador constituído por um par de quelíceras (Figura 6A e 6B) (MARTINEZ VARGAS, 1987; da SILVEIRA *et al.*, 2002). O volume de veneno produzido pelas glândulas é variável de acordo com o animal (tamanho, sexo e outros fatores), mas dificilmente ultrapassa 4 μ l e contém de 20 μ g a 200 μ g de proteínas totais (SAMS *et al.*, 2001; BINFORD; WELLS, 2003).

O conteúdo total do veneno loxoscélico ainda não é totalmente esclarecido, embora diversos estudos tenham comprovado que sua composição bioquímica consiste em uma mistura complexa de compostos biologicamente ativos, essencialmente proteínas, com ação tóxica e/ou enzimática. Em análises eletroforéticas, verifica-se a predominância de proteínas de baixa massa molecular (3-45 kDa) em detrimento das proteínas de alta massa molecular, as quais são bem menos expressas (Figura 6C) (BARBARO *et al.*, 1992, MOTA; BARBARO,

1995; VEIGA *et al.*, 2000; da SILVEIRA *et al.*, 2002; APPEL *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2005; GREMSKI *et al.*, 2010). Sabe-se que além da grande quantidade de proteínas, a mistura também é constituída por ácidos nucleicos, aminoácidos livres, poliaminas neurotóxicas, monoaminas e sais inorgânicos (ESCOUBAS; DIOCHORT; CORZO, 2000), e acredita-se que a toxicidade do veneno da aranha esteja associada ao efeito combinado ou sinérgico de seus constituintes (GEREN *et al.*, 1976; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005).

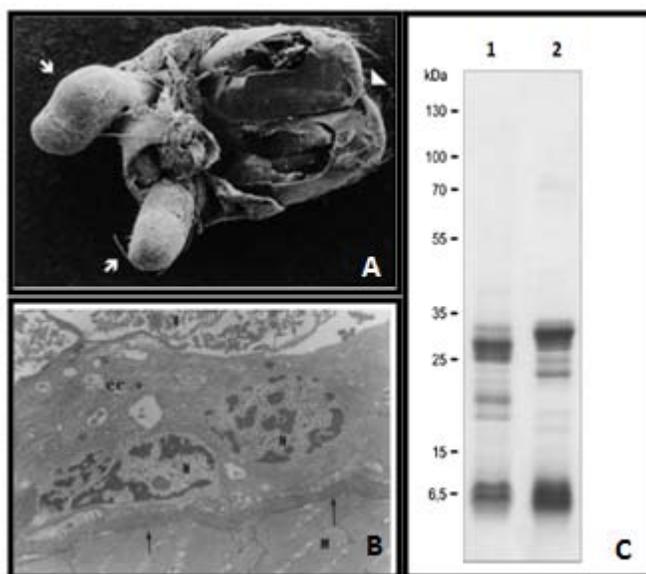


FIGURA 6: APARATO INOCULADOR E GLÂNDULA DE VENENO DE *L. intermedia*. (A) Microscopia eletrônica de varredura do aparato inoculador de veneno. Setas indicam as glândulas de veneno. Cabeça de seta indica as quelíceras. Adaptado de: da SILVEIRA *et al.*, 2002. (B) Microscopia eletrônica de transmissão (magnificação de 6400X) de uma secção transversal da glândula de veneno exibindo camada muscular (M) que envolve a glândula, tecido que separa a camada muscular do epitélio glandular (setas), epitélio glandular (ec), núcleo das células do epitélio glandular (N) e lúmen da glândula (V), onde o veneno é liberado. Adaptado de: dos SANTOS *et al.*, 2000. (C) Perfil eletroforético do veneno de *L. intermedia* (SDS-PAGE 3-18%). Nota-se a predominância de toxinas de baixa massa molecular (3-35 kDa); 1 – amostras não-reduzidas e 2 – amostras reduzidas.

Diversas toxinas tem sido identificadas e caracterizadas bioquimicamente no veneno loxoscélico, entre elas as mais estudadas são as fosfolipases-D (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007a; APPEL *et al.*, 2008), metaloproteases e serinoproteases (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; da SILVEIRA *et al.*, 2007b) e hialuronidases (FUTRELL, 1992; YOUNG; PINCUS, 2001; BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA *et al.*, 2007c).

A família de proteína mais estudada dos venenos loxoscélicos é a das toxinas dermonecróticas ou fosfolipases-D. Estas proteínas possuem diversas regiões conservadas, apresentam resíduos de aminoácidos conservados em seu sítio catalítico, exibem um peptídeo-sinal seguido de um propeptídeo e possuem massa molecular em torno de 30 a 33 kDa (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007). As toxinas dermonecróticas são encontradas em venenos de muitas espécies de aranhas-marrons e foram primeiramente descritas como esfingomielinases-D. Tais toxinas estão intimamente relacionadas ao efeito de necrose observado no local da picada. (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; BARBARO *et al.*, 2005). Em *L. gaucho*, pelo menos 11 isoformas destas toxinas foram encontradas por análise proteômica (MACHADO *et al.*, 2005).

Outra família de toxinas identificadas em venenos loxoscélicos é a família das metaloproteases (da SILVEIRA *et al.*, 2007b; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008). Estas toxinas foram primeiramente descritas no veneno de *L. intermedia* por Feitosa e colaboradores (1998), sendo caracterizadas como moléculas de baixa massa molecular com atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica (20-28 kDa) e gelatinolítica (32-35 kDa). A atividade dessas metaloproteases está possivelmente relacionada a distúrbios hemostáticos decorrentes, tais como hemorragia da derme, injúria de vasos sanguíneos e como um fator de espalhamento gravitacional (característico do loxoscelismo) e sistêmico, facilitando a penetração dos outros componentes do veneno (ZANETTI *et al.*, 2002; da SILVEIRA *et al.*, 2007b; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Da Silveira e colaboradores (2007b) caracterizaram uma isoforma (LALP) de metaloprotease da família das astacinas presente no veneno de *L. intermedia* e outras 2 isoformas (LALP2 e LALP3) foram recentemente descritas por Trevisan-Silva e colaboradores (2010). Este último trabalho também identificou a presença de metaloproteases da família das astacinas no veneno de *L. gaucho* e *L. laeta*, indicando que essas moléculas constituem uma família conservada entre as espécies do mesmo gênero.

Além das fosfolipases-D e das metaloproteases, outra toxina descrita em venenos loxoscélicos é a hialuronidase. As hialuronidases são conhecidas como

“fator de espalhamento gravitacional” e sua presença pode ser potencializadora de outros componentes do veneno no sentido de facilitar a penetração destes na corrente sanguínea e em vários tecidos (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Em *L. intermedia*, foram identificadas duas prováveis isoformas de hialuronidases com massas de 41 e 43 kDa (da SILVEIRA *et al.*, 2007c).

Acredita-se que a toxicidade do veneno da aranha esteja associada ao efeito combinado ou sinérgico de seus constituintes (GEREN *et al.*, 1976; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos nocivos ocasionados por muitas toxinas. Dessa forma, torna-se importante a identificação e o estudo das atividades biológicas geradas por cada um dos componentes do veneno isoladamente.

3.6 Aplicações biotecnológicas das toxinas loxoscélicas

Os venenos animais têm sido amplamente estudados nos últimos anos por representarem uma importante fonte de moléculas biologicamente ativas, com potencial utilização tanto na pesquisa básica, quanto na pesquisa aplicada. Enquanto os mecanismos precisos de ação de muitos constituintes do veneno permanecem desconhecidos, sabe-se que muitos exercem seus efeitos via interação com canais iônicos específicos, enzimas e componentes de membrana. Muitas destas interações fazem dos constituintes do veneno, atrativos candidatos para o desenvolvimento de novas terapias, pesticidas e como *probes* seletivas para moléculas-alvo (BAYLEY; WILCE, 2001).

O principal propósito do veneno de aranhas é paralisar ou matar a presa, e pode estar relacionado à pré-digestão desta. Funcionalmente, o veneno pode servir também como um mecanismo de auto-defesa contra predadores (RASH; HODGSON, 2002; ESCOUBAS, 2006). Para a execução de tais funções, as aranhas desenvolveram um arsenal de moléculas quimicamente distintas em seus venenos. A vasta diversidade de toxinas presentes nos venenos de aranhas-marrons, com as mais variadas atividades bioquímicas e farmacológicas, pressupõe o grande potencial destas moléculas quanto ao seu emprego como

insumos biotecnológicos, ferramentas de estudo ou diagnóstico e na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e aplicações terapêuticas (FURUKAWA; ISHIMARU, 1990; SOUTAR; GINSBERG, 1993; MARKLAND, 1998; KUMAR; TAKAGI, 1999; BAYLEI; WILCE, 2001; BANERJEE; CHISTI; BANERJEE, 2004; KEMPARAJU; GIRISH, 2006).

O estudo de toxinas presentes em venenos loxoscélicos é particularmente difícil devido ao baixo rendimento nas extrações, uma vez que a quantidade de veneno obtido por aranha é mínimo, da ordem de poucos microlitros, e contém no máximo 60 µg de proteínas ou menos (SAMS *et al.*, 2001; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Isso implica em dificuldade para se obter quantidade suficiente de proteínas, a fim de isolá-las e estudá-las em ensaios biológicos. Nesse aspecto, abordagens moleculares, tais como clonagem, expressão heteróloga e purificação de proteínas recombinantes específicas, têm sido amplamente empregadas por representarem alternativas vantajosas para o fornecimento de material em quantidades suficientes para estudos estruturais e funcionais de componentes isolados do veneno (DINIZ *et al.*, 2006).

O primeiro produto biotecnológico proveniente do veneno de aranha marrom surgiu como resultado dos trabalhos de McGLASSON e colaboradores (1993), que descreveram o chamado ARACHase (Hemostasis Diagnostics International Co, Denver, CO, EUA), o qual consiste de plasma normal contendo veneno de *L. reclusa*, capaz de mimetizar as características do Lupus Anticoagulante, sendo assim útil como controle positivo no diagnóstico desta patologia (da SILVEIRA, 2006; CHAIM, 2009).

Vários estudos têm comprovado a reatividade imunológica cruzada dos venenos nativos de diferentes espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* (BARBARO; EICKSTEDT; MOTA, 1994; GOMEZ *et al.*, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2003; BARBARO *et al.*, 2005). Esta propriedade tem possibilitado a utilização de tais venenos para a produção de imunobiológicos (antivenenos) para fins terapêuticos em casos graves de loxoscelismo com complicações sistêmicas (da SILVEIRA, 2006; PAULI *et al.*, 2006). O Ministério da Saúde do Brasil disponibiliza 2 tratamentos terapêuticos para os acidentados: o soro anti-aracnídico e o soro

anti-loxoscélico. O soro polivalente anti-aracnídico é produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, a partir dos venenos brutos de *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* (aranha armadeira), *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* (escorpiões) (BARBARO; EICKSTEDT; MOTA, 1994; BARBARO *et al.*, 1996). Devido à grande ocorrência de acidentes com aranhas marrons no Estado do Paraná, o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) produz o soro anti-loxoscélico poliespecífico, o qual contém anticorpos que reconhecem o veneno das 3 espécies de *Loxosceles* com maior importância médica no país: *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* (da SILVA *et al.*, 2004; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004; PAULI *et al.*, 2006). Três fosfolipases-D recombinantes dos venenos de *L. reclusa*, *L. boneti* e *L. laeta* têm sido utilizadas como imunógenos para a produção de soro antiveneno em cavalos. Tal soro tem sido utilizado em experimentos de inibição da atividade enzimática, o que dá suporte para o uso dessas toxinas recombinantes para a produção comercial do antiveneno (OLVERA *et al.*, 2006).

Ainda em relação à imunogenicidade observada nos venenos loxoscélicos, a produção de anticorpos monoclonais é uma ferramenta muito útil, especialmente quando estes reagentes são utilizados como ferramentas em protocolos de purificação de toxinas nativas e/ou recombinantes, bem como no rastreamento de bibliotecas de expressão de cDNA (da SILVEIRA, 2006).

Muitos são os efeitos biológicos induzidos experimentalmente pelo veneno nativo de *L. intermedia*. Esta propriedade tem possibilitado a utilização biotecnológica do veneno como indutor de citotoxicidade e ferramenta para o estudo dos mecanismos celulares e moleculares do loxoscelismo. Luciano e colaboradores (2004) verificaram danos renais diretamente induzidos pela exposição ao veneno de *L. intermedia* em camundongos. As biópsias desses camundongos tratados revelaram alterações nas estruturas renais tais como deposição de material hialino nos túbulos proximal e distal, presença de eritrócitos no espaço de Bowman, colapso glomerular, edema intersticial, presença de vacuolizações nas células epiteliais glomerulares e deposição de material eosinofílico no lúmen tubular. Essas indicações histopatológicas foram também

reproduzidas por Chaim e colaboradores (2006), indicando a atividade nefrotóxica associada a componentes do veneno de *L. intermedia*. Além de nefrotoxicidade, foi observado também citotoxicidade *in vitro* sobre células endoteliais derivadas da aorta de coelho. As alterações morfológicas consistiram de retração celular, desadesão homofílica, aumento nas projeções filopodiais, desorganização dos pontos de adesão focal, modificações nos padrões de matriz de fibronectina sintetizada por essas células e adesão das mesmas à fibronectina (PALUDO *et al.*, 2006).

Um dos principais efeitos sistêmicos desencadeados pelo envenenamento por aranhas-marrons é a agregação plaquetária, evento este que pode ocasionar trombocitopenia e até mesmo trombose *in vivo* (da SILVA *et al.*, 2004). Outro clássico efeito sistêmico verificado em acidentados com aranha marrom é atividade hemolítica sobre eritrócitos, o qual caracteriza-se por ser direto ou indireto (complemento-dependente). Ambos os processos descritos estão diretamente associados a isoformas nativas de toxinas dermonecróticas (fosfolipases-D), capazes de atuarem como agentes tóxicos no desencadeamento de tais atividades. Nesse contexto, as várias isoformas recombinantes de toxinas dermonecróticas podem ser exploradas biotecnologicamente como reagentes padrões (controle positivo) em protocolos laboratoriais nos quais a agregação plaquetária ou atividade hemolítica estão sendo investigados (FUTRELL, 1992; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

Outra proteína com potencial biotecnológico presente em venenos de aranhas são as hialuronidases, as quais já foram identificadas em *L. reclusa*, *L. rufescens*, *L. gaucho*, *L. deserta*, *L. laeta* e *L. intermedia* (WRIGHT *et al.*, 1973; YOUNG; PINCUS, 2001; BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA *et al.*, 2007c). As hialuronidases medeiam a degradação de ácido hialurônico e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, entre os quais, aumento da permeabilidade do tecido conjuntivo, diminuição da viscosidade dos fluidos corporais, espalhamento de venenos e toxinas, progressão de cânceres, envelhecimento e fertilização (MENZEL; FARR, 1998; SHUSTER *et al.*, 2002; BOTZKI *et al.*, 2004; CHAO *et al.*, 2007; GIRISK; KEMPARAJU, 2007).

Hialuronidases recombinantes podem ser empregadas como insumo para fertilização *in vitro* (KREIL, 1995), além de possíveis aplicações como agentes anti-tumorais (SHUSTER *et al.*, 2002; GIRISK; KEMPARAJU, 2007), antibacterianos (BOTZKI *et al.*, 2004) e como ferramentas farmacológicas em ensaios fisio e fisiopatológicos relacionados à hialuronidase.

3.7 Neurotoxinas

Além das proteínas acima citadas, outras moléculas têm sido identificadas nos venenos de diversas espécies de aranhas. Como o propósito primário de seu veneno é paralisar a presa, as aranhas produzem uma variedade de toxinas com ação sobre o sistema nervoso. Tais moléculas neurotóxicas podem ser agrupadas em 3 grupos diferentes de acordo com sua natureza química, a qual reflete também as respectivas faixas de pesos moleculares: acilpoliaminas (< 1 kDa), peptídeos (3 a 10 kDa) e proteínas de alta massa molecular (> 100 kDa) (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000; de LIMA *et al.*, 2007).

3.7.1 Acilpoliaminas

As acilpoliaminas são toxinas de baixa massa molecular (< 1 kDa), as quais foram primeiramente descritas em aranhas por Kawai e colaboradores (1982), em trabalhos com aranhas do gênero *Nephila clavata*.

Centenas de acilpoliaminas presentes em venenos de aranhas já foram isoladas e tiveram suas estruturas elucidadas. Embora as acilpoliaminas tenham sido extraídas de glândulas de venenos de aranhas de gêneros e nichos ecológicos diferentes, a análise de tais moléculas revelou notável homologia estrutural entre elas: apresentam uma extremidade formada por um grupamento aromático ligado a uma cadeia que compreende de 1 a 9 unidades aminopropil, aminobutil ou aminopentil (*core* poliamínico), às vezes metilada ou hidroxilada, com a presença de um grupamento amino primário ou guanidina na outra extremidade (Figura 7A e 7B) (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000; PALMA;

NAKAJIMA, 2005; NIHEI *et al.*, 2006).

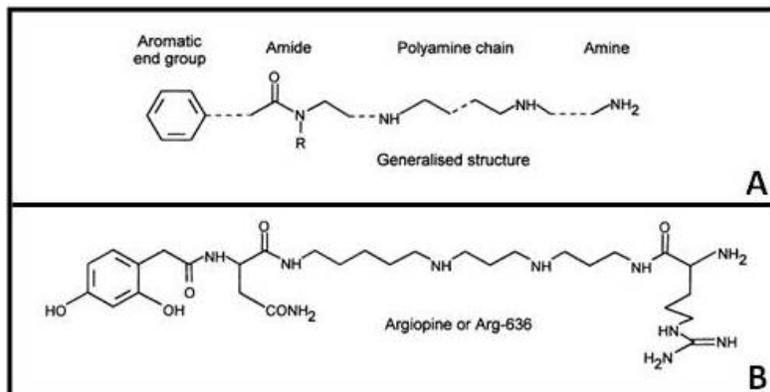


FIGURA 7: ESTRUTURA DAS ACILPOLIAMINAS. (A) Estrutura geral de uma acilpoliamina. Em uma extremidade verifica-se a presença de uma fração hidrofóbica (grupamento aromático), seguida de um *core* linear de grupamentos aminos e um grupamento amino primário na outra extremidade. A ligação da fração hidrofóbica ao *core* poliamínico pode ser dada por meio de uma ligação amida (como mostrado na figura) ou por uma ligação aminoacídica. (B) Acilpoliamina de *Argiope lobata* (Argiopina ou Arg-636) – a primeira acilpoliamina de veneno de aranha a ter sua estrutura determinada por Grishin e colaboradores (1986). Adaptado de: RASH; HODGSON, 2002.

Investigações farmacológicas das toxinas poliamínicas têm mostrado que esses componentes interagem com vários alvos importantes em insetos, tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central. Devido o glutamato ser o mensageiro químico primário na junção neuromuscular de insetos, as acilpoliaminas têm sua ação sobre receptores ionotrópicos para esse neurotransmissor. Mais precisamente, essas toxinas atuam como antagonistas não-competitivos dos receptores de glutamato, alterando a cinética de fechamento ou abertura destes (MELLOR; USHERWOOD, 2004; STROMGAARD; JENSEN; VOGENSEN, 2005). Em algumas espécies as toxinas poliamínicas são os constituintes mais abundantes do veneno e acredita-se que tais moléculas são as principais responsáveis pela paralisação da presa durante o evento predatório (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000).

3.7.2 Neurotoxinas de alta massa molecular

Aranhas do gênero *Latrodectus* (viúvas negras) possuem em seu veneno

uma família de proteínas de alta massa molecular (110 a 140 kDa), as quais compartilham alto grau de identidade estrutural e são denominadas latrotoxinas. Algumas isoformas de latrotoxinas foram classificadas de acordo com sua especificidade. As isoformas inseto-específicas são denominadas latroinsectotoxinas (α , β , γ , δ , ϵ) e são conjuntamente referidas como LITs; uma isoforma, α -latrotoxina (α -LTX), é específica para vertebrados; α -lacrustotoxina (α -LCT) é a isoforma caracterizada como específica para crustáceos (GRISHIN, 1998; ROHOU; NIELD; USHKARYOV, 2007). Em ensaios eletrofisiológicos, todas as isoformas de latrotoxinas apresentaram como atividade biológica a estimulação da liberação de neurotransmissores a partir dos terminais nervosos nos animais apropriados, levando à paralisia e/ou mortes desses (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000; RASH; HODGSON, 2002).

Estudos com a α -LTX, específica para vertebrados, revelaram o possível mecanismo de ação dessas moléculas. A presença de íons Ca^{2+} possibilita a organização dessas toxinas em tetrâmeros simétricos, os quais estabelecem um estreito poro em seu centro (aproximadamente 10Å de diâmetro). Tais tetrâmeros seriam capazes de se inserir na bicamada lipídica dos terminais pré-sinápticos e, assim, permitir o influxo de íons Ca^{2+} , o que levaria à exocitose dos neuromediadores. A ligação do tetrâmero de α -LTX à bicamada lipídica, que precede a sua incorporação na membrana, é mediada por receptores específicos. Alguns desses receptores já foram identificados como por exemplo a neurexina Ia, latrofilina e tirosino-fosfatase σ . Comprovou-se também que o efeito tóxico das latrotoxinas vai além da formação de um poro através da membrana: α -LTX é capaz, após se ligar aos receptores latrofilina ou tirosino-fosfatase σ , de modular a atividade da fosfolipase-C e causar liberação de íons Ca^{2+} a partir de compartimentos intracelulares, o que auxiliaria no desencadeamento da exocitose dos neurotransmissores (ASHTON *et al.*, 2000; USHKARYOV, 2002; VASSILEVSKY; KOZLOV; GRISHIN, 2009).

Dessa forma, nota-se que a α -LTX consiste em um instrumento eficiente para a investigação dos processos moleculares relacionados à exocitose de neuromediadores. Investigações adicionais das latrotoxinas e seus mediadores

serão de grande importância para o reconhecimento dos mecanismos moleculares de neurosecreção (VASSILEVSKY; KOZLOV; GRISHIN, 2009).

3.7.3 Peptídeos da família das Notinas

Em termos evolutivos, as aranhas são os animais predadores mais bem-sucedidos e mantêm o maior “*pool*” de peptídeos tóxicos (SOLLOD *et al.*, 2005). Tais peptídeos são considerados os principais componentes dos venenos de aranhas e, juntamente com as acilpoliaminas, parecem representar o seu principal arsenal tóxico (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000).

Apesar do maior conjunto de peptídeos tóxicos, os venenos de aranhas têm sido muito menos estudados em relação aos venenos de outros animais. Poucos estudos têm examinados os mecanismos genéticos subjacentes pelos quais as aranhas geram essa diversidade de peptídeos em seus venenos. Sollod e colaboradores (2005) sugerem, a partir de dados obtidos em trabalhos com aranhas australianas da família Hexathelidae (“*funnel-web spiders*”), que as aranhas, assim como os escorpiões e caramujos marinhos (“*cone snails*”), têm diversificado seu repertório de peptídeos tóxicos pela duplicação de genes ancestrais seguido de mutações nos *loci* relacionados à toxina madura.

A análise das mais de 500 sequências aminoacídicas e das, aproximadamente, 30 estruturas tridimensionais de peptídeos de aranhas já descritas demonstram que esses peptídeos apresentam tipicamente massa que varia de 3 a 10 kDa e um alto número de resíduos de cisteína em sua estrutura primária. Na grande maioria dos peptídeos presentes nos venenos de aranhas, muitos desses resíduos estabelecem pontes dissulfeto intracadeia, as quais se organizam de forma a compor um motivo estrutural denominado “nó de cistina inibidor”, ICK (Inhibitor Cystine Knot) (Figura 8A) (MAGGIO *et al.*, 2004; FERRAT; DARBON, 2005; VASSILEVSKI; KOZLOV; GRISHIN, 2009). Esse motivo é caracterizado por cadeias β anti-paralelas estabilizadas por um nó de cistina, o qual compreende um anel formado por duas pontes dissulfeto que são cruzadas por uma terceira, criando uma espécie de nó na estrutura do peptídeo (Figura 8B

E 8C) (CRAIK; DALY; WAINE, 2001). Devido a essa conformação, esses peptídeos são denominados notinas (do inglês, “knottins”).

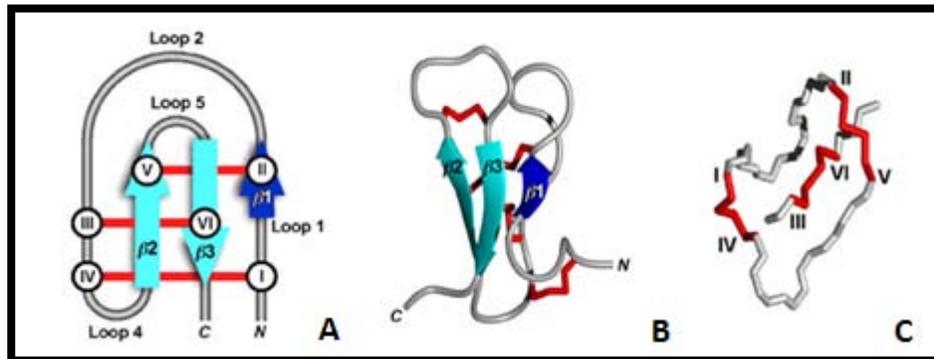


FIGURA 8: NOTINAS E MOTIVO ESTRUTURAL NÓ DE CISTINA INIBIDOR (ICK). (A) Representação esquemática do motivo ICK. (B) Estrutura tridimensional de uma notina de *Parocelotes luctuosus* (δ -palut2). (C) Estrutura tridimensional do nó de cistina, o qual estabiliza a estrutura das notinas. Em vermelho, pontes dissulfeto intracadeia que se estabelecem entre os resíduos de cisteína (I-VI). Setas longas indicam cadeias β antiparalelas sempre presentes nas notinas. Seta curta indica a terceira cadeia β que pode estar presente ou ausente. Adaptado de: NICHOLSON, 2007.

As notinas são as toxinas mais bem estudadas e exercem seus efeitos através da interação com canais iônicos e receptores específicos presentes nas junções neuromusculares e/ou sinapses do sistema nervoso central de insetos, causando paralisia. Embora dados farmacológicos ainda sejam escassos, toxinas inseticidas de artrópodes parecem afetar principalmente canais de sódio e cálcio. Entretanto, notinas atuando em canais de potássio também já foram descritas (de LIMA *et al.*, 2007).

Os canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem constituem um dos alvos para algumas notinas produzidas por aranhas. Esses canais permitem a entrada do Ca^{2+} na célula, em resposta à despolarização da membrana, de forma que esses íons possam exercer suas funções sobre processos fisiológicos específicos, tais como a secreção de neurotransmissores (BELEBONI *et al.* 2004). Branton e colaboradores (1987) isolaram uma notina da aranha *Plecteurys tristis*, denominada PLTX-II, a qual demonstrou em ensaios eletrofisiológicos ser capaz de bloquear irreversivelmente canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do terminal pré-sináptico da junção neuromuscular de *Drosophila*. Esse bloqueio

impede a entrada de íons Ca^{2+} e a consequente liberação de neurotransmissores, levando à paralisia. Os mesmos resultados descritos acima foram obtidos através de estudos com uma notina da aranha *Hololena curta*, em neurônios de *Drosophila* cultivados *in vitro* (LEUNG *et al.*, 1989). Concentrações nanomolares da notina ω -ACTX-Hv2a (Figura 9A e 9B) isoladas a partir do veneno da aranha australiana *Hadronyche versuta* foram capazes de inibir correntes através de canais de cálcio em neurônios de *Apis mellifera* de forma praticamente irreversível, evidenciando grande potencial como antagonistas desse tipo de canal (WANG *et al.*, 2001).

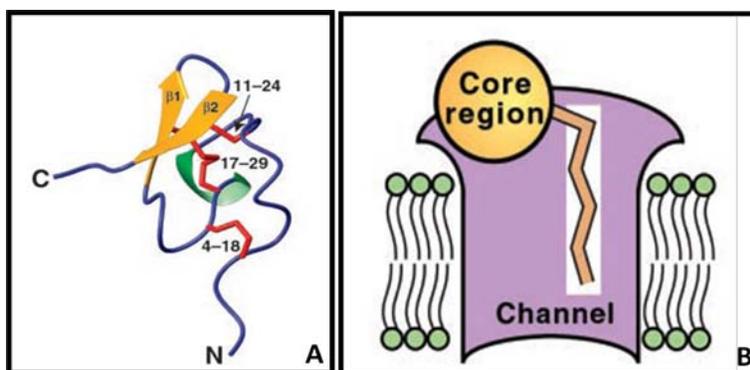


FIGURA 9: ω -ACTX-Hv2a – Notina de *Hadronyche versuta*. (A) Estrutura molecular. Em amarelo, as duas cadeias betas antiparalelas que são estabilizadas pelo nó de cistina, composto pelas pontes dissulfeto (em vermelho). Os números indicam a posição relativa dos resíduos de cisteínas que compõem as pontes dissulfeto na estrutura primária do peptídeo. (B) Modelo hipotético do mecanismo de ação de ω -ACTX-Hv2a com o canal de cálcio dependente de voltagem. Adaptado de: WANG *et al.*, 2001.

Os canais de sódio (Na^+) dependentes de voltagem medeiam o aumento da condutância ao Na^+ durante a rápida fase de despolarização do potencial de ação. Dessa forma, esse canal representa um elemento estrutural chave que controla a excitabilidade celular em sistemas biológicos. Não é surpreendente, portanto, que esse tipo de canal seja alvo de uma variedade de toxinas de animais que os auxilia no combate a predadores ou na captura de suas presas (NICHOLSON, 2007). Várias toxinas isoladas a partir de venenos de aranhas já foram caracterizadas como antagonistas de canais de sódio dependente de voltagem. Corzo e colaboradores (2000) isolaram e caracterizaram 4 notinas presentes no veneno de *Paracoelotes luctuosos*. Essas notinas foram denominadas δ -

palutoxinas IT1 até IT4. Ensaios biológicos de microinjeção em larvas de *Spodoptera litura* revelaram alta toxicidade dessas toxinas para insetos. Ensaios eletrofisiológicos com δ -palutoxina IT1 sintética forneceram indícios de que essas notinas atuam *in vivo* retardando a inativação de canais de Na^+ dependentes de voltagem durante o potencial de ação, resultando em alta letalidade. Nottinas isoladas a partir do veneno de *Agelenopsis aperta*, denominadas μ -agatoxinas, apresentam atividade biológica semelhante às δ -palutoxinas de *P. luctuosos*, aumentando o influxo de sódio por retardar a inativação dos canais de Na^+ dependentes de voltagem. Em experimentos com larvas de *Manduca sexta* (SKINNER *et al.*, 1989) e *Musca domestica* (ADAMS *et al.*, 1989) observou-se paralisia excitatória após microinjeção de μ -agatoxinas. Isso se deve à manutenção do influxo de Na^+ por maior tempo, ocasionando maior liberação de neurotransmissores e frequência aumentada de potenciais excitatórios em motoneurônios desses insetos (SKINNER *et al.*, 1989; NICHOLSON, 2007). A partir de estudos eletrofisiológicos em axônios gigantes dissecados do cordão nervoso abdominal de baratas e sensibilizados por uma notina de *Phoneutria nigriventer*, Tx4(1-6), De Lima e colaboradores (2002) observaram a mesma manutenção prolongada do influxo de Na^+ e geração de potenciais de ação repetitivos (KING *et al.*, 2008).

Até o momento, uma única família de notinas com ação sobre canais de potássio inseto-específicos foi descrita. As J-ACTXs (“*Janus-faced atracotoxins*”), extraídas de aranhas dos gêneros *Atrax* e *Hadronyche*, são neurotoxinas excitatórias que parecem atuar diretamente no sistema nervoso de insetos (TEDFORD *et al.*, 2004). Estudos conduzidos por Wang e colaboradores (2000) e por Maggio e King (2002) caracterizaram as J-ACTXs como potentes toxinas contra uma ampla gama de insetos ortópteros e dípteros. Ensaios com aplicação direta da notina J-ACTX-Hv1c aos gânglios metatorácicos resultaram em movimentos espontâneos descoordenados das pernas de *P. americana*. A interação com canais de potássio foi confirmada em ensaios eletrofisiológicos nos quais foi verificado que J-ACTX-Hv1c bloqueia especificamente correntes de K^+ nos neurônios de baratas (TEDFORD *et al.*, 2004).

Muitos estudos têm mostrado que as neurotoxinas purificadas a partir de venenos apresentam alta especificidade a animais pertencentes a diversos filos. A existência de componentes tóxicos distintos com especificidade sobre mamíferos e insetos foi primeiramente mostrada em venenos de *Latrodectus tredecimguttatus* (viúva-negra) (FRONTALI; GRASSO, 1964) e mais tarde em venenos dos escorpiões *Leiurus quinquestriatus* e *Andrictinus australis* (ZLOTKIN *et al.*, 1972). Esses trabalhos discriminaram peptídeos com letalidade em camundongos e peptídeos com atividade biológica sobre insetos. Algumas proteínas, entretanto, foram caracterizadas como tóxicas ou apresentaram atividades farmacológicas sobre mais de um grupo de animais, não exibindo estrita especificidade (de LIMA *et al.*, 2007). Assim, muitas notinas isoladas dos venenos de aranhas apresentam amplo espectro de ação sobre o sistema nervoso de mamíferos, por exemplo. Isso se deve às homologias existentes entre os canais iônicos/receptores de invertebrados e vertebrados (ESTRADA; VILLEGAS; CORZO, 2007).

Muitos estudos caracterizaram a ação de peptídeos do tipo notina de aranhas em mamíferos. Guatimosin e colaboradores (1997) demonstraram que as notinas Tx3-3 e Tx3-4 de *Phoneutria nigriventer* inibiram o influxo de Ca^{2+} em sinaptossomas cerebrocorticais de ratos, sugerindo que essas toxinas são antagonistas de canais de Ca^{2+} do tipo P/Q em mamíferos. Outras toxinas de *P. Nigriventer* (Tx3-2 e Tx3-5) inibiram irreversivelmente canais de Ca^{+} do tipo L em células pituitárias da linhagem GH3 (LEÃO *et al.*, 1997; KALAPOTHAKIS *et al.*, 1998). A notina SNX-325 presente no veneno da aranha *Segestria florentina* mostrou-se, em concentrações nanomolares, ser um bloqueador seletivo de canais de Ca^{2+} do tipo N (NEWCOMB *et al.*, 1995; RASH; HODGSON, 2002). Estudos também relatam a modulação de canais de Na^{+} de vertebrados por notinas isoladas de venenos de aranhas. Xiao e Liang (2003), estudando a notina Hainantoxina-IV (HNTX-IV) de *Selenocosmia hainana*, mostraram através da técnica de *patch-clamp* que essa toxina inibia canais de Na^{+} sensíveis a tetrodotoxina (TTX) em neurônios de ratos. Outra notina, TRTX-Tp2a do veneno de *Thrixopelma pruriens*, foi caracterizada como antagonistas de canais de Na^{+} dependentes de voltagem por Schmalhofer e colaboradores (2008); quando

injetada via intravenosa ou por administração intratecal mostrou-se letal para ratos. A literatura também relata notinas que apresentam atividade biológica sobre canais de K^+ de vertebrados. Diochot e colaboradores (1999) purificaram a notina PaTx1 a partir do veneno da aranha *Phrixotrichus auratus* e verificaram que essa toxina era capaz de bloquear correntes de K^+ através de canais de K^+ do tipo Kv4.3 e Kv4.2 por alterar sua dinâmica de ativação/inativação; quando injetada via intravenosa em camundongos, foram verificadas numerosas reações cardíacas adversas, a exemplo de taquicardia ventricular. PaTx1 também mostrou bloquear correntes de K^+ em cardiomiócitos murinos cultivados *in vitro*. Outras notinas caracterizadas como antagonistas de canais de K^+ foram isoladas do veneno de *Grammostola spatulata* por Swartz e Mackinnon (1995): HaTx1 e HaTx2 foram capazes de inibir canais de K^+ dependentes de voltagem de cérebro de rato expressos em oócitos de *Xenopus*.

3.7.4 Notinas em veneno de *L. intermedia*

As notinas foram descritas pela primeira vez em veneno de *L. intermedia* por de Castro e colaboradores (2004). Por meio de várias metodologias de cromatografia foram isoladas 3 notinas, as quais foram denominadas LiTx1, LiTx2 e LiTx3. Posteriormente, a sequência de uma quarta notina (LiTx4) foi depositada no *GenBank*. As toxinas purificadas apresentaram massa molecular variando de 5,6 a 7,9 kDa e atividade inseticida contra as pragas de interesse econômico *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera cosmioides*. Análises de similaridade de sequências indicaram que essas moléculas atuam sobre canais iônicos específicos de membranas do sistema nervoso de insetos (de CASTRO *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2010).

Com o propósito de determinar o perfil de moléculas expressas, Gremski e colaboradores (2010) produziram o transcriptoma da glândula de veneno da aranha-marrom *L. intermedia*. Este estudo revelou que 43,5% das ESTs (“*Expression Sequence Tags*”) anotadas eram codificadoras de toxinas (Figura 10A). Entre essas sequências relativas a toxinas, verificou-se que a maioria estava

relacionada com peptídeos da família das notinas.

Os dados obtidos por Gremski e colaboradores (2010) revelaram que os transcritos referentes à LiTx3 foram os mais abundantes, representando 13,9% de todas as ESTs anotadas. Tomando como referência somente as sequências codificadoras de toxinas, 32% apresentaram similaridade com LiTx3 (Figura 10B e Figura 11).

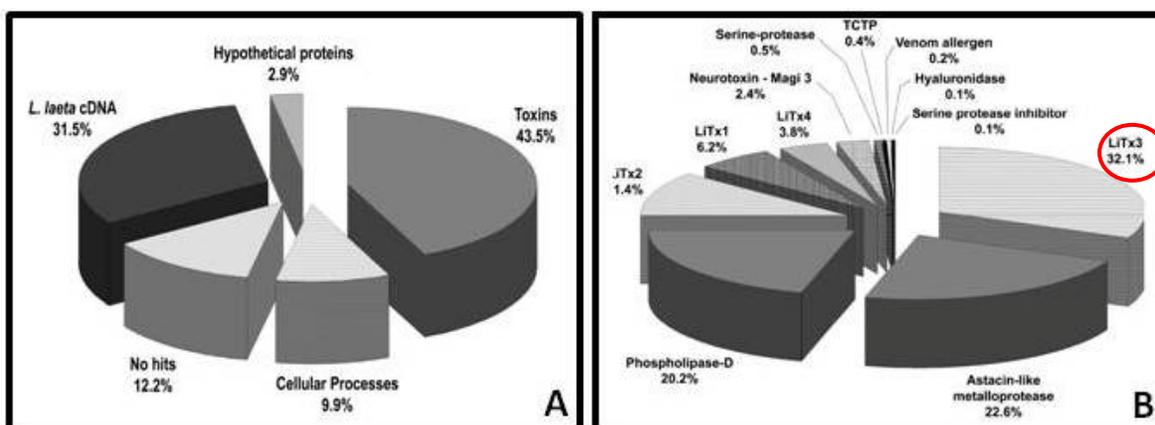


FIGURA 10: TRANSCRIPTOMA DE *L. intermedia*. (A) Porcentagens dos transcritos agrupados de acordo com suas classes. (B) Proporções relativas de cada grupo de toxinas em relação ao total de transcritos codificadores de toxinas gerados. Adaptado de: GREMSKI *et al.*, 2010.

Tendo em vista a propriedade das notinas de interagir com canais iônicos, torna-se clara a potencial utilização dessas toxinas em estudos estruturais e funcionais sobre esses canais, bem como o mapeamento de sítios específicos que podem ser de interesse como alvo para novas drogas. Além disso, o fato de muitas notinas serem inseto-específicas permite explorá-las como possíveis insumos no desenvolvimento de bioinseticidas para o controle de pragas de interesse econômico ou insetos vetores de doenças.

Dessa forma, este trabalho visa contribuir com os estudos acerca dos peptídeos da família das notinas, dada a grande representatividade dessas moléculas verificada por meio do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* e a escassez de dados na literatura, bem como o potencial de emprego dessas moléculas para fins biotecnológicos e terapêuticos.

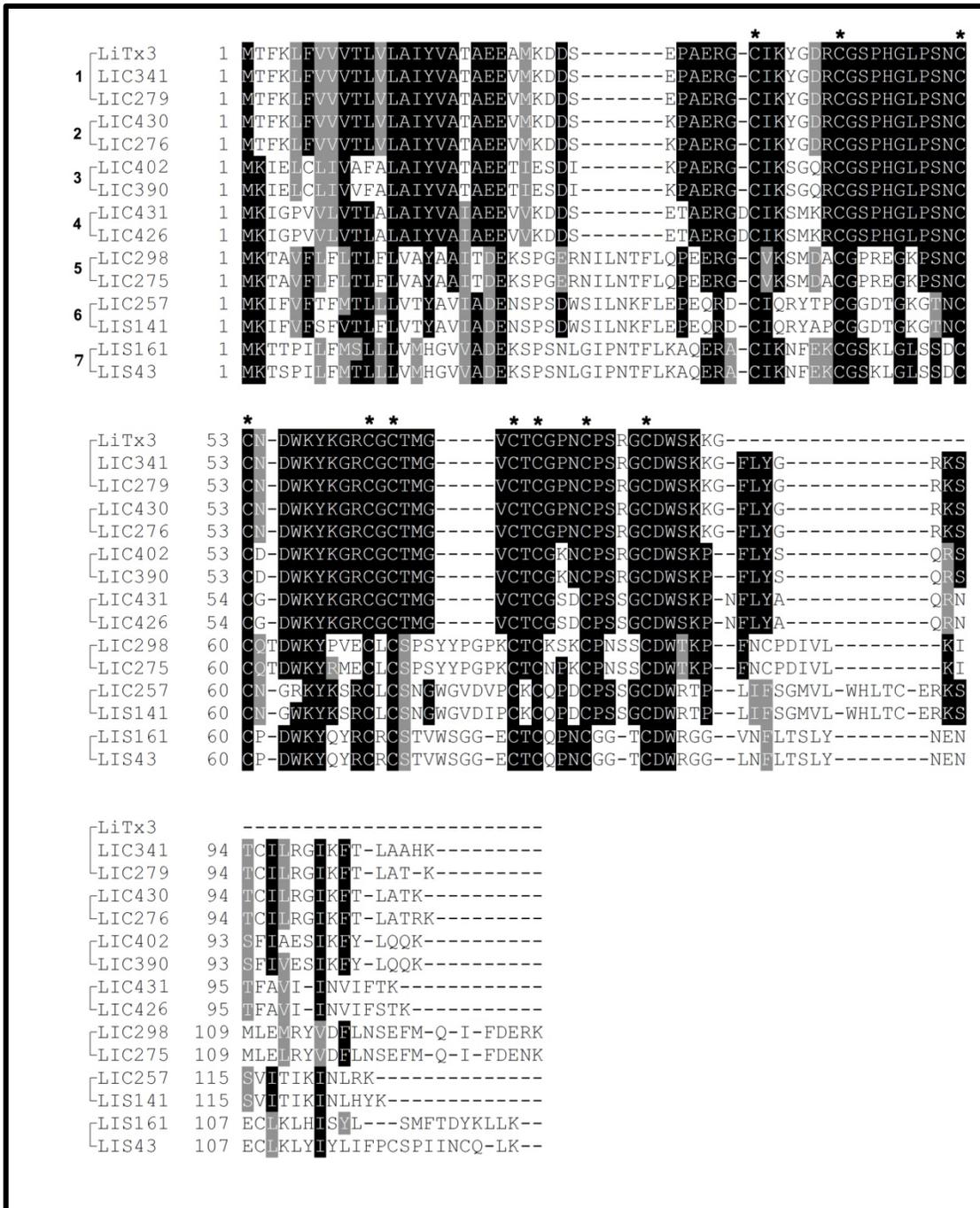


FIGURA 11: SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS PREDITAS DE NOTINAS OBTIDAS NO TRANSCRIPTOMA DE *L. intermerdia*. Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas previstas da LiTx3 (De Castro *et al.*, 2004) e suas prováveis isoformas. Os resíduos de aminoácidos conservados são mostrados em preto; resíduos de aminoácidos de mesmo caráter químico são mostrados em cinza; resíduos de aminoácidos não conservados são mostrados em branco. Os resíduos de cisteínas conservados são indicados por asteriscos.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção das glândulas produtoras de veneno *L. intermedia* e extração do RNA total

Aranhas da espécie *Loxosceles intermedia* foram mantidas em condições apropriadas, com água à vontade e com restrição alimentar somente durante os 15 dias antecedentes à coleta do veneno para evitar contaminação com egesta. Cem espécimes adultas de *L. intermedia* foram submetidas à extração de veneno por eletrochoque (15V, no cefalotórax) e após cinco dias foi realizada a extração de RNA das glândulas. Para tanto, as vidrarias, agulhas e lâminas de barbear foram esterilizadas a 200°C por 8h; os microtubos de 2mL e as ponteiras foram autoclavadas por 40min. Para evitar a contaminação com RNAses, todo o procedimento foi realizado utilizando luvas e máscara em sala e bancada previamente limpas com solução de hipoclorito de sódio (3%) e álcool 70%. As aranhas foram anestesiadas em atmosfera de clorofórmio, e com auxílio da lâmina de barbear e agulhas, os pares de glândulas foram coletados e congelados em microtubos em gelo seco.

A extração do RNA foi baseada no método de TRIzol® (Chomczynski, 1993). Às glândulas ainda congeladas nos microtubos foram adicionados 750µL de TRIzol® e essas foram homogenizadas com homogenizador de tecidos (Tecnal, São Paulo, Brasil). Após 5 min à temperatura ambiente, foram adicionados 150µL de clorofórmio, os microtubos foram vigorosamente agitados por 15 segundos e centrifugados a 20.000xg por 20min à 4°C. Após a centrifugação três fases foram formadas, a fase aquosa contendo RNA, a fase protéica e a fase orgânica contendo DNA genômico. A fase aquosa foi retirada cuidadosamente e foram adicionados 375 µL de isopropanol e os tubos foram mantidos em T.A. por 10min para precipitação do RNA. Após centrifugação (20.000xg, 30min, 4°C), o sobrenadante foi descartado, e 1 mL de etanol 75% foi adicionado para lavar o pellet de RNA, procedendo-se nova centrifugação por 5 min. Após retirada do sobrenadante, os microtubos foram abertos em fluxo

laminar, imersos em gelo, até secar o pellet que foi ressuspenso em 100 µL de água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

4.2 Quantificação e Análise da Integridade do RNA Total Extraído

Para saber a concentração do RNA extraído e a relação de ácido nucléico em relação à proteínas foi realizada a dosagem em Nanodrop1000® (*ThermoScientific*), com a utilização de 1 µL do RNA total extraído.

Para saber a integridade do RNA extraído, foi realizada eletroforese em gel agarose 1% com brometo de etídio (0,5 µg/ml) em tampão TAE (Tris base 40mM/ acetato 20mM/ EDTA 1mM) e corrida eletroforética em cuba horizontal a 5V/cm de gel. O gel foi visualizado e a imagem foi registrada com auxílio de aparelho de análise de imagens Chemidoc – XRS e software Quantity One – SW (BioRad).

4.3 Transcrição Reversa Acoplada à Reação em Cadeia da Polimerase: RT-PCR

Com o intuito de obter o segmento de cDNA específico para a toxina inseticida, o RNA total das glândulas de veneno de *L. intermedia* foi submetido a reações de RT-PCR (Transcrição Reversa acoplada à Reação em Cadeia da Polimerase) e, posteriormente, às reações de 3'RACE e 5'RACE, para a obtenção da sequência completa dos cDNAs correspondentes aos mRNAs codificadores do peptídeo de interesse. As técnicas utilizadas foram adaptadas de Sambrook e Russel (2001).

A partir do fragmento de cDNA relativo ao peptídeo da família das notinas, LiKp (*Loxosceles intermedia* Knottin peptide), obtido e seqüenciado da biblioteca de cDNA da glândula de *L. intermedia*, foram construídos *primers* gene-específicos para a amplificação das extremidades 5' e 3'.

4.4 5'RACE (*Rapid Amplification of 5' cDNA Ends*) para amplificação da extremidade 5' do cDNA relativo ao LiKp

Em um tubo para reação de PCR foram adicionados: *primer* gene-específico *antisense* (0,2 μ M), 1 μ g de RNA total e água DEPC tratada suficiente para 10 μ l. Este tubo foi incubado a 70°C por 5 min, em termociclador (My Cycler – Thermal Cycler BioRad, Hercules, CA, EUA) para a desnaturação do RNA e, imediatamente, colocado em gelo. Após, foram adicionados tampão para Transcriptase Reversa (1X), MgCl₂ (2,5 mM), dNTPs (0,4 mM), inibidor de RNase (20U) e água DEPC tratada suficiente para 10 μ l. Após homogeneização com auxílio de micropipeta, foram acrescentadas 200U da enzima Transcriptase Reversa e a mistura foi incubada novamente em termociclador a 25°C por 5min e 42°C por 60 min. A reação foi parada a 70°C por 15min, sendo mantida a 4°C até a próxima etapa.

O cDNA obtido foi seletivamente precipitado com acetato de amônio (2,5M) e etanol absoluto gelado (3v:1v de amostra). A mistura foi incubada a -20°C por 30 min. Procedeu-se então centrifugação a 4°C, 20.000xg, por 30 min. Após retirado o sobrenadante, o pellet foi lavado com 750 μ L de etanol 70% gelado e centrifugado a 4°C, 20.000xg, por 5 min. Seguiu-se a retirada do sobrenadante e, por fim, o pellet foi ressuspenso em 12 μ l de água ultrapura. A essa solução foram adicionados tampão para a enzima Terminal desoxinucleotidil Transferase (TdT) (1X) e dATP (0,2 mM). A reação foi incubada a 94°C por 2 min, colocada imediatamente em gelo, seguida de adição de 20U da enzima TdT e incubação a 37°C por 10 min. A enzima foi inativada a 65°C por 10 min. No final desta etapa obteve-se a primeira fita de cDNA com uma cauda homopolimérica de adenina na extremidade 3'. A partir deste produto, uma reação de PCR foi realizada para gerar a segunda fita do cDNA. Para esta reação utilizou-se tampão para *Taq* DNA polimerase (1X), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), *primer* gene-específico *antisense* (0,4 μ M), (dT)₁₇Adaptor-primer (oligonucleotídeo adaptador para cauda homopolimérica – 0,4 μ M), cDNA (5 μ l), *Taq* DNA polimerase (1,25 U/ 50 μ l), para um volume final de reação de 50 μ l. Esta mistura foi incubada em termociclador

conforme o protocolo a seguir: 1 ciclo a 94 °C por 2 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 s - 50 °C por 30 s – 72 °C por 1 min; 1 ciclo 72 °C por 10 min; 1 ciclo de espera a 4 °C, infinito (ciclo de espera).

4.5 3'RACE (*Rapid Amplification of 3' cDNA Ends*) para amplificação da extremidade 3' do cDNA relativo ao LiKp

Para as reações de 3'RACE, *primer* adaptador Oligo (dT)₁₇ (0,2 µM), 1 µg de RNA total e água DEPC tratada suficiente para 10 µL foram adicionados em um microtubo para PCR e incubados à 70°C por 5 min em termociclador (My Cycler – Thermal Cycler BioRad). Após essa incubação para a desnaturação do RNA, essa solução foi imediatamente retornada ao gelo. Adicionou-se tampão para transcriptase reversa (1X), 2,5mM de MgCl₂, 0,4mM de dNTPs, 20U de inibidor de RNAase e água DEPC-tratada suficiente para 10µL. Essa nova ~~solu~~ foi colocada no termociclador à 42°C para anelamento do Oligo (dT)₁₇. Após 1min, foi adicionado 200U da transcriptase reversa e os microtubos foram submetidos aos ciclos de 25°C por 5min, 42°C por 60min, 70°C por 10min e 4°C, infinito (ciclo de espera).

O cDNA obtido foi seletivamente precipitado e submetido à reação de PCR como descrito para a técnica do 5'RACE.

4.6 Extração dos fragmentos do gel de agarose

A análise do produto de PCR foi realizada eletroforese em gel agarose 1,5% com brometo de etídio (0,5 µg/ml) em tampão TAE (Tris base 40 mM/ acetato 20 mM/ EDTA 1 mM) e corrida eletroforética em cuba horizontal a 5V/cm de gel. O gel foi visualizado e a imagem foi registrada com auxílio de aparelho de análise de imagens Chemidoc – XRS e software Quantity One – SW (BioRad).

O gel de agarose foi recortado com auxílio de bisturi no local de visualização das bandas correspondentes ao que se esperava (em pares de

base). Colocado em microtubos e extraídas com auxílio de reagentes apropriados para extração de DNA em gel (Gel Band Purification kit, GE®).

4.7 Reação de Ligação

Após a extração da banda do gel, o DNA amplificado foi ressuspensão em água e este inserto ligado a 50ng do vetor pGEM-T (vetor A-T) em uma proporção de 3:1 (inserto:vetor). Para reação utilizou-se um volume final de no máximo 10 µl, a qual continha tampão para a enzima T4 DNA Ligase (1X), T4 DNA Ligase (3 U/µl) e as quantidades de vetor e inserto previamente calculadas de acordo com a concentração do inserto. Essa reação foi incubada por 16 h a 16°C. Após esse período de ligação, o DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M, pH 6,0 e etanol absoluto (0,1v:3v de amostra) de modo semelhante à precipitação do cDNA.

4.8 Transformação Bacteriana por Eletroporação

Uma alíquota de solução de bactéria *Dh5* eletrocompetente (30 µl) foi descongelada e mantida em gelo. Quando descongelada, foi adicionado 1µl da reação de ligação e a eletroporação em eletroporador Gene Pulser X-Cell, BioRad.

Estas bactérias foram colocadas em meio SOC (triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10 mM, glicose 0,2 M) a 37°C por 1 hora sobre agitação, para adquirir resistência ao antibiótico específico e recuperarem-se da alta voltagem.

4.9 Plaqueamento das Bactérias Transformadas

As bactérias recuperadas foram divididas em duas porções: uma de 100 µl plaqueadas em meio LB ágar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, agar-ágar 15 g/L) suplementado com ampicilina (100 µg/ml) previamente tratada com IPTG (100 mM - 100µl) e X-GAL (20mg/ml – 40 µl); e

outra de 900 µl que foi submetida a centrifugação e ressuspensa em 100 µl de meio SOC para o plaqueamento. As placas com a suspensão bacteriana foram friccionadas com alça de Gauss (estérel) até completa absorção (secagem) do líquido. As placas foram incubadas a 37°C (em incubadora tipo BOD 411 D, Nova Ética) por 16h.

4.10 PCR de Colônia

Após observação das placas anteriormente citadas, foram escolhidas colônias brancas (supostamente com inserto), algumas azuis e outras parcialmente azuis para replaqueamento e para confecção de PCR de colônia. Cada uma das colônias escolhidas foi tocada com auxílio de palito de madeira estéreo, parte do material esfregado no fundo de um tubo de 0,2 mL e outra parte furou uma “master plate” (placa quadriculada e numerada). Nos tubos foram acrescentados: Tampão *Taq* DNA polimerase (1X); dNTPs (0,2 mM); MgCl₂ (1,5 mM); “*Primer Forward*” (0,2 µM); “*Primer Reverse*” (0,2 µM) e *Taq* DNA polimerase (1,25U/50µl). Esta mistura foi incubada em termociclador, para amplificação do inserto no protocolo de: 95°C/5min (1 ciclo); 95°C/30s – temperatura média do T_m dos primer diminuidos de 5°C/30s – 72°C/1min (35 ciclos); 72°C/10min (1 ciclo); 4°C/ infinito.

O produto do PCR de colônia foi analisado em gel de agarose 1,5%. E o resultado foi visualizado e registrado em aparelho de captura de imagem Chemidoc (Bio-Rad).

4.11 Pré-inóculo para Processamento de Sequenciamento

A partir da “*master plate*” os clones escolhidos foram picados com auxílio de pinça e palitos de madeira estéreis para um pré-inóculo de 5 mL de LB/amp (100 µg/mL) líquido e incubado por 16h a 37°C (em incubadora 430 RDB tipo “shaker” Nova Ética) em tubo de 15 mL com tampa de rosca. Cada cultura (com crescimento saturado) foi centrifugada (3.000xg por 3 min) a temperatura

ambiente e se obteve um pellet bacteriano consistente. De cada um dos centrifugados bacterianos foi feita a extração do plasmídeo com auxílio de reagentes do kit de Miniprep da Invitrogen (Pure Link Quick Plamid Miniprep Kit, Invitrogen®).

Para o PCR de seqüenciamento foi utilizado o DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Piscataway, EUA), utilizando a miniprep descrita anteriormente como molde e primers universais T7 e SP6. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

4.12 PCR com *Pfu* DNA Polimerase e Clonagem da Sequência Completa do LiKp em Vetor de Clonagem

As reações de 3' e 5' RACE foram realizadas utilizando os *primers* específicos e *Pfu* DNA polimerase (1,25U/50µl). A análise do seqüenciamento permitiu o desenho de primers específicos para a clonagem da sequência completa codificante do peptídeo LiKp em vetor de clonagem pGEM-T. As etapas de transformação, PCR de colônia, mini-prep, seqüenciamento e análise de seqüenciamento foram realizadas do mesmo modo que descrito anteriormente.

4.13 Subclonagem do cDNA Referente ao Peptídeo LiKp em Vetor de Expressão pET-14b

A partir da análise do seqüenciamento anterior, primers específicos contendo sítios de restrição para a enzima *Xho*I (primer sense) e *Bam*HI (primer antisense) foram sintetizados para a clonagem da sequência do peptídeo LiKp (propeptídeo associado ao peptídeo maduro) em vetor de expressão pET-14b: o cDNA referente ao peptídeo LiKp (propeptídeo associado ao peptídeo maduro) contido no vetor pGEM-T foi modificado por PCR de alta fidelidade utilizando-se *Pfu* DNA polimerase com *primers* específicos para originar um produto contendo nas extremidades sítios das enzimas de restrição *Xho*I e *Bam*HI. O produto de

PCR amplificado e o vetor pET-14b foram digeridos com as respectivas enzimas e as reações de ligação foram realizadas com T4 DNA ligase na proporção 3:1 (inserto/vetor) a 16°C por 16h em volume máximo de 20µL. O produto da ligação foi utilizado para transformação da cepa de *E. coli* AD494(DE3). O procedimentos de plaqueamento das bactérias, PCR de colônia e extração plasmidial foram realizados como descrito anteriormente. Clones positivos obtidos foram submetidos a sequenciamento com o objetivo de confirmar a orientação e a correta fase de leitura da sequência codificadora do peptídeo LiKp.

4.14 Expressão do Peptídeo LiKp Recombinante

Um experimento piloto de expressão foi conduzido com o objetivo de padronizar as condições ótimas (quantidade de indutor, tempo e temperatura de indução) para a expressão em larga escala do peptídeo recombinante. A partir da “*master plate*” anteriormente confeccionada, uma colônia isolada contendo a construção de interesse foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e kanamicina (15 µg/mL) à 37 °C durante 16h. Esta cultura foi inoculada em diluição 1:100 em 50 mL de meio LB acrescido dos antibióticos e o crescimento monitorado pela determinação da densidade óptica em 550 nm. Quando as culturas atingiram a D.O.(550nm) entre 0,4 e 0,6 foi adicionado o indutor IPTG em diferentes concentrações (0,05mM; 0,1mM; 0,5mM e 1,0 mM) e coletadas amostras em diferentes tempos de expressão (0h; 1h; 2h; 3h e 4h) à 30°C. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 18,5% em condições redutoras (5% de β-mercaptoetanol).

Para a expressão em larga escala, uma colônia isolada da construção LiKp/pET-14b em *E. coli* AD494(DE3) foi inoculada em 12mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100µg/mL) e kanamicina (15µg/ml) e esta cultura foi incubada por 16h à 37°C sob agitação (200rpm). A partir da diluição dessa cultura saturada (1:100) foi feito inóculo de 1L em meio LB líquido mantido a 37°C sob agitação até atingir densidade ótica entre 0,4-0,6 em 550nm. Nesse momento, a cultura foi submetida a banho de água e gelo e procedeu-se a indução da

expressão do peptídeo pela adição de IPTG para uma concentração final de 0,5mM, sendo a cultura incubada por um período de 3,5 h a 30°C, sob agitação (200rpm).

As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 9000rpm e ressuspensas em 40mL de tampão de ligação (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM e imidazol 10 mM). A suspensão bacteriana foi congelada a -80 °C por 16h.

4.15 Purificação do Peptídeo LiKp Recombinante

A purificação do peptídeo recombinante expresso foi realizada por cromatografia de afinidade em resina Ni²⁺-NTA. A suspensão de células foi descongelada e lisada por 8 ciclos de 15s de sonicação a baixa intensidade. O lisado foi centrifugado a 9000xg por 30 minutos e o sobrenadante incubado por 2h a 4°C com 1 mL de resina Ni²⁺-NTA agarose em agitação moderada. A suspensão foi empacotada em coluna plástica e lavada exaustivamente com o tampão de lavagem (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM), sendo a D.O._{280nm} monitorada durante todo o procedimento de purificação. O peptídeo foi eluído quando a D.O._{280nm} atingiu 0,01, utilizando-se tampão de eluição (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM). O grau de pureza do eluato foi analisado por eletroforese em gel SDS-PAGE 18,5% sob condições redutoras e a proteína obtida dialisada contra PBS pH 7,2. A suspensão da proteína solúvel foi quantificada por espectrofotometria em 280nm levando-se em consideração que 1mg/mL da proteína pura equivale a D.O._{280nm}=1,852, de acordo com os parâmetros físico-químicos determinados com o uso da ferramenta ProtParam. As toxinas recombinantes purificadas também foram dosadas pelo método de Bradford, aliquotadas e mantidas a -80°C até o momento do uso.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evolução do aparelho inoculador de veneno e das secreções venenosas em animais como um meio de predação ou de defesa é uma notável conquista biológica (ESCOUBAS; QUINTON; NICHOLSON, 2008). As aranhas, em termos evolutivos, são os principais animais predadores, mantendo de longe o maior o maior *pool* de peptídeos tóxicos. Sollod e colaboradores (2005) especularam, por meio de uma estimativa a partir de veneno de tarântulas, que as aranhas possuem cerca de 4 milhões de peptídeos em seus venenos. Surpreendentemente, apesar do maior conjunto de peptídeos tóxicos, os venenos de aranhas têm sido muito menos estudados em relação aos venenos de outros animais (SOLLLOD *et al.*, 2005).

Uma das principais dificuldades em utilizar peptídeos e demais toxinas presentes em venenos de aranhas como ferramentas de pesquisa é a obtenção de quantidades suficientes para os testes biológicos. A purificação dessas moléculas de forma direta é pouco viável, uma vez que as extrações de veneno resultam em baixo rendimento. Abordagens moleculares de clonagem, caracterização e expressão de genes codificantes de tais toxinas têm sido alternativas eficazes para prover quantidades suficientes de material para a realização de bioensaios (DINIZ *et al.*, 2006).

5.1 Determinação da sequência a ser clonada e expressada

O presente trabalho é resultante de informações parciais derivadas do concomitante estudo de Gremski e colaboradores (2010). Nesse estudo, os autores produziram um transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*, fornecendo o perfil de proteínas expressas nesse tecido. A análise dos dados obtidos revelou a presença de ESTs que apresentavam similaridade com peptídeos descritos por De Castro e colaboradores (2004) a partir do veneno de *L. intermedia*. Uma das ESTs que apresenta similaridade com a sequência do peptídeo LiTx3 descrita no trabalho citado anteriormente foi então escolhida como

alvo para este estudo, o qual abrange a clonagem e expressão heteróloga desse peptídeo.

5.2 Extração, quantificação e análise da integridade do RNA

Para a clonagem do peptídeo de interesse, primeiramente procedeu-se a extração do RNA total das glândulas produtoras de veneno de *L. intermedia*. Para isso, utilizou-se o método de TRIzol® (CHOMCZYNSKI, 1993), pelo qual o RNA é coletado da fração aquosa após a separação de fases da emulsão formada. O RNA foi então dosado e a leitura espectrofotométrica 260/280 (ácido nucléico/proteína) apresentou valor $\geq 1,8$, indicando grau de pureza em relação a contaminantes protéicos satisfatório.

Uma célula eucariótica típica contém, aproximadamente, 10^{-5} μg de RNA, sendo que 80-85% dessa massa corresponde ao RNA ribossômico (rRNA). Os demais 15-20% restantes consistem de outros RNAs, a exemplo dos RNAs mensageiros (que perfazem cerca de 1-5% do RNA celular total e variam em tamanho e sequência de bases) e de uma variedade de outros RNAs de baixo peso molecular (RNA transportadores, pequenos RNAs nucleares, etc) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001; ALBERTS *et al.*, 2008). Quando submetido à eletroforese em gel de agarose, o perfil exibido pelo RNA total eucariótico íntegro evidencia a presença de duas bandas bem definidas correspondentes aos RNAs ribossômicos 18S e 28S. A intensidade duas vezes maior da banda do rRNA 28S em relação à banda do rRNA 18S também é indicativa da boa qualidade da amostra (Figura 12A) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2010). O perfil apresentado pelo RNA total extraído das glândulas de veneno de *L. intermedia* revelou a presença de uma só banda de grande intensidade correspondente ao rRNA e um background composto por bandas de baixa intensidade em diversas alturas do gel relativas aos RNAs mensageiros (Figura 12B). Apesar de o resultado obtido divergir da literatura, esse padrão é o que sempre se observa a partir das extrações de RNA da glândula de veneno de *L. intermedia* e é considerado indicativo de integridade para o material em questão.

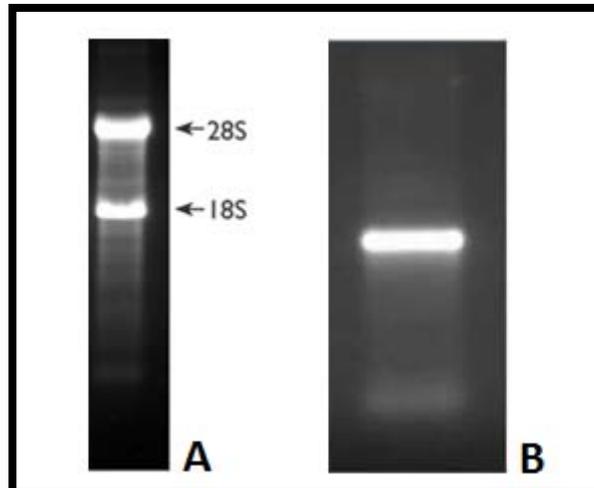


FIGURA 12: PERFIL DO RNA TOTAL ÍNTEGRO OBTIDO POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%. (A) Padrão esperado para RNA extraído de células eucarióticas: duas bandas de grande intensidade correspondentes aos rRNAs 18S e 28S (http://www.ambion.com/techlib/append/supp/rna_gel.html). (B) Perfil do RNA total extraído das glândulas de veneno de *L. intermedia*: a banda de grande intensidade corresponde ao rRNA; bandas de pouca intensidade e de tamanhos variados (background) correspondem aos RNAs mensageiros.

5.3 Clonagem do peptídeo Notina

Para a amplificação das extremidades 3' e 5' desconhecidas do cDNA correspondente ao peptídeo, foram selecionados 2 *primers* gene-específicos construídos com base na sequência parcial obtida no transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* (Gremski *et al.*, 2010): *primer 3'RACE sense* (5' TACAAAGGAAGGTGCGGTTG 3') e *primer 5'RACE antisense* (5' CATCCTCTTTCTGCTGGTTC 3'). Os *primers* foram desenhados de acordo com os parâmetros ótimos descritos por Sambrook e Russell (2001), privilegiando principalmente, o tamanho (entre 18-25 nucleotídeos), o conteúdo de C+G (entre 40 e 60%) e a inexistência de uma autocomplementaridade significativa (*self-dimer*).

A técnica do 3'RACE é conduzida quando a extremidade 3' do cDNA de interesse é desconhecida. Segundo Sambrook e Russel (2001), em bibliotecas de cDNA construídas com auxílio de primers genéricos do tipo oligo(dT), caso da biblioteca gerada por Gremski e colaboradores (2010), clones que possuem a

extremidade 3' incompleta ocorrem devido à várias causas, entre elas a quebra da primeira fita do cDNA, a falha da DNA polimerase em alcançar a extremidade 3' do *template* durante a síntese da segunda fita do cDNA ou a deleção das sequências 3' adjacentes à região poli-A/poli-T durante a clonagem.

Na técnica do 3'RACE, utilizou-se o primer oligo(dT)17 adaptor para a síntese da primeira fita do cDNA e o *primer 3'RACE sense* para a síntese da segunda fita do cDNA. A análise do produto amplificado por meio de eletroforese em gel de agarose revelou como produto final da reação uma banda de aproximadamente 200 pares de base (pb) (Figura 13A). Esse produto foi extraído do gel e ligado ao plasmídeo pGEM-T. A construção obtida foi então transformada com uma alíquota de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes e o *screening* realizado por meio de α -complementação, no qual colônias brancas possivelmente indicam clones positivos e colônias azuis indicam clones negativos. A verificação da presença do inserto foi confirmada por PCR de colônia, com a utilização dos primers T7 (5' AATACGACTCACTATAG 3') e SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'), os quais alinham em regiões do vetor pGEM-T (Figura 13B).

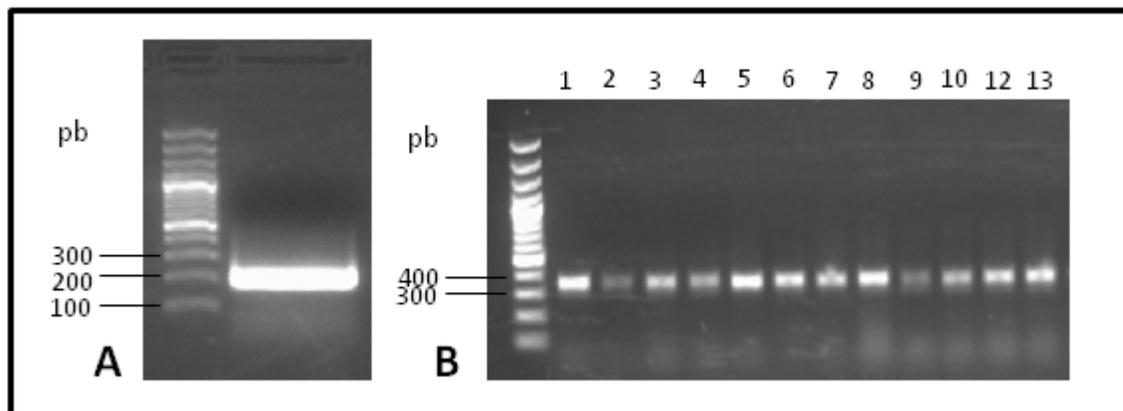


FIGURA 13: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DO 3'RACE E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTES AO PEPTÍDEO LiKp (gel de agarose 1,5%). (A) 3'RACE. Verifica-se a presença de uma banda específica em aproximadamente 200pb. (B) PCR de colônia. Gel representativo de 13 clones testados. Clones positivos demonstram a banda na altura aproximada de 360pb, sendo 200 relativos ao inserto e, aproximadamente, 160 referentes às porções do vetor amplificadas.

Procedeu-se a seleção de 3 clones positivos para a realização de um pré-inóculo, seguido de extração dos plasmídeos e submissão dessas construções ao

seqüenciamento automático. O perfil dos eletroferogramas obtidos a partir do sequenciamento foi analisado no software Four Peaks[®]. As seqüências obtidas para os diferentes clones foram alinhadas nas ferramentas CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) (Figura 14) e ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) para determinar a seqüência consenso e a porcentagem de identidade entre os clones, respectivamente. Dessa forma, a extremidade 3' do cDNA referente ao peptídeo foi resolvida.

3'RACE_Clone3+	ACAAAGGAAGGTGCGGTTGTACAATGGGGGTGTGCACCTGCGGACCCAATTGTCCAAGCA
3'RACE_Clone4+	ACAAAGGAAGGTGCGGTTGTACAATGGGGGTGTGCACCTGCGGACCCAATTGTCCAAGCA
3'RACE_Clone5+	ACAAAGGAAGGTGCGGTTGTACAATGGGGGTGTGCACCTGCGGACCCAATTGTCCAAGCA
consensus	ACAAAGGAAGGTGCGGTTGTACAATGGGGGTGTGCACCTGCGGACCCAATTGTCCAAGCA
3'RACE_Clone3+	GAGGATGTGACTGGAGCAAAAAAGGTTAATTACTGTATGGACGAAAAAGTACCTGTATTT
3'RACE_Clone4+	GAGGATGTGACTGGAGCAAAAAAGGTTAATTACTGTATGGACGAAAAAGTACCTGTATTT
3'RACE_Clone5+	GAGGATGTGACTGGAGCAAAAAAGGTTAATTACTGTATGGACGAAAAAGTACCTGTATTT
consensus	GAGGATGTGACTGGAGCAAAAAAGGTTAATTACTGTATGGACGAAAAAGTACCTGTATTT
3'RACE_Clone3+	TAAGAGGAATAAAGTTTACATTGT
3'RACE_Clone4+	TAAGAGGAATAAAGTTTACATTGT
3'RACE_Clone5+	TAAGAGGAATAAAGTTTACATTGT
consensus	TAAGAGGAATAAAGTTTACATTGT

FIGURA 14: ALINHAMENTO VIA CAP3 SEQUENCE ASSEMBLY PROGRAM DOS CLONES POSITIVOS OBTIDOS POR MEIO DO PCR DE COLÔNIA PARA O 3'RACE REFERENTE AO PEPTÍDEO LiKp. Verifica-se uma positividade de 100% entre os clones quando analisadas as seqüências via ClustalW.

Assim como a técnica do 3'RACE anteriormente descrita, o 5'RACE é realizado quando uma extremidade do cDNA de interesse é desconhecida, nesse caso, a extremidade 5'. Clones parciais desse tipo são comuns em bibliotecas de cDNA e estão associados à falha da Transcriptase em estender a primeira fita do cDNA ao longo do comprimento total do molde de mRNA. Observa-se ainda que quanto mais longo o mRNA e quanto maior o conteúdo de estruturas secundárias, maior o risco de se isolar um cDNA incompleto (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Para a técnica do 5'RACE, utilizou-se o *primer 5'RACE antisense* selecionado e a análise do produto final da reação em gel de agarose revelou uma

banda de, aproximadamente, 150 pb (Figura 15A). Novamente a banda resultante foi extraída do gel, e procedeu-se de maneira semelhante ao anteriormente descrito para o 3'RACE até a identificação de clones positivos contendo o plasmídeo com o inserto de interesse (Figura 15B).

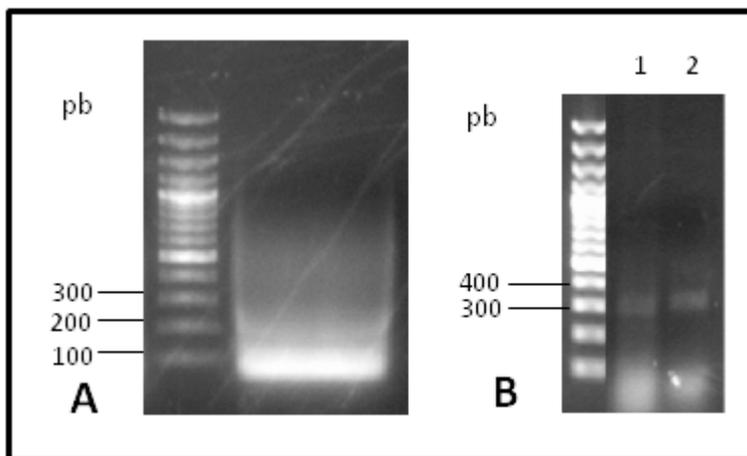


FIGURA 15: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DO 5'RACE E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTES AO PEPTÍDEO LiKp (gel de agarose 1,5%). (A) 5'RACE. Verifica-se a presença de uma banda em aproximadamente 150pb. (B) PCR de colônia. Gel representativo de 2 clones obtidos. Clones positivos demonstram banda única na altura aproximada de 310pb, sendo 150 relativos ao inserto e, aproximadamente, 160 referentes às porções do vetor amplificadas.

Dois clones foram selecionados e as construções extraídas e submetidas a seqüenciamento. A análise das seqüências obtidas (CAP3 Sequence Assembly Program e ClustalW) (Figura 16) e a contrastação dessas com a seqüência parcial presente no transcriptoma e outras seqüências depositadas no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), permitiu verificar que a região 5' do cDNA referente ao peptídeo ainda não estava completa. De acordo com Sambrook e Russel (2001) essa amplificação parcial da extremidade 5' é comum e provavelmente está relacionada com a dificuldade que a Transcriptase tem em transcrever moldes de RNA com alto grau de estruturas secundárias em sua extremidade 5'.

5'RACE_Clone2+	CATTGTGACTTGACAAGATACAGAATTATTACTTCAAGGCAGAAAGAACCATGAAGATAG
5'RACE_Clone1+	TTATTACTTCAAGGCAGAAAGAACCATGAAGATAG
consensus	CATTGTGACTTGACAAGATACAGAATTATTACTTCAAGGCAGAAAGAACCATGAAGATAG
5'RACE_Clone2+	AGTTATTTTTGGTTGTGATATTTGCTTTAGCCATACATATGGCGACGGCCGAAGAGGTGA
5'RACE_Clone1+	AGTTATTTTTGGTTGTGATATTTGCTTTAGCCATACATATGGCGACGGCCGAAGAGGTGA
consensus	AGTTATTTTTGGTTGTGATATTTGCTTTAGCCATACATATGGCGACGGCCGAAGAGGTGA
5'RACE_Clone2+	TTGAAAGTGACATCGAACCAGCAGAAAGAGGATG
5'RACE_Clone1+	TTGAAAGTGACATCGAACCAGCAGAAAGAGGATG
consensus	TTGAAAGTGACATCGAACCAGCAGAAAGAGGATG

FIGURA 16: ALINHAMENTO VIA CAP3 SEQUENCE ASSEMBLY PROGRAM DOS CLONES POSITIVOS OBTIDOS POR MEIO DO PCR DE COLÔNIA PARA O 5'RACE REFERENTE AO PEPTÍDEO LiKp. Verifica-se uma positividade de 100% entre os clones. Comparação da sequência obtida com a sequência do Transcriptoma de Gremski e colaboradores (2010) revelou que a extremidade 5' ainda não estava completa.

Para a obtenção da sequência completa da extremidade 5', selecionou-se outro primer gene-específico, *primer 5'RACE II antisense* (5' TTGCTCCAGTCACATCCTCT 3'), para novo procedimento de 5'RACE. O produto final da reação do 5'RACE com a utilização do novo *primer* consistiu em uma banda de aproximadamente 330 pb (Figura 17A). O PCR de colônia revelou 10 clones positivos (Figura 17B), sendo que 3 destes foram submetidos a seqüenciamento.

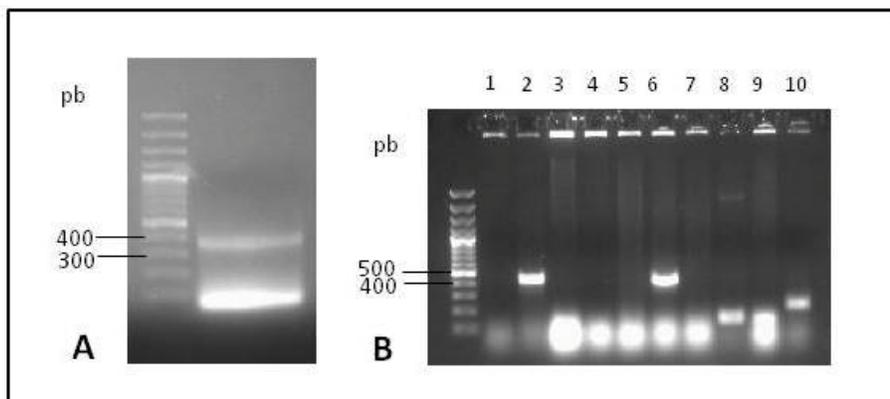


FIGURA 17: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DO 5'RACE II E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTES AO PEPTÍDEO LiKp (gel de agarose 1,5%). (A) 5'RACE. Verifica-se a presença de uma banda específica em aproximadamente 330pb. (B) PCR de colônia. Gel representativo de 10 clones testados. Clones positivos

demonstram a banda na altura aproximada de 490pb, sendo 330pb relativos ao inserto e, aproximadamente, 160 referentes às porções do vetor amplificadas.

A análise das sequências geradas a partir dos 3 clones positivos selecionados para o seqüenciamento (Figura 18) (via CAP3 Sequence Assembly Program, ClustalW e *BLASTx*) permitiu verificar que a sequência do cDNA referente ao peptídeo em questão estava completa.

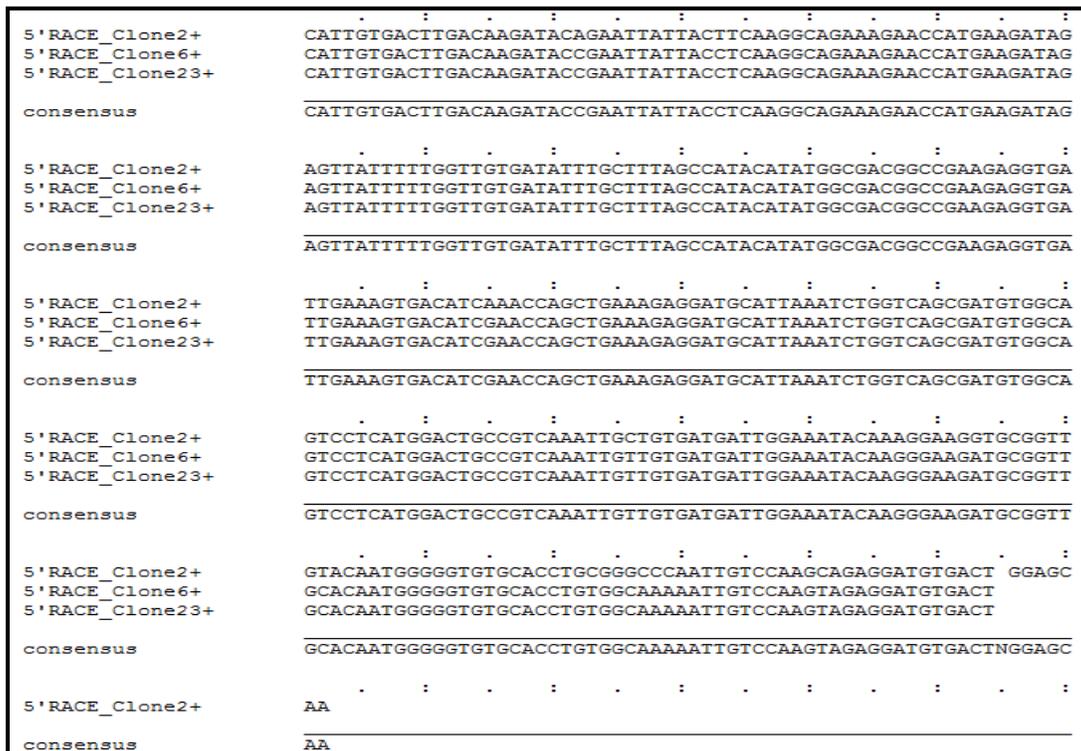


FIGURA 18: ALINHAMENTO VIA CAP3 SEQUENCE ASSEMBLY PROGRAM DOS CLONES POSITIVOS OBTIDOS POR MEIO DO PCR DE COLÔNIA PARA O 5'RACE REFERENTE AO PEPTÍDEO LiKp. Verifica-se uma positividade de 95% entre os clones quando analisadas as sequências via ClustalW.

Com o conhecimento das extremidades 5' e 3' do cDNA obteve-se a sequência completa do cDNA relativo ao peptídeo notina. Procedeu-se então o desenho de primers para a clonagem da sequência inteira do peptídeo (escolhidos segundo parâmetros já citados acima): *primer sense I* e *primer antisense II*. Realizou-se então a amplificação do cDNA completo com a utilização da enzima *Pfu* DNA polimerase de alta fidelidade, para que a sequência nucleotídica

posteriormente seqüenciada seja depositada com confiabilidade nos bancos de dados de DNA. Como produto dessa reação foi obtida uma banda de, aproximadamente, 370 pb (Figura 19A). Essa banda foi gel extraída, ligada ao vetor pGEM-T e a construção transformada em bactérias DH5 eletrocompetentes. Como resultado do PCR de colônia, 26 clones positivos foram identificados, sendo que 3 desses foram selecionados para seqüenciamento (Figura 19B).

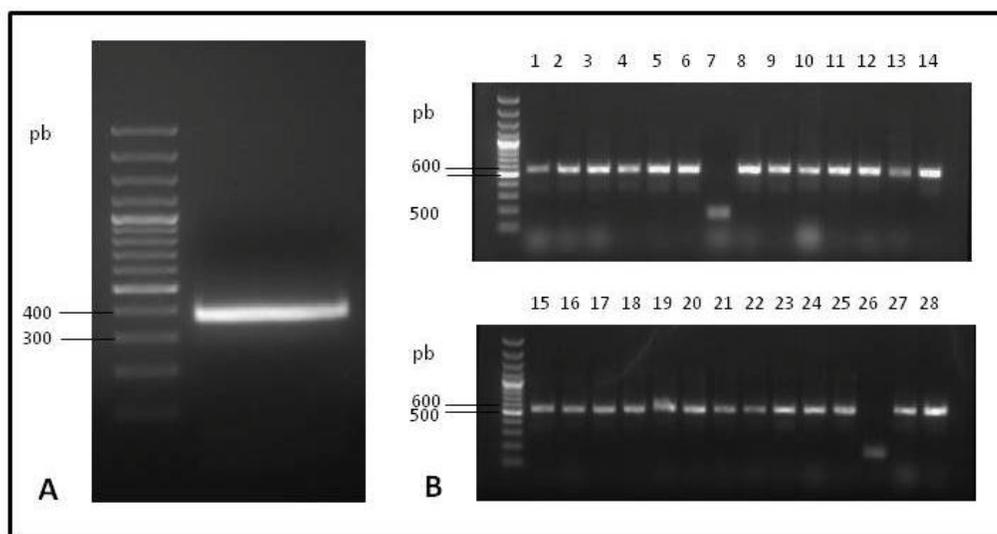


FIGURA 19: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DO PCR E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTES AO cDNA COMPLETO DO PEPTÍDEO LiKp (gel de agarose 1,5%). (A) PCR para amplificação do cDNA inteiro da proteína. Verifica-se a presença de uma banda específica em aproximadamente 370pb. (B) PCR de colônia. Gel representativo de 28 clones testados. Clones positivos demonstram a banda na altura aproximada de 530pb, sendo 370pb relativos ao inserto e, aproximadamente, 160 referentes às porções do vetor amplificadas.

A seqüência completa do cDNA foi submetida a análise quanto à fase de leitura correta (ORF) por meio da ferramenta ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). A partir da seqüência nucleotídica completa do cDNA e a seqüência aminoacídica predita obtida foi realizada uma busca em bancos de dados utilizando as ferramentas *BLASTx* e *PSI-BLAST*, com o objetivo de verificar a similaridade do peptídeo notina com outras seqüências de proteínas. Pelo *PSI-BLAST*, a seqüência do peptídeo LiKp apresentou similaridade significativa com a notina de *L. intermedia* (LiTx3 ou U2-sicaritoxina-L1a) descrita

por De Castro e Colaboradores (2004) (Score 162; E-value 1e-38) (Figura 20). É importante salientar que a sequência obtida não é nenhuma das descritas no transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* (GREMSKI et al., 2010), embora os *primers* tenham sido desenhados com base em uma das sequências depositadas a partir desse trabalho.

As análises revelaram também a similaridade da sequência do peptídeo em questão com uma metalotioneína de um ouriço-do-mar, *Lytechinus pictus* (Score 40,8; E-value 0,064). Análises pelo BLASTx indicaram identidade de 77% com LiTx3 e 46% com a metalotioneína de *L. pictus*.

PepIns	1	MKIELFLVVI FALAIHMATAEEVIESDIKPAERGCIKSGDRCGSPHGLPSNCCDDWKYKG
LiTxX3	1	MTFKLFLVVTLLVLAIFYVATAEEAMKDDSEPAERGCIKSGDRCGSPHGLPSNCCNDWKYKG
PepIns	61	RCGCTMGVCTCGPNCPSRGCDWSKKG
LiTxX3	61	RCGCTMGVCTCGPNCPSRGCDWSKKG

FIGURA 20: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS DO PEPTÍDEO LiKp (PepIns) E DA LiTx3 DESCRITA POR DE CASTRO E COLABORADORES (2004). Os resíduos de aminoácidos conservados são mostrados em preto; resíduos de aminoácidos de mesmo caráter químico são mostrados em cinza; resíduos de aminoácidos não conservados são mostrados em branco.

Assim como LiTx3, a sequência aminoacídica predita de LiKp apresentou similaridade com metalotioneínas, as quais compõem uma família de pequenas proteínas ricas em resíduos de cisteína com habilidade de se ligar a metais pesados (GREMSKI et al., 2010). De Castro e colaboradores (2004) propuseram que as metalotioneínas presentes em venenos de aranhas poderiam atuar na regulação da toxicidade do veneno, pois muitas proteínas nele presentes apresentam dependência de metais divalentes.

LiTx3 e LiKp pertencem a uma família de peptídeos denominados notinas. As notinas são assim designadas por conterem em sua estrutura um motivo denominado “nó de cistina inibidor” ou ICK (do inglês, Inhibitor Cistyne Knot). Esse motivo é caracterizado por cadeias β anti-paralelas estabilizadas por um nó de cistina, o qual compreende um anel formado por duas pontes dissulfeto que são cruzadas por uma terceira, criando uma espécie de nó na estrutura do peptídeo

(NORTON; PALLAGHY, 1998). Os peptídeos, em geral, têm sido considerados inviáveis para o desenvolvimento de agentes terapêuticos devido a sua suscetibilidade à degradação proteolítica *in vivo* e à sua limitada penetração na mucosa intestinal (NESTOR, 2009; SAEZ *et al.*, 2010). Entretanto, em contraste com a maioria dos peptídeos, a presença do motivo ICK em notinas provenientes de venenos de aranhas provê grande estabilidade química, térmica e biológica a esses peptídeos, indicando uma alternativa vantajosa como insumo terapêutico. Os peptídeos da família das notinas são tipicamente resistentes a pH extremos, solventes orgânicos e altas temperaturas (COLGRAVE; CRAIK, 2004; SAEZ *et al.*, 2010).

A sequência aminoacídica predita do peptídeo, derivada da análise do *frame* correto, foi analisada para a predição de um peptídeo sinal. Tal análise foi realizada por meio da ferramenta SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). O resultado indicou que a probabilidade de ocorrência de um peptídeo sinal na sequência é de 100% e que a probabilidade que o sítio de clivagem esteja entre o 20º e 21º é de 99,4% (Figura 21).

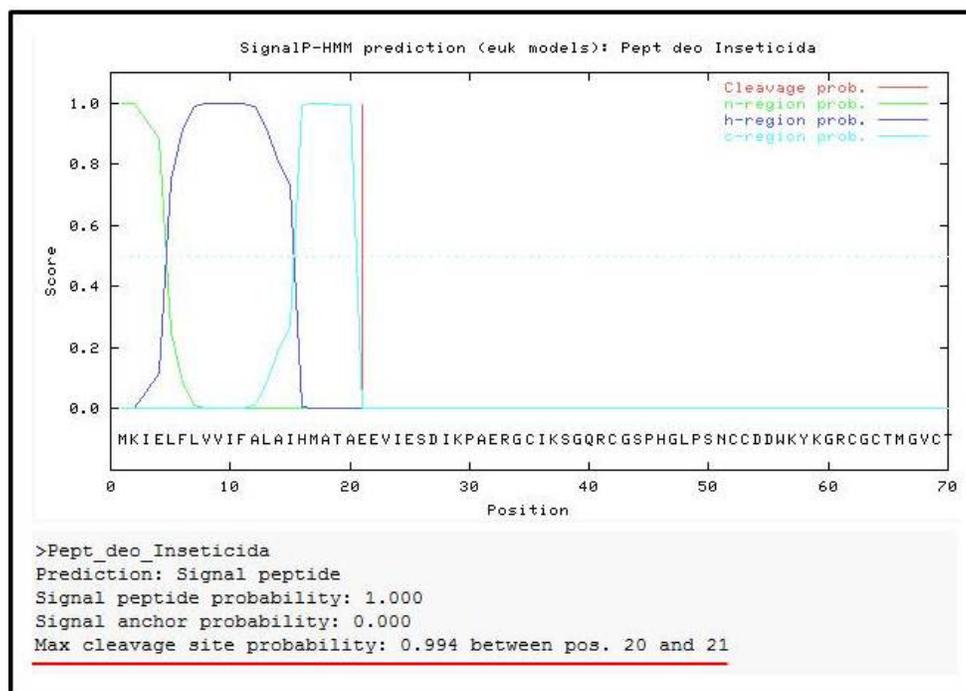


FIGURA 21: PREDIÇÃO DO PEPTÍDEO SINAL DO PEPTÍDEO INSETICIDA PELO PROGRAMA SIGNALP 3.0 SERVER. Verificou-se que a probabilidade de ocorrência de

um peptídeo sinal era de 100%. Grifado em vermelho está a indicação do provável sítio de clivagem: 99,4% de probabilidade de estar entre os aminoácidos de números 20 e 21 (TA-EE).

A comparação da sequência aminoacídica predita do peptídeo e da toxina LiTx3 levou a um consenso em relação à organização desses peptídeos (Figura 22 e 25). Ambos são sintetizados como um peptídeo precursor de 86 aminoácidos. Apresentam um peptídeo sinal de 20 resíduos de aminoácidos, rico em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, comumente observado em toxinas de venenos.

Após o peptídeo sinal, observa-se a presença de um propeptídeo constituído por 13 resíduos de aminoácidos, rico em resíduos hidrofílicos. O papel específico dessa região do propeptídeo ainda não é compreendido. Estudos propõem que essa região possa estar relacionada com o direcionamento do processamento proteolítico e na sinalização de modificações pós-traducionais, tais como formação de piroglutamato N-terminal, palmitoilação e amidação C-terminal (NICHOLSON, 2007).

Por fim, observa-se o peptídeo maduro, composto por 53 aminoácidos (Figura 22).

A		
MKIELFLVVIFALAIHMATA	EEVIESDIKPAER	GCIKSGQRCGSPHGLPSNCCDDWKYKRCGCTMGVCTCGPNCPSRGCDWSKKG
Peptídeo sinal	Propeptídeo	Peptídeo maduro
B		
MTFKLFVVVTLVLAIYVATA	EEAMKDDSEPAER	GCIKYGDRCGSPHGLPSNCCNDWKYKRCGCTMGVCTCGPNCPSRGCDWSKKG
Peptídeo sinal	Propeptídeo	Peptídeo maduro

FIGURA 22: ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS PEPTÍDEOS. (A) LiKp; (B) LiTx3. Verifica-se a presença característica de aminoácidos hidrofóbicos na composição do peptídeo sinal, como alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I) e fenilalanina (F). O propeptídeo é caracterizado por ser rico em resíduos de aminoácidos hidrofílicos, a exemplo de ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E).

Como já mencionado, uma das características básicas das notinas é a presença de muitos resíduos de cisteínas, os quais estabelecem pontes dissulfeto intracadeia. As pontes dissulfeto constituem uma parte estável da conformação

final das proteínas e contribuem para a estabilidade de seu estado nativo. Tais pontes são modificações pós-traducionais típicas de proteínas secretadas (NAKAMOTO; BARDWELL, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

No caso das notinas, as pontes sempre são estabelecidas entre os resíduos C¹ e C⁴, C² e C⁵, e C³ e C⁶, sendo que os números indicados representam a ordem dos resíduos na sequência primária dos peptídeos (Figura 23B) (GELLY *et al.*, 2004).

A partir das análises estruturais das notinas verificou-se que estas apresentam uma sequência consenso em relação aos resíduos de cisteína que estabelecem as pontes dissulfeto, definida como: C¹X₂₋₇C²X₃₋₁₁C³X₀₋₇C⁴X₁₋₁₇C⁵X₁₋₁₉C⁶, na qual X representa qualquer aminoácido (VASSILEVSKI; KOZLOV; GRISHIN, 2009). A sequência aminoacídica predita de LiKp revela a presença desse consenso, confirmando que se trata de uma notina.

A sequência aminoacídica deduzida do peptídeo em estudo foi também analisada junto ao banco de dados de *Notinas* – The Knottin Database (<http://knottin.cbs.cnrs.fr/Knottins.php>). Essa análise forneceu os prováveis resíduos que estabelecem pontes dissulfeto intracadeia (Figura 23A).

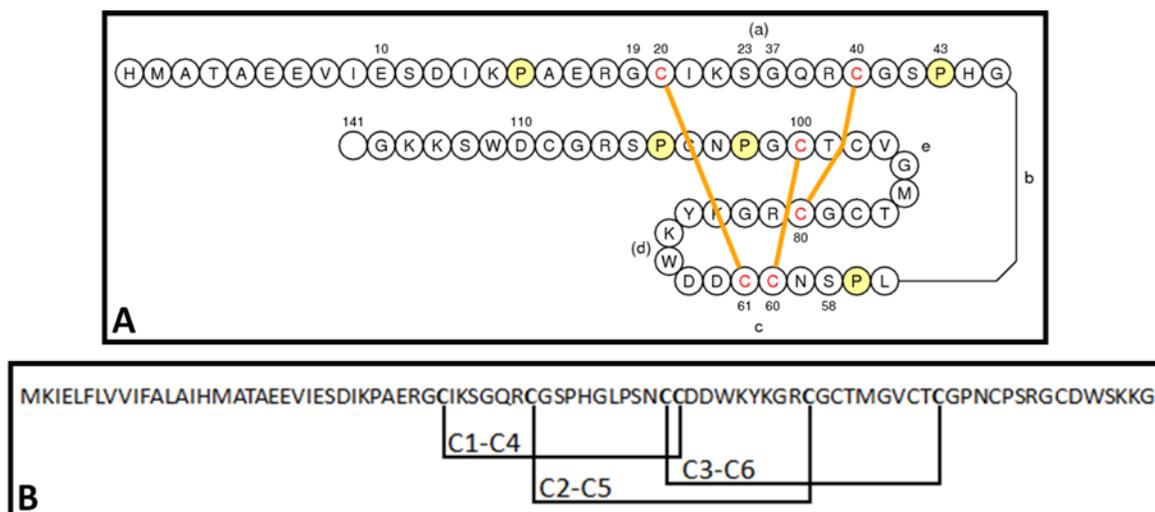


FIGURA 23: ESTABELECIMENTO DE PONTES DISSULFETO EM NOTINAS. (A) Predição dos resíduos de cisteína que estabelecem pontes dissulfeto intracadeia no peptídeo LiKp. Figura gerada através do Banco de Notinas – The Knottin Database; (B) Sequência do peptídeo LiKp, exibindo os resíduos que formam pontes dissulfeto. Os peptídeos portadores do motivo estrutural ICK caracteristicamente estabelecem pontes dissulfeto no padrão mostrado: C¹ e C⁴, C² e C⁵, e C³ e C⁶.

Especula-se que durante a evolução os peptídeos produzidos pelas aranhas foram submetidos a hipermutações na região do peptídeo maduro enquanto o *framework* das pontes dissulfeto foi conservado (NICHOLSON, 2007).

Os peptídeos presentes nos venenos de aranhas são sintetizados como prepropeptídeos, os quais sofrem modificações pós-traducionais gerando a toxina madura (SOLLOD *et al.*, 2005). Essas modificações pós-traducionais sofridas pelos peptídeos tóxicos estão diretamente relacionadas ao mecanismo de ação dessas moléculas. Além do estabelecimento de pontes dissulfeto, modificações como amidação C-terminal e formação de piroglutamato N-terminal são muito comuns às toxinas de aranhas e escorpiões (ESCOUBAS; QUINTON; NICHOLSON, 2008). De Castro e colaboradores (2004) indicaram possíveis sítios-alvo de modificações pós-traducionais na sequência de LiTx3. Os mesmo sítios são reconhecidos na sequência do peptídeo LiKp: possíveis sítios de N-miristoilação (GSPHGL, GCTMGV e GCDWSK) e possível sítio de fosforilação pela proteína quinase C (SKK) (Figura 25).

5.4 Subclonagem em vetor de expressão pET-14b

Após a confirmação por meio do seqüenciamento e análises da sequência aminoacídica predita, procedeu-se a subclonagem da sequência desejada em vetor de expressão. Os primers específicos selecionados continham sítios para as enzimas de restrição *Xho*I (no primer sense) e *Bam*HI (no primer antisense), precedidos de algumas bases para o melhor reconhecimento por essas enzimas (CCG no caso da enzima *Xho*I e CG no caso da enzima *Bam*HI), além dos códons de iniciação (primer *forward*) e terminação (primer *reverse*). Como resultado da amplificação da sequência por PCR, foi obtida uma banda na altura aproximada de 200pb (Figura 26A), a qual foi ligada em vetor de expressão pET-14b (Figura 24) e transformada em cepa de *E. coli* AD494(DE3) eletrocompetente. A transformação resultou na obtenção de 2 clones positivos (Figura 26B), os quais foram submetidos a seqüenciamento, que confirmou a inserção do peptídeo na fase de leitura correta no vetor de expressão pET-14b.

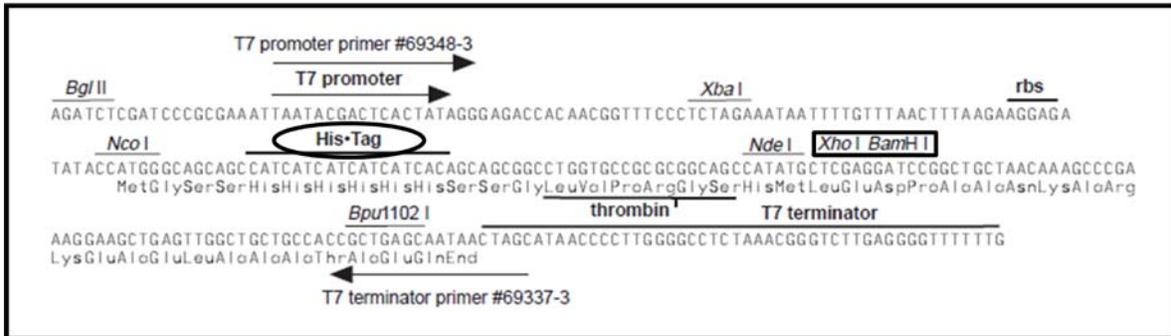


FIGURA 24: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SÍTIO DE MÚLTIPLA CLONAGEM DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-14b. A região do sítio de múltipla clonagem com sequências de reconhecimento para as enzimas *XhoI* e *BamHI* foi utilizada para a inserção do cDNA referente ao propeptídeo associado ao peptídeo maduro (retângulo). O vetor pET-14b possibilita a expressão das proteínas recombinantes como proteínas fusionadas a uma etiqueta N-terminal de 6 resíduos de histidina (elipse), a qual possibilita a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺-NTA.

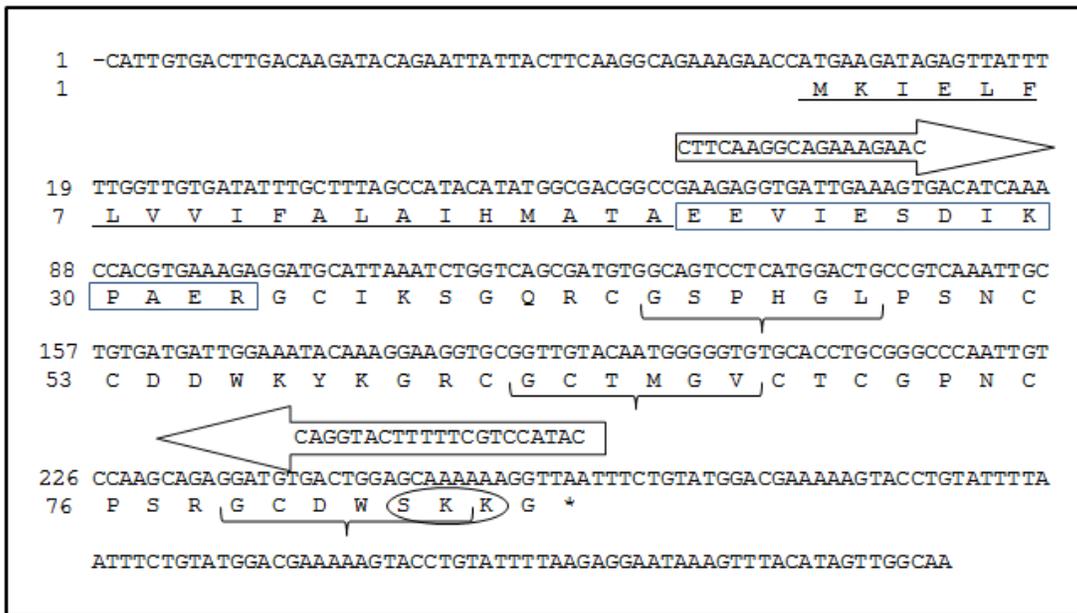


FIGURA 25: SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA E SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA PREDITA DO PEPTÍDEO LiKp. Em sublinhado está o peptídeo sinal predito pelo programa SignalP 3.0 Server. As flechas contêm as sequências dos primers utilizados para a clonagem da sequência do propeptídeo associado ao peptídeo maduro. Dentro do retângulo observam-se os aminoácidos que compõem o propeptídeo. Os demais aminoácidos da sequência até o stop códon (*) correspondem à sequência do peptídeo maduro. As chaves indicam os possíveis sítios de N-miristoilação e a elipse aponta o possível sítio de fosforilação pela proteína quinase C.

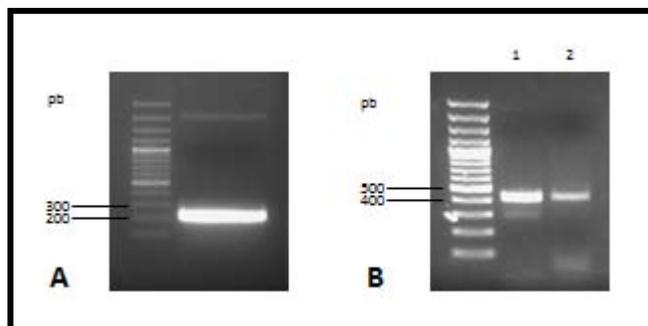


FIGURA 26: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DO PCR E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTES À CLONAGEM DA SEQUÊNCIA DO PROPEPTÍDEO ASSOCIADO AO PEPTÍDEO MADURO (gel de agarose 1,5%). (A) PCR para amplificação do inserto referente ao propeptídeo e peptídeo maduro. Verifica-se a presença de uma banda específica em aproximadamente 200pb. (B) PCR de colônia. Clones positivos demonstram a banda na altura aproximada de 420pb, sendo 200pb relativos ao inserto e, aproximadamente, 220 referentes às porções do vetor amplificadas.

A sequência do propeptídeo associado ao peptídeo maduro, subclonada no vetor de expressão pET-14b, segundo a ferramenta ProtParam (<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>), apresenta massa molecular aproximada de 9,4 kDa e ponto isoelétrico de 8,3.

5.5 Teste de expressão em bactérias *E. coli* AD494(DE3)

Como mencionado anteriormente, a sequência do propeptídeo associado ao peptídeo maduro foi subclonada no vetor de expressão pET-14b e essa construção transformada em *E. coli* AD494(DE3) eletrocompetente. A partir dos clones positivos foram realizados os experimentos de expressão.

Primeiramente, procedeu-se um teste piloto (mini-expressão) em bactérias *E. coli* da cepa AD494(DE3) para a padronização dos parâmetros que influenciam a expressão, a exemplo de quantidade de indutor IPTG, tempo de indução e temperatura (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A indução da expressão foi realizada à 30°C; as concentrações de IPTG testadas foram 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM; a expressão foi monitorada de 0h (tempo não-induzido) a 4h após a adição do indutor.

Verificou-se que com 0,05 mM e 0,1 mM do indutor IPTG, os níveis de expressão do peptídeo recombinante foram baixos. A indução da expressão com

1,0 mM não foi significativamente aumentada quando comparado à concentração de 0,5 mM. A melhor expressão do peptídeo recombinante verificada na faixa de concentrações de 0,5 mM e 1 mM de IPTG corrobora com resultados já descritos na literatura. Diniz e colaboradores (2006) obtiveram êxito na expressão de uma notina bloqueadora de canais de Na⁺ de *Phoneutria nigriventer* em cepa de *E. coli* AD494(DE3)pLysS induzida com 1 mM de IPTG. Outro exemplo de peptídeo recombinante expresso com sucesso nas concentrações de IPTG mais eficazes para o peptídeo LiKp provém dos estudos de Carneiro e colaboradores (2003), no qual os autores expressaram uma notina ativa em canais de K⁺ de *P. nigriventer* em cepa de *E. coli* BL21 induzidas com 0,6 mM de IPTG.

Assim, a análise dos géis derivados da mini-expressão resultou no estabelecimento de 0,5 mM de IPTG para indução por 3,5 h, à 30°C (Figura 27).

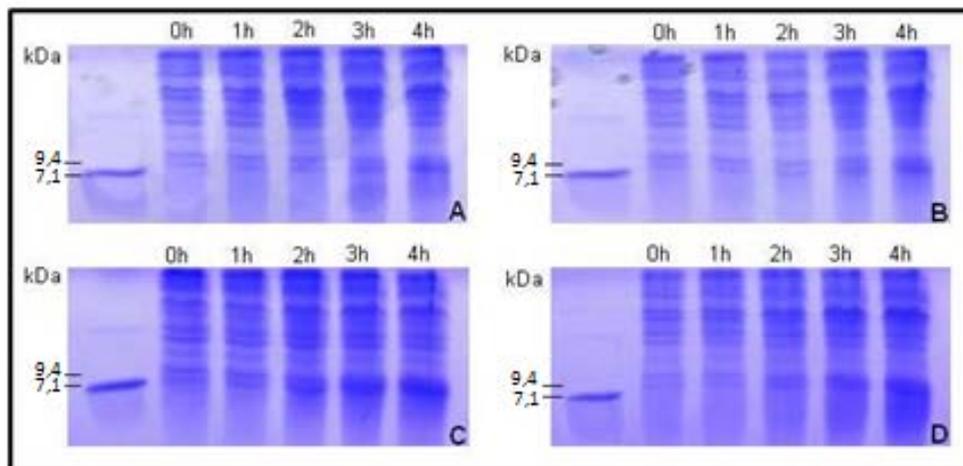


FIGURA 27: TESTE DE MINI-EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO LiKp: PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXPRESSÃO. Marcador: citocromo c (7,1 kDa); Peptídeo Inseticida associado a His-Tag: aproximadamente 9,0 kDa. (A) 0,05mM de IPTG. (B) 0,1mM de IPTG. (C) 0,5mM de IPTG. (D) 1,0mM de IPTG.

5.6 Expressão em larga escala do peptídeo notina recombinante

A partir da padronização das condições ótimas pelo teste piloto de expressão, procedeu-se a expressão em larga escala do peptídeo recombinante.

O vetor de expressão pET-14b possibilita a obtenção da molécula recombinante fusionada a um tag N-terminal de 6 resíduos de histidina em

sequência. Essa etiqueta possibilita a utilização de cromatografia de afinidade para a purificação em um único passo da molécula recombinante entre as várias proteínas derivadas das bactérias (NOVAGEN, 2006). As notinas recombinantes têm sido expressas em diversos vetores da série pET, fusionadas a diferentes tags, a exemplo da cauda de histidina e MBP (proteína ligadora de manose).

Com o objetivo de expressar o peptídeo em larga escala, inoculamos meio de cultura LB com a bactéria AD494(DE3) contendo a construção pET14-b/LiKp e induzimos a expressão ao adicionar 0,5 mM de IPTG à cultura. Foram coletadas amostras correspondentes ao tempo zero (não-induzido) e após 3,5 h (tempo após indução). As bactérias foram lisadas e coletou-se amostra da fração solúvel. O lisado foi então ligado em resina Ni^{2+} -NTA e o peptídeo recombinante eluído em 250 mM de imidazol. O resultado da expressão e purificação é apresentado na Figura abaixo.

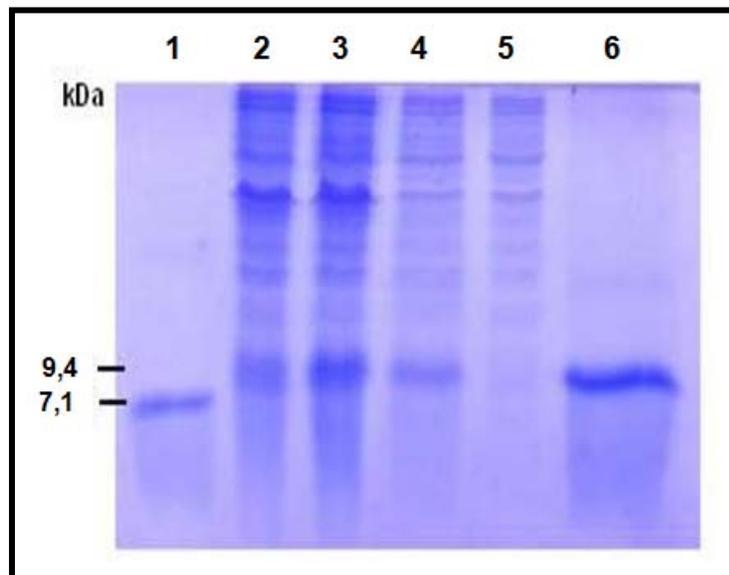


FIGURA 28: PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE POR MEIO DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM RESINA Ni^{2+} -NTA AGAROSE. À esquerda estão indicadas as massas moleculares do marcador citocromo c (7,1 kDa) e do peptídeo recombinante fusionado ao his-tag (9,4 kDa). Em (1), verifica-se o marcador, citocromo c. Em (2), o tempo zero (não-induzido). Em (3), o tempo após a indução por 0,5 mM de IPTG. Em (4), observa-se a fração solúvel do lisado. Em (5), o void da cromatografia após incubação do lisado com resina de Ni^{2+} -NTA. Em (6), peptídeo recombinante eluído da resina.

Verificou-se através da análise por meio de SDS-PAGE que no tempo zero (não-induzido) ocorreu uma pequena expressão basal pela bactéria do peptídeo recombinante (Figura). Isso ocorreu porque a cepa utilizada não contém plasmídeos que permitem reprimir a expressão basal (pLysS) na ausência do indutor, IPTG. No caso do peptídeo em questão, essa expressão basal não gerou problemas, entretanto, esse controle é extremamente desejável quando se está trabalhando com proteínas tóxicas para a bactéria. Observou-se também que após 3,5 h de indução a quantidade do peptídeo expresso é razoável e que sua ligação à resina foi satisfatória, uma vez que nenhuma banda considerável é visualizada no void da cromatografia. A partir de 1L de cultura foi possível obter 65 mg de proteína recombinante solúvel.

Com a proteína purificada, serão conduzidos experimentos *in vivo* em insetos e camundongos para verificação da sua atividade biológica. Serão conduzidos também estudos *in vitro*, em cultura de células, para análise de citotoxicidade a diversas linhagens.

A similaridade do peptídeo estudado nesse trabalho com a toxina identificada por De Castro e colaboradores (2004) revela a provável atuação dessas moléculas sobre canais de sódio de insetos. A atividade está relacionada a alteração da condutividade ao sódio durante a geração do potencial de ação em canais dependentes de voltagem presentes em nervos e junções neuromusculares, o que leva à paralisia e morte do inseto (CATTERALL, 2000; ZLOTKIN *et al.*, 2000; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

A atividade inseticida verificada para esses peptídeos isolados do veneno de aranhas ou obtidos a partir de técnicas de DNA recombinante indica o potencial dessas moléculas para o desenvolvimento de controles biológicos alternativos aos defensivos químicos, resultando em grandes benefícios para o setor da agricultura por reduzir as perdas econômicas. Além disso, a propriedade de interação com canais iônicos revela que tais moléculas podem ser empregadas em estudos bioquímicos desses canais, bem como no desenvolvimento de novas terapias relacionadas ao sistema nervoso.

6 CONCLUSÃO

Esse projeto de mestrado possibilitou a obtenção de um peptídeo recombinante da família das notinas presente no veneno de *L. intermedia*. A análise da sequência aminoacídica predita permitiu verificar que tal peptídeo apresenta massa de, aproximadamente, 9,4 kDa e é constituído por um peptídeo sinal, por um propeptídeo e por um peptídeo maduro.

O desenvolvimento deste estudo resultou na padronização das condições de expressão e purificação por meio de cromatografia de afinidade do peptídeo em questão.

Verificou-se por meio de análises comparativas nos bancos de dados que esse peptídeo apresenta similaridade com peptídeos inseticidas previamente descritos a partir do mesmo veneno de *L. intermedia*.

A obtenção do peptídeo inseticida recombinante purificado possibilitará a realização das etapas subsequentes para a caracterização da atividade biológica desta toxina. A comprovação da atividade inseticida do peptídeo em estudo possibilitará a investigação acerca do potencial biotecnológico deste peptídeo recombinante para o desenvolvimento de um biopesticida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. E.; HEROLD, E. E.; VENEMA, V. J. Two classes of channel specific toxins from funnel web spider venom. **J. Comp. Physiol.**, v.164, p.333-342, 1989.

ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, England, v.37, p.627-632, 1999.

APPEL, M.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, G.; VEIGA, S.S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate survival journal**, Italy, v. 2, p. 52-158, 2005.

APPEL, M.H.; da SILVEIRA R.B.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SILVA, D.T.; CHAVES, D.M.; da SILVA, P.H.; MANGILI, O.C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et biophysica acta**, Netherlands, v.1780, p.167-178, 2008.

ARAUJO, S. C., CASTANHEIRA, P., ALVARENGA, L. M., MANGILI, O. C., KALAPOTHAKIS, E. & CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon**, v.41, p.261-267, 2003.

ASHTON, A. C.; RAHMAN, M. A.; VOLYNSKI, K. E.; MANSER, C.; ORLOVA, E. V.; MATSUSHITA, H.; DAVLETOV, B. A.; VAN HEEL, M.; GRISHIN, E. V.; USHKARYOV, Y. A. Tetramerisation of alpha-latrotoxin by divalent cations is responsible for toxin-induced non-vesicular release and contributes to the Ca(2+)-dependent vesicular exocytosis from synaptosomes. **Biochimie**, v.82, p. 453-468, 2003.

ATKINS, J. A.; WINGO, C. W.; SODEMAN, W. A.; FLYNN, J. E. Necrotic arachnidism. **Am J Trop Med Hyg**, v.7, p.165–184, 1958.

BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emergency Medicine**, v.13, p.28-36, 2001.

BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**, England, v.32, p.687-693, 1994.

BARBARO, K. C.; CARDOSO, L. C.; EICKSTEDT, V. R. D.; MOTA, J. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v.30, p. 331–338, 1992.

BARBARO, K.C.; JARED, C.; MOTA, I. Aranhas venenosas no Brasil. **Ciência Hoje**, Brazil, v.19, p.48-52, 1995.

BARBARO, KC; FERREIRA, ML; CARDOSO, DF; EICKSTEDT, VRD; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *L. spiders*. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v.29, p.1491-1497, 1996.

BARBARO, K.C.; KNYSAK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, England, v.45, p.489-499, 2005.

BASCUR, L.; YEVENES, I.; BARJA, P. Effects of *Loxosceles laeta* spider venom on blood coagulation. **Toxicon**, v.20, p.795–796, 1982.

BELEBONI, R. O.; PIZZO, A. B.; FONTANA, A. C. K.; CAROLINO, R. O. G.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W.F. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects, **Eur J Pharmacol**, v.493, p.1–17, 2004.

BINFORD, G.J.; WELLS, M.A.. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogyne spiders. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v.135, p.25–33, 2003.

BOTZKI, A.; RIGDEN, D. J.; BRAUNT, S.; NUKUI, M.; SALMENT, S.; HOECHSTTER, J.; BERNHARDT, G.; DOVE, S.; JEDRZEJAS, M. J.; BUSCHAUER, A. L-ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme–inhibitor complexes. **J Biol Chem**, v.279, p.45990–45997, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, United States, v.72, p.248-254, 1976.

BRANTON, W. D.; KOLTON, L.; JAN, Y. N.; JAN, L. Y. Neurotoxins from *Plectreurys* spider venom are potent presynaptic blockers in *Drosophila*. **J. Neurosci**, v.7, p.4195-4200, 1987.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc 2003.

BÜCHERL, W.; ROSENFELD, G. Aranhas do genero *Loxosceles* e loxoscelismo na América do Sul. **Memórias do Instituto Butantan**, Brasil, v.30, p.167-186, 1954.

CABRERIZO, S.; DOCAMPO, P.C.; CARI, C.; ROZAS, M.O.; DÍAZ, M.; de ROODT A.; CURCI, O. Loxoscelismo: epidemiología y clínica de una patología

endêmica em el país. **Archivos argentinos de pediatría**, Argentina, v.107, p.152-159, 2009.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; da SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, United States, v.221, p. 64-77, 2006.

CHAO, K. L.; MUTHUKUMAR, L.; HERZBERG, O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. **Biochemistry**, v.46, p.6911–6920, 2007.

CHEN, H.S.; TSAI, H.Y.; WANG, Y.M.; TSAI, I.H. P-III hemorrhagic metalloproteinases from Russell's viper venom: cloning, characterization, phylogenetic and functional site analyses, **Biochimie**, France, v.90, p.1486 1498, 2008.

CHOMEZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, England, v.15, p.532-534, 1993.

CODDINGTON, J. A.; LEVI, H. W. Systematic and evolution of spiders (Araneae). **Ann.Rev.Ecol.Syst.**, v.22, p.565-592, 1991.

CORZO, G.; ESCOUBAS, P.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M.; KRISTENSEN, C. P.; NAKAJIMA, T. Isolation, synthesis and pharmacological characterization of d-palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). **Eur. J. Biochem.**, v.267, p.5783-5795, 2000.

COUTINHO, N. L. R. **Avaliação funcional e histopatológica das alterações renais induzidas pelo veneno da “aranha marrom”, *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934)**. In *Biologia Celular*, Mestrado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 1996.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; WAINE, C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. **Toxicon**, v.39, p.43-60, 2001.

da SILVA, P.H.; SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, England, v. 44, p. 693-709, 2004.

da SILVEIRA, R.B.; FILHO J.F.S.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, England, v.40, p.815-822, 2002.

da SILVEIRA, R.B.; ROMINE, B.P.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.C.; VEIGA, S.S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of demonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland.

Biochimie, France, v.88, p.1241-1253, 2006.

da SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Hyauronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, England, v.49, p.758-768, 2007c.

da SILVEIRA, R.B.; ROMINE, B.P. CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; DREYFUSS, J.L. TORNA, L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. **Biochimie**, France, v.59, p.289-300, 2007a.

da SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C. M.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R. C.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. **Biochemical Journal**, England, v.406, p.355-363, 2007b.

de CASTRO, S.C.; SILVESTRE, F.G.; ARAÚJO, S.C.; YAZBEC, G.M.; MANGILI, O. C.; CRUZ, I.; CHAVES-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, I. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*, **Toxicon**, England, v.44, p.273-280, 2004.

de LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; PIMENTA, A. M. C.; SANTOS, D. M.; BORGES M. H.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; OLIVEIRA, L. C.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p. 264–279, 2007.

DENNY, W.F.; DILLAHA, C.J.; MORGAN, P.N. Hemotoxic effect of *L. reclusa* venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **J. Lab.Clin. Med.**, v.64, p.291, 1964.

DINIZ, M.R.V.; THEAKSTON, D.G.; CRAMPTON, J.M.; CORDEIRO, M. N.; PIMENTA, A.M.C.; 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*, **Protein Expression and Purification**, v.50, p.18-24, 2006.

dos SANTOS, V.L.; FRANCO, C.R.; VIGGIANO, R.L.; da SILVEIRA, R.B.; CANTÃO, M.P.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon**, England, v.38, p. 265-285, 2000.

ESCOUBAS, P. Molecular diversification in spider venoms: A web of combinatorial peptide libraries. **Molecular Diversity**, v.10, p.545-554, 2006.

ESCOUBAS, P.; DIOCHORT, S. CORZO, G. Structure and pharmacology of venom neurotoxins. **Biochimie**, France, v.82, p.893-907, 2000.

ESCOUBAS, P; QUINTON, L.; NICHOLSON, G. M. Venomics: unraveling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.43, p.279-295, 2008.

ESTRADA, G.; VILLEGAS, E; CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Natural Product Reports**, v.24; p.145–161, 2007.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; 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**, England, v.36, p.1039-1051,1998.

FERNANDES-PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; KOBASHI, L.S.; ALMEIDA, D.D.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, England, v.9, p.279, 2008.

FERRAT, G.; DARBON, H. An overview of the three dimensional structures of short spider toxins. **Toxin Rev.**, v.24, p.361-384, 2005.

FISCHER, M. L. **Biologia e Ecologia de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae,Sicariidae), no Município de Curitiba, PR.** Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1996.

FISCHER, M.L.; VASCONCELLOS-NETO,J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, United States, v.42, p.756-765, 2005.

FRONTALI, N; GRASSO, A. Separation of three toxicologically different protein components from the venom of the spider *Latrodectus tredecimguttatus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.106, p.213-218, 1964.

FURUKAWA, K.; ISHIMARU, S. Use of thrombin-like snake venom enzymes in the treatment of vascular occlusive diseases. In: **Medical use of snake venom proteins**. Boca Raton: CRC Press. p.161-173, 1990.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American journal of the medical sciences**, United States, v. 304, p.261-267, 1992.

GAJARDO-TOBAR, R. R. Minha experiência sobre loxoscelismo. **Memórias do Instituto Butantan**, Brasil, v.33, p.689-698, 1966.

GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Archives of biochemistry and biophysics**, United States, v.174, p.90-99, 1976.

GILBERT, S.F. **Embriology: Constructing the organism**. Ed. S. F. Gilbert and A. M. Raunio, Sinauer, Sunderland, 1997.

GIRISK, K. S.; KEMPARAJU, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. **Life Sci**, v.80, p.921–943, 2007.

GOMEZ, H.F.; MILLER, M.J.; TRACHY, J.W.; MARKS, R.M.; WARREN, J.S. Intradermal anti-loxosceles Fab fragments attenuate dermonecrotic arachnidism. **Academic emergency medicine**, United States, v.6, p.1195-1202, 1999.

GOMEZ, H. F.; MILLER, M. J.; WAGGENER, M. W.; LANKFORD, H. A.; WARREN, J. S. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spider species. **Toxicon**, v.39, p.817-824, 2001.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O.M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H.C.; MADEIRA, H.M.F.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular Biosystems**, *in press*, 2010

GRISHIN, E. Black widow spider toxins: the present and the future. **Toxicon**, v.36, p.1693–1701, 1998.

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, p.591-597, 1997.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old obstacles, new directions. **Annals of emergency medicine**, United States, v.44, p.608-624, 2004.

ISBISTER, G.K.; GRAUDINS, A.; WHITE, J.; WARRELL, D. Antivenom treatment in arachnidism. **Clinical toxicology**, United States, v.41, p.291-300, 2003.

ISBISTER, G.K.; WHITE, J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. **Toxicon**, England, v.43, p.477-492, 2004.

JUNGO, F.; ESTREICHER, A.; BAIROCH, A.; BOUGUELERET, L.; XENARIOS, I. Animal Toxins: How is Complexity Represented in Databases?. **Toxins**. v.2, p.262-282, 2010.

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S.C.; CASTRO, C.S.; MANDES, T.M.; GOMEZ, M.V.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C.; CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, England, v.40, p.1691-1699, 2002.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAK, M. GONÇALVES-DORNEL, H. de CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; LABORNE, F.V.; de MOURA, J.F.; VEIGA, S.S. CHÁVES-OLÓRTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K.C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intemedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, England, v.50, p.938-946, 2007.

KAPOOR, V. K. Natural toxins and their therapeutic potential. **Indian Journal of Experimental Biology**. v.48, p.228-237, 2010.

KAWAI, N.; MIWA, A.; ABE, T. Spider venom contains specific receptors blockers of glutamatergic synapses. **Brain Res.**, v.247, p.169-171, 1982.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. **Cell Biochem. Funct.**, v.24, p.7-12, 2006.

KING, G. F.; GENTZ, M. C.; ESCOUBAS, P.; NICHOLSON, G. M. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. **Toxicon**, v.52, p.264-276, 2008.

KOZLOV S.; MALYAVKA, A.; MCCUTCHEN, B.; LU, A.; SCHEPERS, E.; HERRMANN, R.; GRISHIN, E. A Novel Strategy for the Identification of Toxinlike Structures in Spider Venom. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v.59, p.131-140, 2005.

KING, G. F. The wonderful world of spiders: preface to the special **Toxicon** issue on spider venoms. **Toxicon**, v.43, p.471-475, 2004.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advanced**, v. 17, n. 4, p. 561-594, 1999.

LEÃO, R. M.; CRUZ, J. S.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; BEIRÃO, P. S. L. Calcium channel blocking toxins in the venom of *Phoneutria nigriventer*. **J. Venom. Anim. Toxins**, v.3, p.223, 1997.

LEUNG, H. T.; BRANTON, W. D.; PHILLIPS, H. S.; JAN, L.; BYERLY, L. Spider toxins selectively block calcium currents in *Drosophila*. **Neuron**, v.6, p.767-772, 1989.

LUCIANO, M. N.; da SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; SANTOS, V. P.; FRANCO, C. R. C.; SOARES, M. F. S.; ZANATA, S. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. VEIGA, S. S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom on renal tissue. **The Journal of histochemistry and cytochemistry**, United States, v.52, p.455-467, 2004.

LU, Q.; LAI, R.; ZHANG, Y. Animal Toxins and Human Disease: from Single Component to Venomics, from Biochemical Characterization to Disease Mechanisms, from Crude Venom Utilization to Rational Drug Design. **Zoological Research**. V.31(1), p.2-16, 2010.

LUNG, J.M.; MALLORY, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **International journal of dermatology**, United States, v.39, p.287-289, 2000.

MACHADO, L.F.; LAUGESSEN, S.; BOTELHO, E.D.; RICART, C.A.; FONTES, W.; BARBARO, K.C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M.V. Proteome analysis of Brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, Germany, v.5., p.2167-2176, 2005.

MAGGIO, F; KING, G. F. Role of the structurally disordered N- and C-terminal residues in the Janus-faced atracotoxins. **Toxicon**, v.40, p.1355-1362, 2002.

MÁLAQUE, C.M.S.; CASTRO-VALENCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, Brazil, v. 44, p.139-143, 2002.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36, p.1749-1800, 1998.

MARQUES-DA-SILVA, **Loxoscelismo no Estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles Heineken & Lowe*, 1832, no período de 1993 a 2000**. Rio de Janeiro. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Osvaldo Cruz.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, Brazil; v.38, p.331-335, 2005.

MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el Perú. **Boletín de la oficina sanitaria panamericana**, United States v.103, p.378-386,1987.

MELLOR, I. R.; USHERWOOD, P. N. R. Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins. **Toxicon**, v.43, p.493–508, 2004.

MENZEL, E. J.; FARR, C. Hyaluronidase and its substrate: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. **Cancer Lett**, v.131, p.3-11, 1998.

MILLER, M. S.; ORTEGON, M.; MCDANIEL, C. Negative pressure wound therapy: treating a venomous insect bite. **Int Wound J**, v. 4, p. 88-92, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes com animais peçonhentos**. 2ªed. Brasília; 2001.

MONTEIRO, C.L.B.; RUBEL, R.; COGO, L.L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon**, England, v.40, p.409-418, 2002.

MOTA, I.; BARBARO, K.C. Biological and biochemical-properties of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Journal of toxicology. Toxin reviews**, United States, v.14, p.401-421, 1995.

NICHOLSON, G. M. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. **Toxicon**, v.49, p.490-512, 2007.

NIHEI, K.; KATO, M. J.; YAMANE, T.; KONNO, K. An efficient and versatile synthesis of all structural types of acylpolyamine spider toxins. **Tetrahedron**, v.62 , p.8335–8350, 2006.

OLIVEIRA, K.C.; ANDRADE, R.M.G.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D; TAMBOURGI, D.V. Sexlinked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**. England, v.37, p.217-221,1999.

OLVERA, A.; RAMOS-CERRILLO, B.; ESTÉVEZ, J.; CLEMENT, H.; DE ROODT, A.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; VÁZQUEZ, H.; ZAVALETA, A.; ARRUZ, M.S.; STOCK, R.P.; ALAGÓN, A. North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. **Toxicon**, England, v.48, p.64-74, 2006.

OSPEDAL, K.Z.; APPEL. M.H.; NETO, J.F.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **International journal of experimental pathology**, England, v.84, p.287-294, 2002.

PALMA, M.; NAKAJIMA, T. A natural combinatorial chemistry strategy in acylpolyamine toxins from nephilinae orb-web spiders. **Toxin Reviews**, v.24, p.209–234, 2005.

PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; VEIGA, S. S.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, W.; DE FREITAS BUCHI, D.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; FRANCO, C. R. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon**, v.47, p.844-853, 2006.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I.C.; MINOZZO, J.C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, England, v.48, p.123-137, 2006.

PAULI, I.; MINOZZO, J.C.; da SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, England, v.53, p.660-671, 2009.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 8.5. American Museum of Natural History, 2009. Disponível em: <<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>> acesso em: 07/05/2009.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 6.0. American Museum of Natural History, 2007. Disponível em: <<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>> acesso em: 11/09/2009.

PLATINICK, N. I. Advances in spider taxonomy 1988-1991. **The New York Entomological Society**. New York, 1993.

RASH, L.D.; HODGSON W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, England, v.40, p. 225-254, 2002.

RIBEIRO, L.A.; EICKSTEDT, V.R.D.; RÚBIO, G.B.G.; KONALSAISEN, J.F.; HANDAR, Z.; ENTRES, M.; CAMPOS, V.A.F.P.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* no Estado do Paraná (Brasil). **Memórias do Instituto Butantan**, Brazil, v.55, p.19-26, 1993.

ROHOU, A.; NIELD, J.; USHKARYOV, Y. A. Insecticidal toxins from black widow spider venom. **Toxicon**, v.49, p.531-549, 2007.

ROSENFELD, G.; NAHAS, L.; CILLO, D. M.; FLEURY, C. T. Envenenamentos por serpentes, aranhas e escorpiões. In: F.C. Prado, Editor, Atualização Terapêutica, Livraria Luso Espanhola e Brasileira, Rio de Janeiro, p.931–944, 1957.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**, Editora. Roca. 7 ed. São Paulo, 2005.

SAMS, H.H.; HEARTH, S.B.; LONG, L.L.; WILSON, D.C.; SANDERS, D.H.; KING, L.E. Nineteen documented cases of *Loxosceles reclusa* envenomation. **Journal of the american academy of dermatology**, United States, v.44, p.603-608, 2001.

SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biología y distribución geográfica de las arañas del género *Loxosceles*. **Boletín chileno de parasitología**, Chile, v.30, p.27-29, 1975.

SCHENONE, H., SAAVEDRA, T., ROJAS, A. & VILLARREAL, F. Loxoscelismo en Chile: estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Rev. Inst. Med. Trop., Brazil**, v.31, p.403-415, 1989.

SEFF-RIBEIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv**, v.26, p.210-218, 2008.

SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; COELHO, L.K.; GONÇALVES, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S.G.; BARBARO, K.C. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene**, England, v.92, p.546–548, 1998.

SHUSTER, S; FROST G. I.; CSOKA, A. B.; FORMBY, B.; STERN, R. Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. **Int J Cancer**, v.102, p.192–197, 2002.

SINAN - SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS, **Ministério da Saúde**, BRASIL, 2009. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> acesso em: 23/03/2009.

SINAN - SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS, **Ministério da Saúde**, BRASIL, 2010. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> acesso em: 11/09/2010.

SKINNER, W. S.; ADAMS, M. E.; QUISTAD, G. B.; KATAOKA, H.; CESARIN, B. J.; ENDERLIN, F. E.; SCHOOLEY, D. A. Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. **J. Biol. Chem.**, v.264, p.2150-2155, 1989.

SOLLOD, B. L.; WILSON, D.; ZHAXYBAYEVA, O.; GOGARTEN, J. P.; DRINKWATER, R.; KING, G. F. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries?. **Peptides**, v.26, p.131-139, 2005.

SOUTAR, R. L.; GINSBERG, J. S. Anticoagulant therapy with ancrod. **Clin. Rev. Oncol. Hematol.**, v.15, p.23-33, 1993.

STROMGAARD, K., JENSEN, L. S., VOGENSEN, S. B. Polyamine toxins: development of selective ligands for ionotropic receptors. **Toxicon**, v. 45, p.249-254, 2005.

SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Loxoscelism. **Clinics in dermatology**, United States, v.24, p.213-221, 2006.

TEDFORD, H. W.; SOLLID, B. L.; MAGGIO, F.; KING, G. F. Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. **Toxicon**, v.43, p.601-614, 2004.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; MEISSNER, O. M.; MANGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, France, v.92, p.21-32, 2010.

USKARYOV, Y. α -Latrotoxin: from structure to some functions. **Toxicon**, v.40, p.1-5, 2002.

VASSILEVSKY, A. A.; KOZLOV, S. A.; GRISHIN, E. V. Molecular Diversity of Spider Venom. **Biochemistry**, v.74, p.1505-1534, 2009.

VEIGA, S.S.; da SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serineproteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, England, v.38, p.825-839, 2000a.

VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; SANTOS, V.L.P.; SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **The Histochemical journal**, Netherlands, v.32, p.397-408, 2000b.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braslian Journal of medical and biological research**, Brazil, v.34, p.843-850, 2001a.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; PORCIONATTO, M. A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. *In vivo* and *in vitro* cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thrombosis research**, United States, v.102, p.229-237, 2001b.

VETTER, R.S.; VISSCHER, P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **International journal of dermatology**, United States, v.37, p.481-496, 1998.

VETTER, R. S. ISBISTER, K.G. Medical aspects of spiders bits. **Annual review of entomology**, United States, v.53, p.409-429, 2008.

WANG, X.; CONNOR, M.; WILSON, D.; WILSON H. I.; NICHOLSON, G. M.; SMITH, R.; SHAW, D; MACKAY, J. P.; ALEWOOD, P. F.; CHRISTIE, M. J.; KING, G. F. Discovery and Structure of a Potent and Highly Specific Blocker of Insect Calcium Channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.40306–40312, 2001.

WILLIAMS, S. T.; KHARE V. K.; JOHNSTON, G. A.; BLACKALL, D. P. Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. A report of two cases and review of the literature. **Am J Clin Pathol**, v.104, p.463-467, 1995.

WRIGHT, R.P.; ELGERT, K.; CAMPBELL, B.J.; BARRET, J.T. (1973). Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.159, p.415-426, 1973.

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**, England, v.39, p.391-400, 2001.

ZANETTI, V.C.; da SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood coagulation and fibrinolysis**, England, v.13, p.135-148, 2002.

ZLOTKIN, E.; MIRANDA, F.; LISSITZKY, S. Proteins in scorpion venoms toxic to mammals and insects. **Toxicon**, v.10, p.207-208, 1972.