
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA E
FUNÇÃO DE COMPONENTES DE BAIXAS MASSAS MOLECULARES DO
VENENO DA ARANHA *Phoneutria nigriventer* (Araneae; Ctenidae)**

PAULO CÉSAR GOMES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Agosto, 2009

PAULO CÉSAR GOMES

IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DE COMPONENTES DE BAIXAS MASSAS MOLECULARES DO VENENO DA ARANHA *Phoneutria nigriventer* (Araneae; Ctenidae)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Orientador: **Prof. Dr. Mario Sergio Palma**

Co-orientadora: **Dra. Marta do Nascimento Cordeiro**

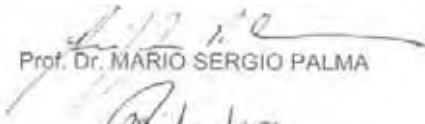
**Rio Claro
2009**

PAULO CÉSAR GOMES

IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DE COMPONENTES DE BAIXAS MASSAS MOLECULARES DO VENENO DA ARANHA *Phoneutria nigriventer* (Araneae; Ctenidae)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Comissão Examinadora



Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA



Prof. Dr. MICHAEL RICHARDSON



Profa. Dra. YARA CURTI



Prof. Dr. CLAUDIO FRANCISCO TORMENA



Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

Rio Claro, 06 de agosto de 2009

“... É mais fácil desintegrar um átomo do que um preconceito...”

(Albert Einstein)

***Dedico esse trabalho aos meus filhos
Mariana e Lucas, por eles sempre...***

***E a todos que comigo acreditaram que
seria possível...***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mario Sergio Palma, por me receber em seu laboratório, pela valiosa orientação, pela amizade, pela confiança e dedicação, pelo incentivo ao meu crescimento profissional, pelo exemplo e por tornar possível a realização desse trabalho.

À Dra. Marta do Nascimento Cordeiro e ao Dr. Michael Richardson da Diretoria de Pesquisa da Fundação Ezequiel Dias (Funed) - Belo Horizonte / MG, por confiarem a mim este trabalho, pela oportunidade do crescimento profissional e pessoal, pelos ensinamentos, amizade e compreensão.

À Dra. Thaís Viana de Freitas, Dra. Consuelo Latorre Fortes-Dias, Dr. Eládio Flores Sanchez e toda equipe, amigos e colegas de trabalho da Diretoria de Pesquisa da Fundação Ezequiel Dias (Funed) - Belo Horizonte / MG, pelo apoio, confiança e colaboração.

Aos colaboradores científicos, pela valiosa contribuição para o desenvolvimento desse trabalho, pela receptividade e dedicação:

- Prof. Dr. Cláudio F. Tormena e Prof. Dr. Roberto Ritner do Instituto de Química da Universidade de Campinas, Campinas, SP.

- Prof. Dr. Norberto P. Lopes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Departamento de Física e Química da USP-RP, em Ribeirão Preto, SP.

- Msc. Simone D. Salamoni e Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa, do Laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas – PUCRS, em Porto Alegre, RS.

- Msc. Gabriela G. Montandon, técnico Julio C. Reis e Profa. Dra. Maria Elena de Lima do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais / Núcleo de Biomoléculas, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, em Belo Horizonte, MG.

- Dra. Luciana Maria Silva e técnico Dário J. de Souza da Diretoria de Pesquisa da Fundação Ezequiel Dias (Funed), em Belo Horizonte, MG.

- Prof. Dr. Luiz Carlos da Silva Filho do Departamento de Química, Faculdade de Ciências UNESP- Bauru, em Bauru, SP.

- Dra. Lilian M. M. Cesar- Tognoli e Msc. Fernanda P. Sales, do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, Instituto de Ciências Exatas, UNESP-RC, em Rio Claro, SP.

Agradeço também:

À CAPES, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos Professores, funcionários, amigos e colegas de trabalho do Centro de Estudos de Insetos Sociais (C.E.I.S.) e do Departamento de Biologia da UNESP- Rio Claro.

À toda equipe, amigos e colegas do LBEZ (Anally, Beto, Bibi, Daniel, Dom, Helen, Lucy, Nathália, Nicoli, Roberta, Vanessa, Virgínia) e aos que já fizeram parte do LBEZ quando à minha chegada (Alessandra, Fernanda, Keity, Lilian, Luiz, Maria Anita, Maurício, Susan), pela receptividade, companheirismo e colaboração.

À minha família, minha mãe D. Conceição, meu mano Alexandre, meu pai Sr. Onofre (*in memoriam*) que sempre desejou para mim este momento, ao tio Quinzinho, aos meus filhos por entenderem em muitos momentos a minha ausência.

Aos amigos: Bibi e Bob (e Gabi) por tudo que fizeram por mim desde que cheguei a Rio Claro; Andriago e Nath pelo grande e gratificante convívio; Cynthia Bello; Ana Lúcia; Sandra Mara; Wilson; Fabiana; Luciana; minha querida Rosana mesmo de tão longe sempre tão presente; Aline, Marcela, João, Galeano e tantas outras pessoas que de alguma forma participaram e contribuíram.

E a alguns momentos:

“Mischa comendo seus brinquedos de borracha encima dos meus pés enquanto eu trabalhava em casa...”

“Terra do Nunca...”

“Encontros e desencontros...” (“... E a gente vai se amando que também sem um carinho, ninguém segura esse rojão...” Chico Buarque)

“Futebol, Sujinhos Bar, churras, jantares, prosa e viola, risos e muita palhaçada.....” (“... E a gente vai tomando que também sem a cachaça, ninguém segura esse rojão....” Chico Buarque)

**«Há um momento para tudo
e um tempo para todo o propósito debaixo do céu.
Tempo de nascer, e tempo de morrer;
tempo de chorar, e tempo de rir;
tempo de buscar, e tempo de perder,
tempo de rasgar e tempo de coser,
tempo para calar e tempo para falar...»
(Ecl. 3,2a.4a.6a.)**

**Agradeço a ti meu Deus,
por mais esse momento em minha vida e por todas as pessoas que colocastes
em meu caminho e me ajudaram a construir um novo tempo.
Louvado seja...**

RESUMO

As aranhas do gênero *Phoneutria* (Aranae, Ctenidae) são comumente conhecidas como "aranha armadeira" ou "aranha da banana", devido à posição de ataque/defesa que elas assumem contra uma presa/competidor e devido sua alta incidência nas plantações de bananas. Estas aranhas são solitárias, errantes (não constroem teias), muito agressivas e responsáveis por muitos casos graves de acidentes por envenenamento e de morte registrados. Estas aranhas são amplamente distribuídas nas regiões temperadas da América do Sul, com várias espécies já descritas. A espécie *Phoneutria nigriventer* é mais comum nas regiões centroeste e sudeste do Brasil. Um grande número de neurotoxinas tem sido purificado de venenos de aranhas do gênero *Phoneutria*. No entanto, as neurotoxinas não – protéicas de baixa massa molecular precisam ser isoladas e caracterizadas estrutural e funcionalmente. Essas toxinas são de potencial interesse na neuroquímica como ferramentas para investigações do sistema nervoso. O objetivo do presente estudo foi a caracterização estrutural e funcional da "Nigriventrina", uma nova neurotoxina não-protéica de baixa massa molecular, isolada da fração hidrofílica do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* por (RP-HPLC) sob gradiente de acetonitrila. A elucidação estrutural foi realizada com HRESIMS, ESI-MS, ESI-MS/MS e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D. A toxina apresentou massa molecular de 422Da ($C_{12}H_{14}N_4O_{13}$) e foi caracterizada como hidrazil-dioxopiperidina. A caracterização biológica foi realizada pela aplicação icv da Nigriventrina em cérebro de rato, seguido pelo acompanhamento da expressão da proteína Fos e dupla marcação imunistoquímica. Todos os neurônios duplamente marcados foram associados ao receptor ionotrópico de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato), subtipo NMDA-NR1. A Nigriventrina apresentou afinidade principalmente por regiões corticais, que estão ligadas à percepção e ao controle dos músculos voluntários dos animais. Estudos eletrofisiológicos foram realizados em preparações hipocámpais de cérebro de ratos região CA1. Os resultados sugerem que a Nigriventrina é um potente bloqueador

dos receptores NMDA-R1 e pode, portanto, servir como um instrumento para investigações nas áreas da neuroquímica e como modelo para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Palavras – chave: *Phoneutria nigriventer*. Veneno de aranhas. Toxinas de baixa massa molecular. Neuroquímica.

ABSTRACT

The spiders of the genus *Phoneutria* (Aranae, Ctenidae) are commonly known as “armed spider” or “banana spider”, because of the attack–defense position that they assume against a prey/competitor and their high incidence in banana plantations. These spiders are solitary, wandering (no web), very aggressive, responsible for many cases of severe envenomation and recorded mortality. These spiders are widely distributed in the warm regions of South America, and several species have been described. The *Phoneutria nigriventer* are the most common in central and south-eastern regions of Brazil. A large number of neurotoxins have been purified from the venoms of *Phoneutria* spiders. However, the non-proteic low molecular mass neurotoxins must be isolated and structural and functionally characterized. These toxins have an interesting potential in neurochemistry as tools for investigations of nervous system. The objective of the present study was the structural and functional characterization of “Nigriventrine”, a novel non-proteic low molecular mass neurotoxin, isolated from the hydrophilic fraction of *Phoneutria nigriventer* spider venom by (RP-HPLC) under gradient of acetonitrile. The structural elucidation was carried out with HRESIMS, ESI-MS, ESI-MS/MS and Nuclear Magnetic Resonance 1D and 2D spectroscopy. The toxin presented molecular mass of 422Da ($C_{12}H_{14}N_4O_{13}$) and was characterized as hydroxyl-hydrazyl-dioxopiperidine. The biological characterization was performed by the i.c.v application of nigriventrine in rat brain, followed by the monitoring of the expression of Fos protein and double-labeling immunohistochemistry. All doubly labeled neurons were associated to N-methyl-D- aspartate/subtype of ionotropic glutamate receptor (NMDA-NR1). The nigriventrine presented affinity mainly to cortical regions, which are linked to perceptions and the voluntary muscles control of the animals. Electrophysiological studies were performed in hippocampal preparations of brain of rats region CA1. The results suggest that the Nigriventrina is a potent blocker of receptors NMDA-R1 and

may thus serve as an instrument for neurochemistry investigations and as a model for the development of new drugs for the treatment of neurodegenerative diseases.

Key words: *Phoneutria nigriventer*. Spider venoms. Low molecular mass toxins. Neurochemistry.

SUMÁRIO

	Página
1- INTRODUÇÃO.....	15
1.1- Toxinas de origem animal.....	16
1.2- Artrópodes.....	18
1.3- Aranhas.....	20
1.4- Toxinas de baixa massa molecular.....	24
1.5- Sistema glutamatérgico.....	30
1.5.1- Receptores NMDA.....	35
1.6- Aranhas do gênero <i>Phoneutria</i>	37
1.7- Aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	38
2- OBJETIVOS.....	42
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1- Coletas das aranhas.....	43
3.2- Extração do veneno.....	43
3.3- Preparo das amostras.....	43
3.4- Purificação por sistema HPLC (High-performance liquid chromatography)	44
3.4.1- Veneno bruto.....	44
3.4.2- Fração hidrofílica.....	44
3.5- Espectrometrias de massas HRMS, ESI-MS / ESI-MSMS.....	45
3.6- Análises por Ressonância Magnética Nuclear.....	46
3.7- Bioensaios.....	47

3.7.1- Neurotoxicidade em camundongos.....	47
3.7.2- Identificação dos sítios de ação da neurotoxina em cérebros de ratos, por técnica imunoistoquímica.....	47
3.7.2.1- Animais.....	47
3.7.2.2- Cirurgia para a colocação da cânula icv e habituação.....	48
3.7.2.3- Administração das neurotoxinas	48
3.7.2.4- Perfusão transcardíaca.....	48
3.7.2.5- Pós-fixação dos encéfalos e microtomia.....	48
3.7.2.6- Expressão da proteína Fos.....	49
3.7.2.7- Identificação da natureza bioquímico-farmacológica dos receptores nervosos expressando proteína Fos: técnica da dupla-marcação.....	49
3.7.2.8- Aquisição das imagens.....	50
3.7.2.9- Análise estatística.....	50
3.7.3. - Eletrofisiologia: neurotoxicidade/neuroproteção em ratos.....	51
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1- Fracionamento do veneno bruto / Espectrometria de Massas.....	52
4.2- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	55
4.3- Análises de Espectrometria de Massas Sequenciais	58
4.4- Ensaio biológico.....	60
4.4.1- Neurotoxicidade em camundongos.....	60
4.4.2- Estudos de mecanismos de ação.....	61
4.4.2.1- Identificação das regiões de ação da toxina em cérebro de ratos: imunoistoquímica para detecção dos sítios de expressão da proteína Fos.....	61
4.4.2.2- Identificação da natureza bioquímico-farmacológica dos receptores associados às regiões de ação da toxina: experimentos de dupla marcação imunoistoquímica.....	65

4.4.3- Estudos do mecanismo de ação: eletrofisiologia de preparações hipocâmpais de cérebros de ratos.....	68
5- CONCLUSÃO.....	69
6- REFERÊNCIAS	71
7- ANEXOS.....	85
7.1- Anexo I- Espectro ¹³ C-RMN da amostra Nigriventrina.....	85
7.2- Anexo II- Espectro ¹ H-RMN da amostra Nigriventrina.....	86
7.3- Anexo III- Espectro 2D <i>g</i> -HMBC da amostra Nigriventrina.....	87
7.4- Anexo IV- Espectro 2D <i>g</i> -HSQC da amostra Nigriventrina.....	88
7.5- Anexo V- Espectro 2D <i>g</i> -COSY da amostra Nigriventrina.....	89

1- INTRODUÇÃO

Ao longo dos séculos, os produtos naturais têm servido como uma importante fonte de drogas para tratar e/ou prevenir doenças. São compostos orgânicos oriundos dos mais diversos organismos terrestres e aquáticos (plantas, microorganismos, animais vertebrados e invertebrados...), que vem sendo explorados e investigados devido à vasta diversidade de suas estruturas químicas e por se tratarem de compostos biologicamente ativos, que podem servir como modelos para novos medicamentos, satisfazendo as novas necessidades terapêuticas. Muitos avanços nesses estudos têm sido alcançados, devido ao desenvolvimento de novas técnicas sensíveis utilizadas para isolar, purificar e caracterizar esses componentes ativos. Além disso, abre-se a oportunidade para a investigação interdisciplinar, onde várias áreas como a química, a biologia molecular e celular, a bioquímica e a farmacologia entre outras, contribuem para se explorar a grande diversidade de estruturas químicas e atividades biológicas desses produtos naturais (CHIN et al., 2006; CLARK, 1996).

Uma mudança nos padrões de muitas doenças, principalmente entre as nações industrializadas, requer novas drogas mais eficientes, com menores efeitos colaterais e custos mais baixos, para torná-las acessíveis à grande maioria da população mundial. Em vários países do mundo estão sendo criados programas de bioprospecção para a exploração sustentável da biodiversidade, integrando institutos de pesquisa, instituições acadêmicas, governamentais e industriais, para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, visando à melhoria da saúde humana (PALMA et AL., 2001).

1.1- Toxinas de Origem Animal

O interesse por animais peçonhentos foi registrado por diversas civilizações antigas, que trataram de aspectos zoológicos, toxicológicos e terapêuticos, a exemplo dos romanos; ou que tiveram estes animais como objeto de veneração, como os egípcios, que cultuavam escorpiões; e os etruscos e provavelmente os povos pré-colombianos, que consideravam as aranhas sagradas (SILVA et al., 2005). São inúmeras e variadas as reações que os humanos sentem em relação a estes animais como fascínio, cautela e até mesmo terror. Assim, estes animais têm um lugar reservado na mitologia de muitas culturas ao redor do mundo bem como na cultura popular (RASH; HODGSON, 2002).

Nas últimas décadas tem sido crescente o interesse pelo estudo de várias espécies de organismos peçonhentos pela grande variedade de toxinas orgânicas encontradas em seus venenos. Essas toxinas servem como fontes de ferramentas básicas para as mais diversas aplicações: estudo dos sistemas fisiológicos como o sistema nervoso central e periférico, sistema cardiovascular, sistema hormonal, sistema complemento e sistema imune, mecanismos de dor, processos alérgicos, de coagulação sanguínea e homeostase; como também no desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos alternativos nos casos de envenenamento (MÉNEZ et al., 2006).

Apenas os organismos que possuem dispositivos para injeção / inoculação de seus venenos podem ser caracterizados como peçonhentos. A evolução desses aparelhos inoculadores (espinhos, dentes, ferrões, esporas ou arpões) como um meio de predação ou defesa é uma extraordinária e notável evolução biológica. Este fenômeno biológico é efetivamente limitado a certos grupos de animais. Entre os invertebrados podemos incluir os Cnidários (anêmonas do mar, medusas e corais), algumas famílias de moluscos (principalmente Conidae) e os artrópodes (centopéias, escorpiões, pseudo-escorpiões, carrapatos, aranhas e himenópteros tais como vespas, abelhas e formigas). Entre os vertebrados, apenas alguns répteis (cobras e lagartos) e peixes que possuem glândulas de veneno. Embora diversas classes de moléculas orgânicas tenham sido descritas a partir dos venenos destes grupos de animais, como alcalóides e acilpoliaminas, os peptídeos e as proteínas permanecem como os principais constituintes. Os venenos dos caracóis marinhos e artrópodes como aranhas, escorpiões e alguns insetos, parecem ter em sua

composição a maioria em peptídeos, enquanto as serpentes produzem venenos ricos em proteínas, porém, estudos revelam que os venenos compreendem várias centenas de componentes; um resultado que ainda aumenta seu potencial como fonte de novas drogas. (ESCOUBAS et al., 2008).

1.2- Artrópodes

Os Artrópodes, constituem o grupo de animais mais numerosos do planeta, nele estão incluídos os insetos, aracnídeos, crustáceos, diplópodes, entre outros. Estudos indicam que este grupo representa cerca de oitenta por cento de todo o reino animal, o que faz dos artrópodes o grupo mais rico em espécies, diversidade de formas, tamanhos, cores e novas moléculas em todo o planeta.

O sucesso dos Artrópodes em colonizar a terra é atribuído à extraordinária versatilidade química destes animais. Eles produzem substâncias para as mais diversas propostas: venenos para paralisar e/ou matar suas presas, repelentes e irritantes para afastar seus inimigos, feromônios para comunicação social e reprodução, entre outras funções. As glândulas responsáveis pela produção destas substâncias são geralmente integumentais, tendo se derivado de regiões especializadas da epiderme (MEINWALD; EISNER, 1995).

Uma grande quantidade de produtos naturais é produzida e secretada pelos Artrópodes nas mais diversas situações. Temos o exemplo do sistema defensivo do pseudo-escorpião *Mastigoproctus giganteus*, que esguicha uma mistura de ácido acético e ácido caprílico contra seus inimigos, onde a função do ácido caprílico é de agente lipofílico, sobre a epicutícula (recoberta de lipídeos) do inseto-agressor, facilitando o transporte do ácido acético através do escudo de defesa de seu agressor, e causando sua morte (EISNER et al., 1961). Uma estratégia simples, que tem permitido ao pseudo-escorpião sobreviver por 400 milhões de anos; e muitos Artrópodes, que utilizam outros tipos de químicas defensivas, também se utilizam desta mesma estratégia para render seus agressores (ATTYGALLE et al., 1993).

Enquanto as secreções defensivas dos Artrópodes se baseiam em compostos de estruturas químicas bem caracterizadas, tais como ácidos alifáticos, aldeídos, fenóis e quinonas, há muitos casos em que os compostos apresentam estruturas químicas complexas, como por exemplo, no caso dos besouros Dyticidae, *Abedus herbeti*, que produzem uma mistura de pregnanos entre os quais a desoxicorticosterona é o principal componente da mistura defensiva (LOKENS GARD et al., 1993).

Os alcalóides são considerados um dos tipos de compostos mais interessantes do sistema defensivo dos artrópodes, sob o aspecto da diversidade estrutural. Ao contrário do que se acreditava que estes compostos se originavam

somente em função do metabolismo secundário das plantas tornou-se claro a cerca de algumas décadas, que os Artrópodes são tanto prolíficos, como também químicos inovativos de alcalóides. Como exemplo, o milípide *Polyzonium rosalbum* libera o odor canforáceo de terra, em função da secreção do isoprenóide espirocíclico imina polizonimina (SMOLANOFF et al., 1975). A biosíntese desta imina e seu congênero, nitropolizonamina (MEINWALD et al., 1975), pode ser outra área de desafio para futura exploração química. O alcalóide chilocorine isolado do besouro Coccinelidae, *Chilocorus cacti*, foi elucidado como sendo uma acetogenina que foi elaborada a partir de uma cadeia linear de 13 átomos de carbonos, agrupados em certos pontos por três ligações convergentes para um átomo de nitrogênio trivalente (McCORMICK et al., 1994).

O grande interesse por diversas áreas científicas no estudo das novas moléculas oferecidas pelos Artrópodes se deve às notáveis propriedades que possuem tais como: alta eficiência, baixa probabilidade de resistência microbiana, toxicidade limitada e baixa imunogenicidade para o homem (PALMA et al., 2001).

1.3- Aranhas

Pertencentes ao filo Arthropoda, as aranhas (ordem: Araneida) ocupam grande parte dos nichos ecológicos do planeta, revelando uma enorme plasticidade adaptativa, que se reflete na diversidade química de suas toxinas. Geralmente as estruturas e modos de ação das toxinas de venenos de aranhas, estão em estreito relacionamento com sua biologia, modo de caça e seleção de presas. As aranhas estão distribuídas por todo nosso planeta, tendo conquistado todos os ambientes naturais, com exceção do ar e mar aberto (FOELIX, 1996) e formam o maior grupo taxonômico de organismos com hábito alimentar exclusivamente carnívoro (CODDINGTON; LEVI, 1991).

A ordem Araneida apresenta cerca de 40 mil espécies descritas (GRISHIN, 1999), embora muitos especialistas estimem que este número seja bem maior, ultrapassando 100.000 (SCHVARTSMAN, 1992). Das espécies descritas, estima-se que menos de 100 sejam potencialmente perigosas ao homem. Na maioria das vezes elas assustam, embora poucas sejam capazes de trazer prejuízos ao homem e são extremamente importantes para o equilíbrio da natureza (BARBARO et. al., 1995; RUPPERT; BARNES, 1996).

As aranhas apresentam o corpo dividido em dois segmentos, o cefalotórax (união entre cabeça e tórax) e o abdômen. No cefalotórax articulam-se quatro pares de pernas, um par de pedipalpos e um par de quelíceras onde se localizam os ferrões utilizados para inoculação do veneno (RUPPERT; BARNES, 1996).

Há dois grupos principais de aranhas: o Ortognatha ou Migalomorfa cujas quelíceras se projetam à frente partindo do cefalotórax enquanto as presas se posicionam para baixo e existe também o grupo Labidognatha ou Araneomorfa, no qual os representantes possuem as quelíceras posicionadas verticalmente e que conjuntamente com as presas se movem lateralmente como pinças. São animais carnívoros, alimentando-se principalmente de insetos e outros artrópodes, como também de espécies maiores como rãs, lagartos, serpentes, pequenas aves e roedores, utilizando-se do seu veneno para captura das presas (RASH; HODGSON, 2002).

Dependendo do tipo de ecossistema em que a aranha se encontra, ela ajusta seu comportamento de captura de presas para otimizar a obtenção de alimento. De acordo com o hábito alimentar e estratégia de caça, as aranhas podem ser divididas

em dois grupos: a) as aranhas construtoras de teias aéreas, que são aquelas que vivem apoiadas sobre suas teias, as quais são o instrumento fundamental para retenção e captura de presas; e b) as aranhas errantes, que podem ocupar os mais variados ambientes desde a superfície de uma planta até meios aquáticos, podendo habitar os locais mais inóspitos da terra, apresentando grande adaptação comportamental para caçar os mais variados tipos de presas (FOELIX, 1996).

Das espécies de aranhas já descritas, apenas um pequeno número foi investigado quanto à composição e às propriedades dos venenos. Os mesmos são constituídos de sais e íons inorgânicos como Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Cl^- , ácidos livres (cítrico, láctico, diidrofenilacético), glicose, aminoácidos livres, aminas biogênicas (espermina, espermidina, putrescina, cadaverina), neurotransmissores (glutamato, aspartato, GABA, histamina, dopamina, serotonina, epinefrina, epinina). O papel desses constituintes ainda não está bem esclarecido, mas podem em alguns casos agir potencializando a ação das neurotoxinas, podendo também representar produtos da degradação de outros componentes do veneno (ESCOUBAS et al., 2000). A grande maioria das toxinas identificadas nos venenos das aranhas são os peptídeos e as proteínas, altamente reticulados por diversas pontes dissulfeto. Em combinação com as poliaminas, os peptídeos parecem representar o principal arsenal tóxico das aranhas. As proteínas incluem tanto as neurotoxinas como as enzimas de alta massa molecular (proteases, hialuronidases, esfingomielinases, fosfolipases e isomerases) (RASH; HODGSON, 2002).

Há uma grande variação dos constituintes dos venenos das aranhas de acordo com o tipo de presa e a estratégia de caça de cada espécie. Observa-se também uma considerável heterogeneidade na composição entre os venenos de uma mesma espécie. Existe uma variação natural tanto qualitativa como quantitativa relacionada a fatores como idade, sexo, tamanho dos animais, dieta, distribuição geográfica, e heterogeneidade genética. Uma vez que o propósito primário das peçonhas de aranhas é de paralisar as presas, muitos componentes desses venenos têm como alvo principal o sistema nervoso central ou periférico, modulando a geração e propagação de potenciais de ação, agindo em vários sítios moleculares como, axônios, sinapse ou a junção neuromuscular (RUPPERT; BARNES, 1996; BINFORD, 2001; ESCOUBAS et al., 2008).

No Brasil, as aranhas pertencentes ao grupo das Labidognathas (araneomorfas): *Latrodectus* (viúva negra – Theridiidae); *Loxosceles* (aranha marrom

– Loxoscelidae) e *Phoneutria* (aranha Armadeira – Ctenidae), são consideradas as aranhas mais perigosas, por serem responsáveis pelos maiores números de acidentes graves por envenenamento e casos de morte já relatados (ESCOUBAS et al., 2000) (Fig.1).

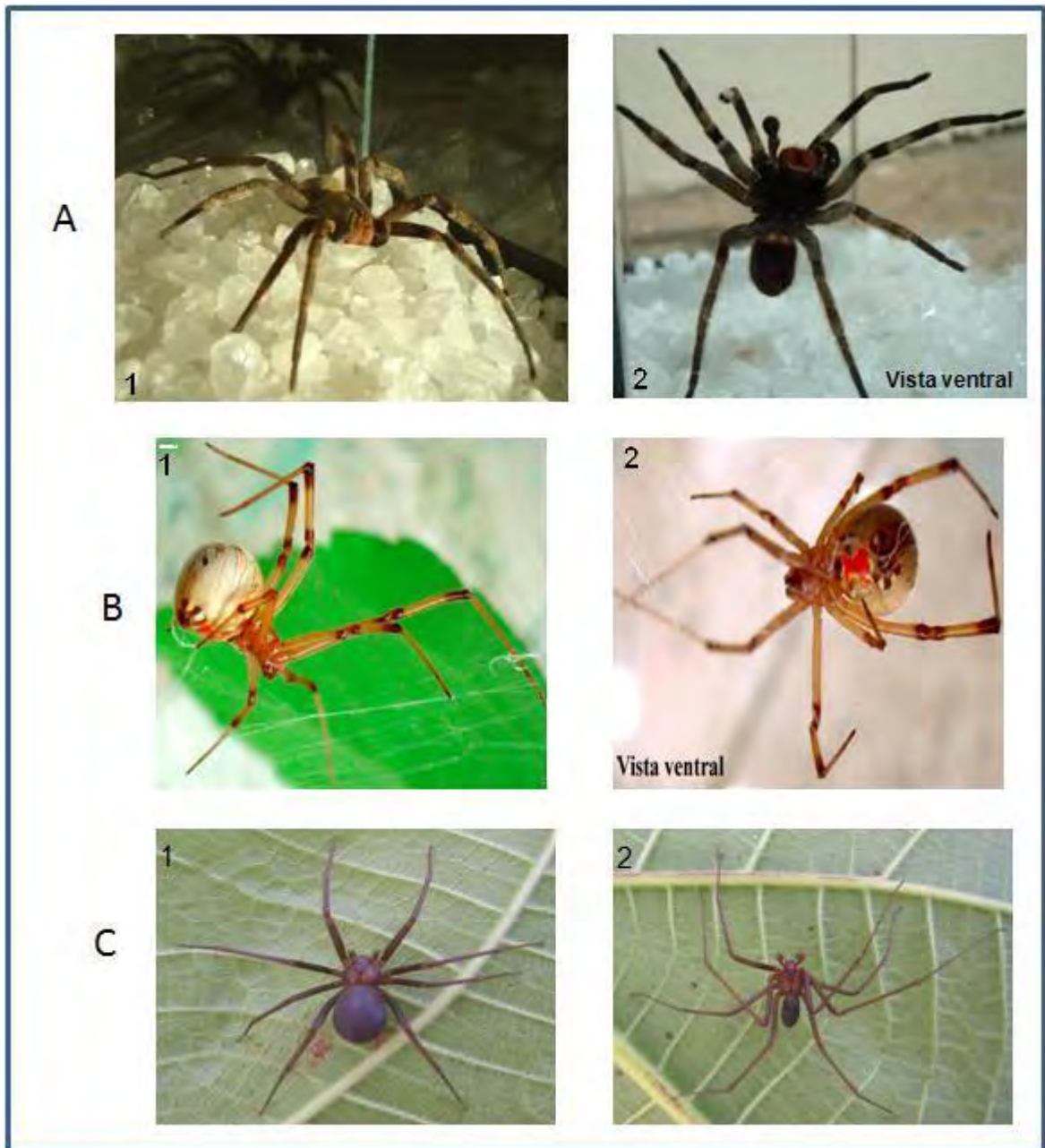


Figura 1- Algumas espécies de aranhas consideradas as mais perigosas e causadoras dos acidentes mais graves no Brasil. A) *Phoneutria nigriventer* (aranha Armadeira – Ctenidae), A1- vista frontal e A2- vista ventral; B) *Latrodectus curacaviensis* (viúva negra – Theridiidae), B1- vista lateral e B2- vista ventral; C) *Loxosceles sp.* (aranha marrom – Loxoscelidae), C1- fêmea e C2- macho. Fotos: A- produção própria; B e C- www.butantan.gov.br (Fotos: Yuri Messas e Denise M. Candido).

1.4- Toxinas de Baixa Massa Molecular

Os compostos orgânicos de baixa massa molecular estão presentes nos venenos das aranhas sob a forma de ácidos livres, tais como cítrico e láctico, como glicose e aminoácidos livres, aminas biogênicas, tais como di-aminopropano, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina, e neurotransmissores, como aspartato, glutamato, serotonina, histamina, GABA, dopamina, epinefrina, epinina e adrenalina (WELSH; BATTY, 1963; SCHAMBACHER et al., 1973; CHAN et al., 1975; ARAMAKI et al., 1986; EARLY; MICHAELIS, 1987; FREW et al., 1994).

As poliamino toxinas foram as primeiras neurotoxinas de aranhas que tiveram suas estruturas estudadas. Essas toxinas foram isoladas do veneno de aranhas da ordem Araneida, que possuíam ação bloqueadora de potenciais pós-sinápticos dos receptores de glutamato de junções neuromusculares de crustáceos (HAGIWARA; BYERLY, 1981). Outras toxinas de aranhas, como as do gênero *Nephila*, atuam nos receptores de glutamato, bloqueando a transmissão pós-sináptica, não somente em invertebrados, mas também em vertebrados (KAWAI et al., 1982). Antagonistas de receptores de glutamato do cérebro de mamíferos foram encontrados nos venenos de aranhas da família Araneidae. Algumas destas toxinas têm um efeito de paralisia nos insetos (GRISHIN, 1994).

Caracterizações químicas das acilpoliaminas revelam que as mesmas se apresentam numa variedade de estruturas relacionadas entre si, que contêm grupamentos aromáticos conectados a cadeias de poliaminas (ARAMAKI et al., 1986). A combinação de três cromóforos, dois tipos de aminoácidos que promovem as ligações entre os cromóforos e as cadeias de poliaminas, sete subtipos de cadeias de poliaminas, e nove opções de “caudas” resultam em 378 diferentes possibilidades estruturais para as toxinas acilpoliaminas do veneno da aranha do gênero *Nephila*, das quais, 91 diferentes estruturas desta toxina foram detectadas (PALMA; NAKAJIMA, 2005).

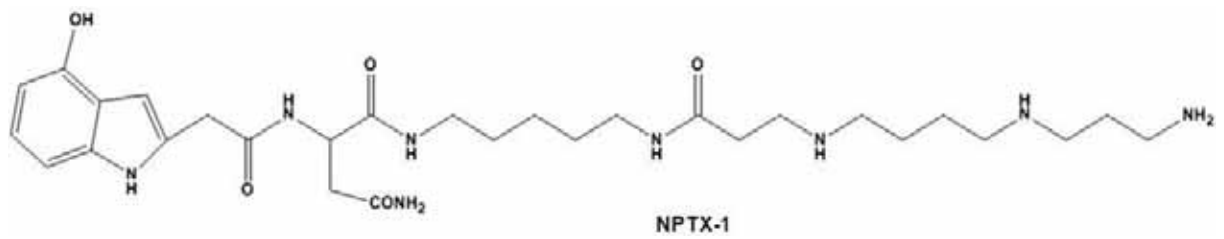
Além de explorar amplamente o uso de compostos orgânicos de baixas massas moleculares como toxinas, para propostas defensivas, as aranhas também se utilizam destas toxinas para paralisar e/ou matar suas presas, afetando as transmissões sinápticas, e bloqueando o funcionamento dos canais iônicos, por atuarem em seus receptores (GRISHIN, 1994). Toxinas de baixas massas moleculares e de ação neurotóxica, geralmente apresentam enorme potencial de

uso neuroquímico como ferramentas de estudos do sistema nervoso, e também como modelos para o desenvolvimento de novas drogas de aplicações neuroterapêuticas (McCORMICK; MEINWALD, 1993).

As toxinas de baixas massas moleculares são antagonistas potentes de receptores de neurotransmissores, os quais aparentemente exibem uma alta especificidade por receptores de L-Glutamato. Aquelas que possuem ação bloqueadora no receptor de glutamato têm sido testadas em fibras musculares (USHERWOOD et al., 1984; BATEMAN et al., 1985), medula espinhal de rã e neurônios piramidais do hipocampo de ratos e em insetos (ANTONOV et al., 1989).

Os venenos de aranhas também podem conter outros tipos de toxinas de baixa massa molecular já relativamente bem caracterizadas, apresentando massa molecular inferior a 1 kDa (PALMA; NAKAJIMA, 2005). Além das acilpoliaminas (fig. 2 e 3), isoladas dos venenos de diversas espécies de aranhas, podemos citar outras classes de toxinas como a bis-(agmatina)-oxamida (fig. 4), isolada do veneno de *Plectreurys tristis* (QUISTAD et al., 1993); as nucleosídeo-toxinas, que são compostos constituídos de mono ou dissulfatos derivados de guanossina ou xantossina, capazes de bloquear a ação de receptores de cainato, agindo em canais de cálcio do tipo-L, como exemplo um gliconucleosídeo di-sulfato (fig.5), isolado do veneno de *Hololena curta* (McCORMICK; MAINWALD, 1993); e as β -carbolinas, compostos alcalóides que agem preferencialmente como inibidores reversíveis da enzima monoamino oxidase (MAO), com atividade neurotóxica descrita para insetos, como uma série de tetra-hidro- β -carbolinas (fig. 6), isoladas do veneno da aranha social *Parawixia bistriata* (CESAR et al., 2005).

A)



B)

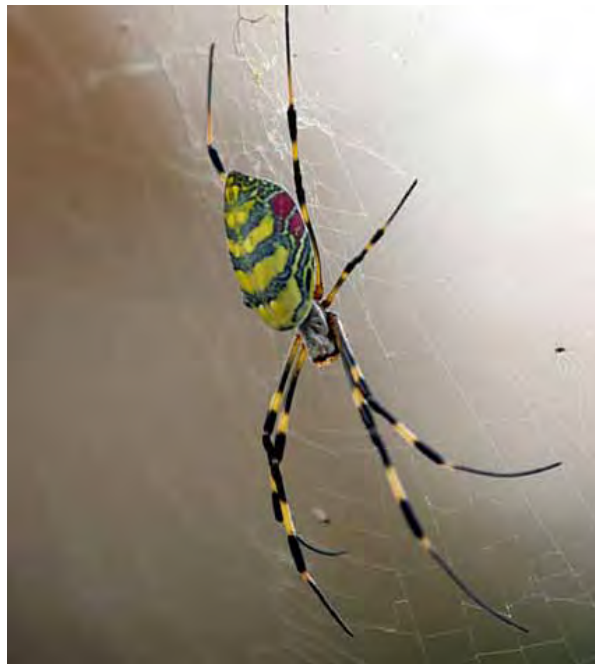


Figura 2- A) Estrutura da NPTX-1, uma acilpoliamina isolada do veneno da aranha *Nephila clavata* (MIYASHITA et al., 1997; KAWAI et al., 1982). B) Foto: www.cyberoz.net/city/sekine/zukan301.htm.

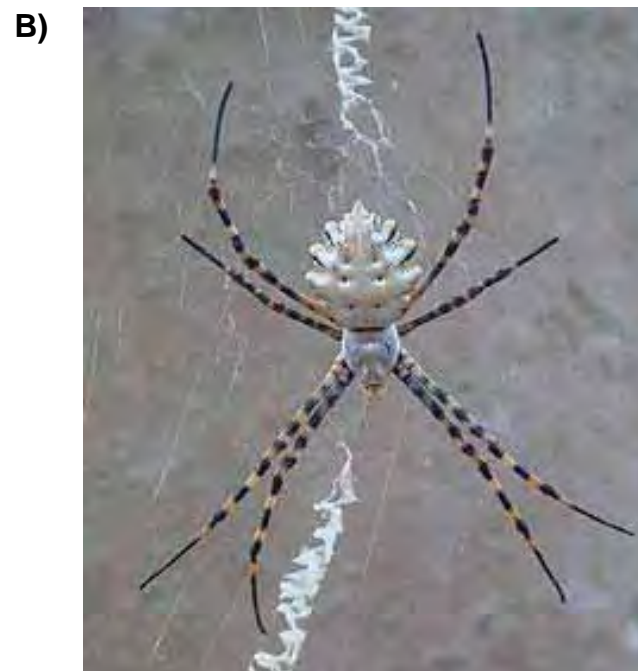
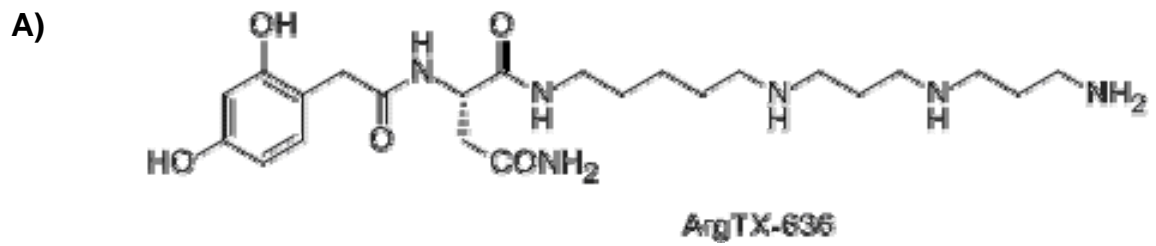


Figura 3- A) Estrutura da ArgTX-636, uma acilpoliamina isolada do veneno da aranha *Argiope lobata* (WILLIAMS, 1997). B) Foto: www.wildsideholidays.com/natural/insects.

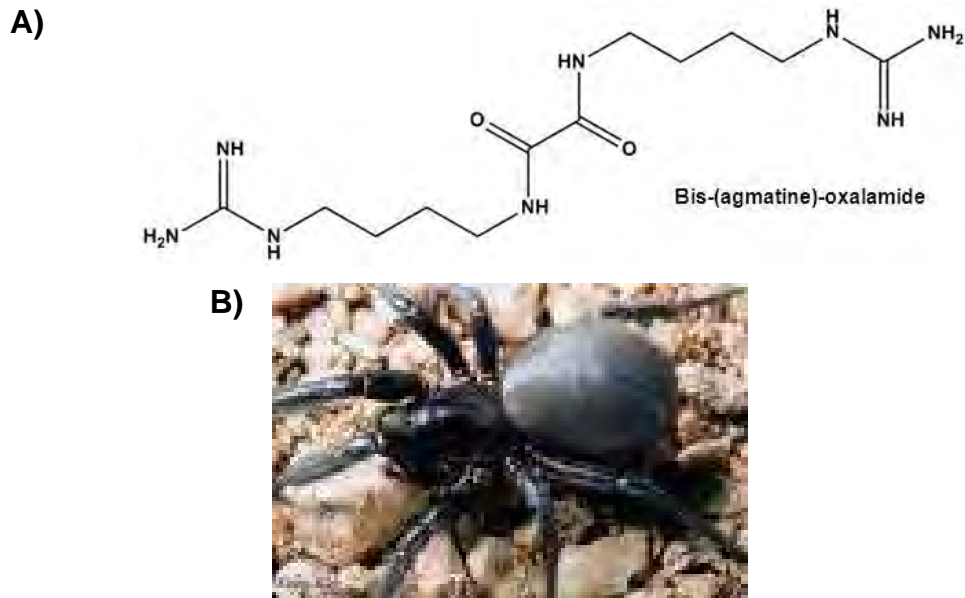


Figura 4- A) Estrutura da bis-(agmatina)-oxamida, isolada do veneno da aranha *Plectreurys tristis* (QUISTAD et al., 1993). B) Foto: www.flickr.com/photos/ddguarda/2583764593.

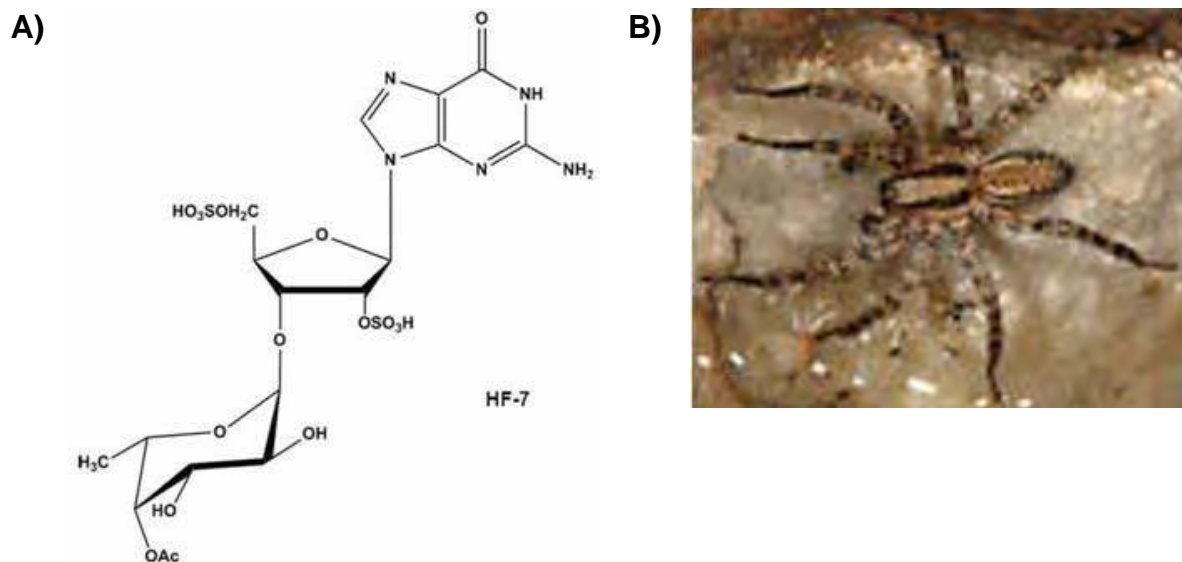


Figura 5- A) Estrutura da HF-7, um gliconucleosídeo di-sulfato, isolada do veneno da aranha *Hololena curta* (McCORMICK; MAINWALD, 1993). B) Foto: <http://bugguide.net/node/view/32475>.

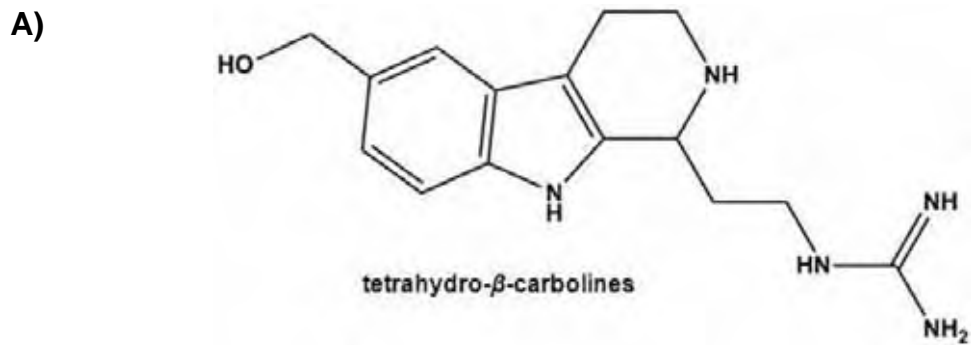


Figura 6- A) Estrutura de uma β -Carbolina isolada do veneno da aranha *Parawixia bistriata* (CESAR, et al., 2005). B) Foto: www.flickr.com/photos/ddguarda/2583764593.

1.5- Sistema Glutamatérgico

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos e no sistema nervoso periférico de insetos. O sistema glutamatérgico está envolvido em várias funções importantes do cérebro de mamíferos, como nas funções motoras, cognitivas, emocionais, memória e aprendizado, tendo um papel importante na sinalização excitatória, na sinaptogênese, plasticidade sináptica e na patogênese de doenças neurológicas (OZAWA et al., 1998; CONTI; WEINBER, 1999).

A liberação do glutamato envolve a síntese, armazenamento em vesículas sinápticas, secreção por exocitose e sua reabsorção da fenda sináptica. O contato prolongado do glutamato com os neurônios resulta em ativação excessiva dos receptores de glutamato, que estão envolvidos em várias doenças neurodegenerativas crônicas, como Alzheimer, Parkinson, isquemia e epilepsia (REIS et al., 1999).

Os receptores de glutamato (GluRs) são classificados em dois grupos principais (fig. 7): os receptores ionotrópicos (iGluRs) ligados a um canal iônico e os receptores metabotrópicos (mGluRs) ligados a mecanismos intracelulares de transdução de sinal via proteína G (SPOOREN et al., 2003).

Receptores do Glutamato

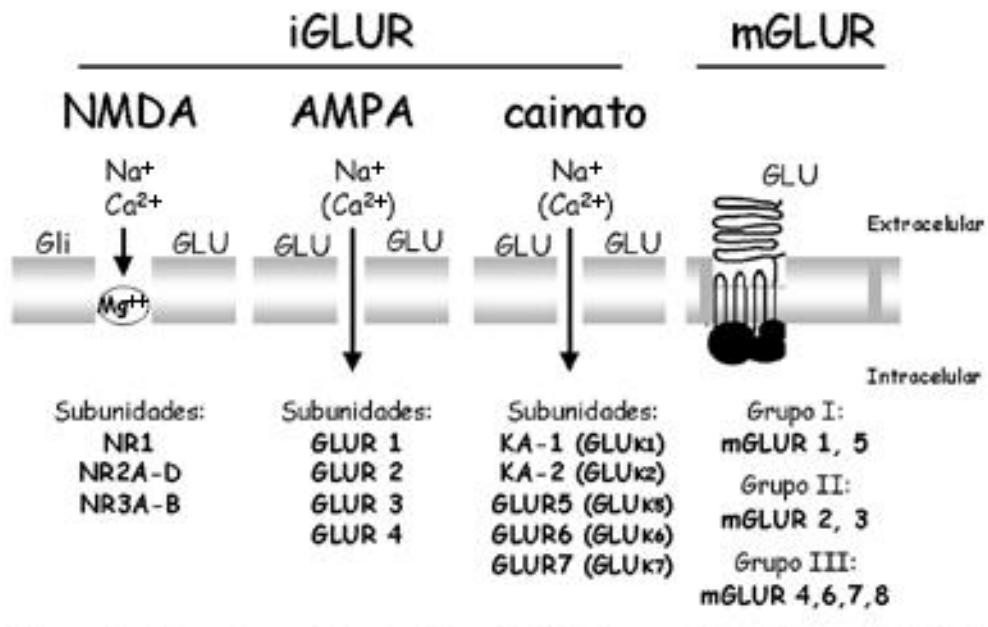


Figura 7- Classificação dos receptores de glutamato (GLURs): Receptores ionotrópicos (iGLURs) com os subtipos NMDA (subunidades NR1, NR2A-D, NR3), AMPA (subunidades GluR1-4), Kainato (subunidades GluR5-7 e Ka 1,2); e receptores metabotrópicos (mGLURs) divididos em: grupo I (mGLU1 e mGLU5), grupo II (mGLU2 e mGLU3) e grupo III (mGLU4, mGLU6, mGLU7 e mGLU8 (SPOOREN et al., 2003).

Os receptores metabotrópicos formam uma classe constituída de oito subtipos de receptores (mGLU1-8), classificados em três grupos (I, II e III), cujas ações são exercidas através de sistema de receptores acoplados a proteínas G e geram ações a longo prazo pela ativação e/ou inibição de processos intracelulares. Os receptores do grupo I (mGLU1 e mGLU5) são acoplados a proteína Gq, que ativa cascatas de mensageiros secundários (p. ex., fosfolipase C, etc.) promovendo a liberação de íons Ca^{2+} de estoques intracelulares. Os receptores do grupo II (mGLU2 e mGLU3) e do grupo III (mGLU4, mGLU6, mGLU7 e mGLU8) são acoplados a proteína Gi, inibindo a formação de AMPc (SPOOREN et al., 2003).

Os receptores ionotrópicos (iGluRs) exibem uma estrutura tetramérica, constituída por 4 subunidades que formam um complexo receptor homo ou heteromérico, específicos para cátions, sendo capazes de gerar respostas sinápticas rápidas. Estes receptores foram classificados de acordo com a ativação de

agonistas seletivos, assim, foram designados por subtipos: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) e kainato (Ka), representados na figura 8.

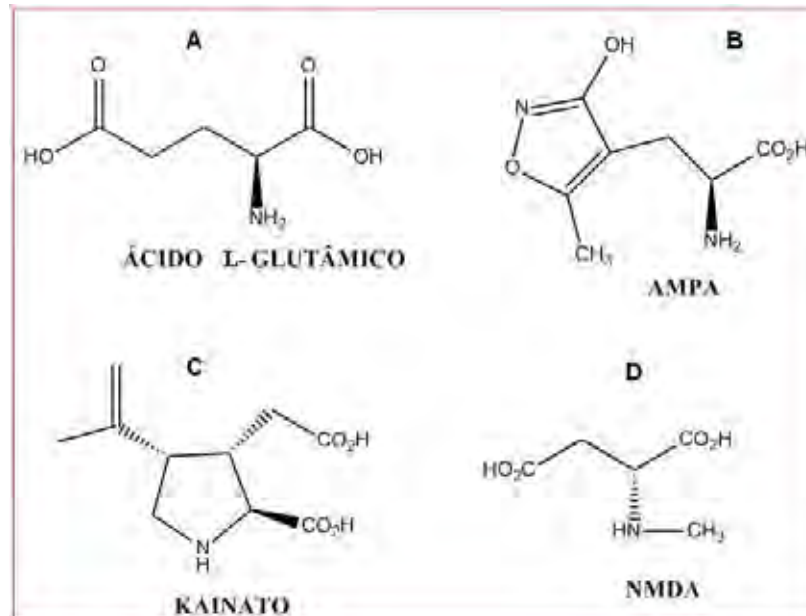


Figura 8- Agonistas ionotrópicos do Glutamato: A) Ácido L-Glutâmico; B) AMPA; C) Kainato; e D) NMDA. Adaptado (SOUZA et al., 2003).

Os receptores ionotrópicos são compostos por subunidades que, agrupadas, formam um poro central com condutância seletiva para íons Ca^{2+} e Na^+ . O iGLU subtipo NMDA possui várias subunidades denominadas NR1 (onde se liga a glicina), NR2A-D (onde se liga o glutamato) e NR3A-B. A combinação de duas subunidades NR1 com duas subunidades NR2 comporiam os receptores presentes em maior número no sistema nervoso central (DINGLELINE et al., 1999). Os receptores AMPA são formados por subunidades GLUR1-4 (BOULTER et al., 1990). Já os receptores kainato são formados por subunidades GLUR5-7 ou $\text{GLU}_{\text{KA}}5-7$, KA1-2 ou $\text{GLU}_{\text{KA}}1-2$ (HUETTNER, 2003).

Nos receptores do tipo AMPA, a subunidade GLUR2 é a mais importante na determinação dos fluxos do íon Ca^{2+} (PAPERNA et al., 1996; OZAWA et al., 1998). Por exemplo, receptores que contêm a subunidade GluR2 mostram baixa permeabilidade aos íons Ca^{2+} , enquanto que os receptores AMPA formados por

outras subunidades permitem o influxo de íons Ca^{2+} . A relação entre os subtipos KA e AMPA não está clara (WATKINS; JANE, 2006), embora alguns estudos sugerem que os efeitos eletrofisiológicos do KA podem ser mediados pelos receptores AMPA (HOLLMANN et al., 1989; PAPERNA et al., 1996).

O íon glutamato não atravessa a barreira hemato-encefálica, sendo sua síntese local. Após sua descarga em um evento excitatório pré-sináptico, o glutamato é eliminado no espaço extracelular. Na figura 9 um modelo do funcionamento de uma sinapse glutamatérgica é apresentado, onde se verifica que a liberação de íons glutamato dependente de íons Ca^{2+} , poderá ativar todos iGLU e mGLU, dependendo da afinidade, da localização e das características intrínsecas de cada receptor. Assim, acredita-se que o glutamato liberado ativa inicialmente os receptores AMPA e cainato que, apesar da baixa afinidade relativa pelo GLU, promoveriam a rápida despolarização da célula através da entrada de íons Na^+ e Ca^{2+} . A despolarização parcial da membrana plasmática removeria o bloqueio exercido pelo íon Mg^{2+} do interior do canal do receptor NMDA. Portanto, os íons glutamato ligando-se com alta afinidade na subunidade NR2, em associação com a glicina, ligada na subunidade NR1, promoveriam a entrada de íons Ca^{2+} e Na^+ , contribuindo para a excitabilidade da célula. A ativação dos mGLU, por envolver a ativação de mensageiros intracelulares, se daria em velocidade muito mais lenta. Contudo, seus efeitos poderiam se dar em dois níveis, inibindo a excitação através de receptores dos grupos II e III ou aumentando a excitabilidade, através dos receptores do grupo I. A ativação dos mGLU (grupos II e localização extra-sináptica promoveria a redução na liberação deste neurotransmissor. A ativação do mGLU1 e mGLU5 contribuiria para a ativação da membrana pós-sináptica, enquanto a estimulação do mGLU2 e mGLU3 inibiria a excitabilidade desta membrana. Um sistema de transporte seletivo de íons glutamato para células gliais e para os neurônios reduziria as concentrações sinápticas do aminoácido. A conversão do glutamato em glutamina, e sua subsequente captação neuronal poderiam, por sua vez, dar início à nova síntese de GLU e à nova liberação sináptica (CAROBREZ, 2003).

ser utilizada como fonte energética em potencial; tamponamento da amônia, substância potencialmente neurotóxica, via glutamina sintetase (AMARA; FONTANA, 2002; SCHOUSBOE et al., 1999; DAIKHIN; YUDKOFF, 2000; BARBOSA, 2007).

1.5.1- Receptores NMDA

O complexo canal do receptor de NMDA tem vários aspectos característicos. A presença da subunidade NR1 é essencial para tornar o canal funcional, enquanto a NR2 e NR3 têm uma ação modulatória nos canais formados pelos receptores de NMDA (SANCHEZ-PEREZ, et al., 2005; ZARAIN-HERZBERG et al., 2005). O canal deste receptor é altamente permeável a íons Ca^{2+} , bem como aos íons Na^+ e K^+ , e o aumento resultante da concentração intracelular de íons Ca^{2+} parece ser responsável tanto pela plasticidade neuronal, como pela neurotoxicidade, a qual esse receptor parece estar envolvido (MONAGHAN et al., 1989; COLLINGRIDGE; SINGER, 1990). Este receptor pode ser distinguido dos outros receptores de glutamato, por sofrer ação de vários agonistas, além da modulação pela glicina, bloqueio do canal pelo íon Mg^{2+} , ativação por poliaminas e inativação por íons Zn^{2+} (MONAGHAN et al., 1989). A inibição por íons Zn^{2+} envolve diminuição na frequência e no tempo de abertura do canal (CHRISTINE; CHOI, 1990; LEGENDRE; WESTBROOK, 1990). A saída do íon Mg^{2+} do poro do canal é voltagem-dependente; assim, quando o receptor do tipo AMPA é ativado ocorre despolarização da membrana, resultando em desbloqueio do canal do receptor do tipo NMDA, por repulsão eletrostática do Mg^{2+} , permitindo então um alto influxo de íons. Como a cinética de ativação dos canais-receptores NMDA é relativamente lenta, o fluxo de íons através desses canais contribui apenas para o componente tardio do potencial excitatório pós-sináptico (EPSP).

Estudos da distribuição das subunidades dos receptores ionotrópicos no sistema nervoso de animais experimentais demonstraram que receptores do tipo NMDA apresentam uma distribuição difusa pelo encéfalo, predominantemente no prosencéfalo, onde foi observado entre as estruturas do encéfalo uma maior expressão na região CA1 do hipocampo (MONAGHAN et al, 1989; SUBRAMANIAM; MCGONIGLE, 1991). Estudos por hibridização *in situ* evidenciaram a expressão de receptores do tipo NR1 praticamente em todo o encéfalo de roedores adultos, com proeminente expressão no cerebelo, hipocampo, córtex cerebral e bulbo olfatório;

receptores do tipo NR2 apresentaram elevada expressão no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo; e os receptores do tipo NR3 foram altamente expressos na medula espinal, bulbo, ponte e mesencéfalo, enquanto o prosencéfalo e cerebelo mostraram baixos níveis de expressão (MORIYOSHI et al.,1991; MONYER et al., 1994). Estes resultados foram reproduzidos com uso da técnica de imunohistoquímica (MATSUDA et al., 2002; PETRALIA et al.,1994; FOLADOR, 2008).

1.6- Aranhas do Gênero *Phoneutria*

Seis espécies de aranhas do gênero *Phoneutria* que ocorrem no Brasil foram descritas como sendo: *Phoneutria fera*, *Phoneutria keyserlingi*, *Phoneutria reidy*, *Phoneutria boliviensis*, *Phoneutria bahiensis* e *Phoneutria nigriventer* (LUCAS, 1988; SIMÓ; BRESOVIT, 2001).

As aranhas do gênero *Phoneutria* são consideradas como uma fonte valiosa de substâncias biologicamente ativas, tais como neurotoxinas letais, que atuam sobre canais iônicos e receptores químicos do sistema neuromuscular de animais; de agentes causadores de priapismo, de novas enzimas proteolíticas e de inseticidas (RICHARDSON, 2006).

Do veneno de aranhas do gênero *Phoneutria* (Aranae, Ctenidae) já foram isoladas várias toxinas de natureza protéica / peptídica que bloqueiam canais iônicos (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) (GOMEZ et al., 2002), enzimas proteolíticas, 15 isoformas peptídicas estruturalmente similares às tachykininas (PIMENTA et al., 2005). Entretanto, as toxinas orgânicas não protéicas de baixa massa molecular presentes na fração hidrofílica desse veneno, precisam ser investigadas e caracterizadas em relação à estrutura e função. Essas toxinas tem sido alvo de grande interesse para as indústrias farmacêutica e agroquímica, o que as tornam candidatos naturais à bioprospecção de compostos-líderes para o desenvolvimento de drogas de uso neuroterapêutico e/ou como bioinseticidas seletivos. Essas toxinas são antagonistas potentes de receptores de neurotransmissores, os quais aparentemente exibem uma alta especificidade por receptores de L-Glutamato (ESCOUBAS et al., 2000). Desta forma, este trabalho apresenta o estudo de identificação e caracterização de uma nova neurotoxina não protéica de baixa massa molecular, isolada da fração hidrofílica do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*.

1.7- Aranha *Phoneutria nigriventer*

Reino: Animalia; Filo: Arthropoda; SubFilo: Chelicerata; Classe: Arachnida; Ordem: Araneae; Sub-Ordem: Labdognata; Família: Ctenidae; Gênero: *Phoneutria*; Espécie: *Phoneutria nigriventer*.

A espécie *Phoneutria nigriventer* também conhecida como “aranha armadeira”, possui um dos venenos mais potentes dentre as aranhas. Seu corpo é coberto por pêlos curtos e aderentes, acinzentados ou amarronzados, com pares de manchas ao longo da parte dorsal do abdômen. Possui oito olhos em três filas: 2:4:2. Suas quelíceras apresentam-se cobertas com pêlos avermelhados no segmento basal e suas pernas são envoltas por grande quantidade de espinhos. As fêmeas adultas possuem abdômen negro (por isso a denominação *nigriventer*), enquanto que nos machos e nas fêmeas jovens, é alaranjado (LUCAS, 1988).

As aranhas dessa espécie não constroem teias, são errantes de vida noturna e solitária, utilizando do seu veneno para imobilizar as presas. São muito agressivas e quando se sentem ameaçadas, colocam-se em posição de ataque, apóiam-se nas pernas traseiras e erguendo as dianteiras saltam em direção da presa /competidor, justificando seu nome popular “Aranha Armadeira” (Fig. 10). São também conhecidas por “Banana Spider” devido à sua grande incidência nas plantações de banana causando um grande número de acidentes entre os trabalhadores daqueles locais. Vivem em bananeiras, troncos de árvores, folhas secas em matas fechadas e sob troncos e cupinzeiros. Na região urbana são encontradas em entulhos e jardins, bem como, próximo e dentro das moradias (LUCAS, 1988).

As vítimas de acidentes com a aranha *Phoneutria nigriventer* podem apresentar diversos sinais e sintomas clínicos como: inchaço, vermelhidão e sudorese local. A dor pode ser local ou irradiada, com intensidade variada e é sempre acompanhada de parestesias. Dependendo do estado da pessoa, além da dor, os sintomas mais comuns são taquicardia, hipertensão arterial, sudorese com visão turva e vômitos ocasionais, salivação, diarreia e priapismo. O hemograma pode apresentar leucocitose com neutrofilia e hiperglicemia. O quadro em crianças com menos de sete anos e idosos muito debilitados pode evoluir para edema pulmonar e choque, representando um risco não desprezível de morte (CUPO et al., 2003; BUCARETCHI et al. 2000). Os acidentes aumentam entre os meses de março a junho, época que saem para o acasalamento.

Essa espécie é responsável por numerosos casos de envenenamento ocorridos no Brasil central, sul e sudeste. É freqüentemente encontrada na capital e interior de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (LUCAS, 1988).

O veneno de *Phoneutria nigriventer* é uma mistura complexa de substâncias. Kaiser (1956) descreveu a presença de proteases e hialuronidase nesse veneno. Fischer e Bohn (1957) demonstraram que o veneno continha também aminoácidos livres, como ácido glutâmico, ácido aspártico e lisina. Diniz (1963) separou por eletroforese em papel, histamina, serotonina e polipeptídeos capazes de induzir contração do íleo de cobaia. Cruz-Hofling et al. (1985) em seus estudos eletrofisiológicos e morfológicos observaram que o veneno de *Phoneutria nigriventer* gerava um aumento de volume da região axoplasmática do nervo periférico de camundongo, devido a um influxo de íons sódio e conseqüente aumento do gradiente osmótico. Fontana e Vital-Brazil (1985) verificaram que o veneno de *Phoneutria nigriventer* gerava uma despolarização não uniforme da membrana de fibra muscular de diafragma de rato. Esse efeito era abolido por tetrodotoxina e por redução na concentração de íons sódio, o que sugeriu a atividade de componentes do veneno em canais de sódio.

O veneno bruto de *Phoneutria nigriventer* pode gerar formação de edema local em pele de rato e de coelho, de maneira dose-dependente (ANTUNES et al., 1992). Esses autores observaram que o edema induzido em pele de rato foi reduzido por antagonistas de receptores de serotonina e histamina e pela diálise do veneno, a qual levava à exclusão destes componentes (serotonina e histamina). Porém, em coelhos, quando se utilizou o veneno dialisado, não se observou redução do edema induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV), indicando a presença de outro(s) componente(s) edematogênico(s) nesse veneno. A formação de edema evocada pelo veneno em pele de rato é parcialmente mediada via um mecanismo envolvendo receptor NK1 de taquicinina, que é independente de histamina e serotonina (PALFRAMAN et al., 1996). Antunes et al. (1992) demonstraram que a diálise do veneno não foi suficiente para impedir tal edema, sendo pouco provável que neurotoxinas sejam responsáveis por tal efeito sobre receptores NK1, uma vez que a diálise extraiu os componentes com massas moleculares inferiores a 12000-14000Da.

Costa et al. (1996) observaram que o veneno de *Phoneutria nigriventer* gera uma breve hipotensão, devida parcialmente à ativação de canais de potássio ATP-dependentes, seguida de prolongada hipertensão arterial em ratos anestesiados. Essa hipertensão, segundo os autores, poderia ser resultante de um influxo de íons cálcio no músculo vascular ou cardíaco.

Recentemente, houve um aumento do número de trabalhos relativos à caracterização bioquímica e farmacológica das neurotoxinas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. Esse interesse deve-se ao fato de que tais neurotoxinas podem funcionar como ferramentas para o estudo do funcionamento de canais iônicos em nível celular e molecular (DINIZ et al., 1990; ARAÚJO et al., 1993a; ROMANO-SILVA et al., 1993; CASSOLA et al., 1998; KALAPOTHAKIS et al., 1998; MIRANDA et al., 1998) e também à existência de distintas proteínas tóxicas com efeitos em mamíferos e/ou insetos (REZENDE JR et al., 1991; FIGUEIREDO et al., 1995; DE LIMA et al., 2002).

Muitos estudos farmacológicos e eletrofisiológicos de toxinas peptídicas isoladas desse veneno mostraram que a toxina Tx1 tem ação em canais de Ca^{2+} (SANTOS et al., 1999), toxinas do tipo Tx2 afetam canais de Na^+ (ARAÚJO et al., 1993a, 1993b; MATAVEL et al., 2002), o grupo Tx3 tem ação em canais de K^+ ou Ca^{2+} (TRONCONE et al., 1995; PRADO et al., 1996; GUATIMOSIM et al., 1997; LEÃO et al., 2000; MIRANDA et al., 1998; CASSOLA et al., 1998; KUSHMERICK et al., 1999; GOMEZ et al., 2002; SANTOS et al., 2002; VIEIRA et al., 2003; CARNEIRO et al., 2003, CASTRO JUNIOR, et al., 2008). A toxina inseticida Tx4 (6-1) estimula a liberação de glutamato das junções neuromusculares em barata (FIGUEIREDO et al., 1997) e inativa a corrente de íons sódio em SNC de insetos, porém não em canais de Na^+ de mamíferos (DE LIMA et al., 2002). A toxina Tx4 também mostrou-se capaz de inibir a liberação de glutamato em sinapses cerebrais (MAFRA et al., 1999). Yonamine et al. (2004) sugerem o envolvimento do óxido nítrico na intoxicação pela fração Tx2-5, em camundongos. Igualmente, a fração Tx4 (5-5) foi capaz de inibir seletiva e reversivelmente o subtipo de receptores de glutamato, o N-metil-D-aspartato (NMDA) em neurônios hipocâmpais de rato (FIGUEIREDO et al., 2001; CARNEIRO, 2006). Recentemente uma nova família de neurotoxinas (4KDa) apresentou atividade sobre canais de Ca^{2+} (LUCIO et al., 2008). Nunes et al. (2008) descreveram que a toxina Tx2-6 provoca ereção peniana (priapismo) em ratos.



Figura 10- Aranha *Phoneutria nigriventer* (“Armadadeira”) em posição de ataque. Foto: www.flickr.com/photos/techuser/3370512036/.

2- OBJETIVOS

O presente trabalho é parte dos subprojetos prospectivos do programa BIOprospecTA/BIOTA-FAPESP, no qual o grupo de Biologia Estrutural e Zooquímica do CEIS / Depto. Biologia do IBRC-UNESP está envolvido. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi isolar, identificar, elucidar a estrutura química, caracterizar funcionalmente e determinar os principais mecanismos de ações da toxina de baixa massa molecular mais abundante da fração hidrofílica do veneno da aranha *Phoneutria nigrivener* (Araneae; Ctenidae).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Coletas das Aranhas

As aranhas da espécie *Phoneutria nigriventer* foram coletadas na região do município de Santa Bárbara (19^o34'S, 42^o58'W), no Estado de Minas Gerais. Elas foram mantidas no aracnidário científico da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), em Belo Horizonte / MG, alimentadas com água e insetos *ad-libitum*, exceto nas duas semanas precedentes à extração do veneno, a qual foi efetuada uma vez por mês. Foram também utilizadas para a extração do veneno, aranhas da espécie *Phoneutria nigriventer* que já pertenciam ao aracnidário científico da FUNED.

3.2- Extração do Veneno

O veneno foi obtido por estimulação elétrica das quelíceras das aranhas (BARRIO; VITAL BRAZIL, 1949). Ao receber o estímulo de 6 V, as aranhas secretaram o veneno (5 a 12 µL), que foi coletado em pipeta Pasteur e transferido para um becker de 5,0 mL mantido em um banho de gelo, posteriormente centrifugado a 14000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi então coletado, liofilizado e mantido a -20° C até o momento de sua utilização.

3.3- Preparo das Amostras

Foram solubilizados 200,0 mg do veneno bruto aranha *Phoneutria nigriventer* em 20,0 mL de solução TFA/H₂O 0,1% (v/v) e centrifugados por 10 min. a 8000 rpm. O sobrenadante foi coletado, homogeneizado e novamente centrifugado por 10 min. a 8000 rpm. Após homogeneizado, o sobrenadante foi dividido e transferido para 10,0 tubos eppendorf de 2,0mL, ficando cada um com uma concentração de 10,0 mg/mL. Essas amostras foram mantidas em freezer -20° C até o uso.

3.4- Purificação por Sistema HPLC (*High-performance liquid chromatography*)

3.4.1- Veneno Bruto

O veneno bruto da aranha *Phoneutria nigriventer* foi purificado em sistema HPLC sob fase reversa num gradiente de 0 a 70% de solução B por 160 minutos a um fluxo de 5mL/min., onde foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-10AD, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-10A, constituído por duas bombas LC-10AD (bombas A e B), com injetor Rheodyne modelo 7725i com “loop” de 2000µL, um sistema controlador Shimadzu (modelo CBM-10A) e coluna preparativa Vydac C4 (214TP1022). Para a fase móvel, foram utilizados dois solventes, solvente A (água, contendo 0,1% TFA (v/v)) e solvente B (acetonitrila 100% (Mallinckrodt) contendo 0,1% TFA (v/v)). A eluição das frações foi monitorada por medidas de absorção de luz ultravioleta em 214 nm, 254 nm e 280 nm. O controle de aquisição de dados foi feito através do software CLASS LC 10. As frações foram coletadas manualmente em tubos de vidro de 5.0 mL, liofilizadas e mantidas em freezer -20° C até o uso.

3.4.2- Fração Hidrofílica

A fração hidrofílica do veneno bruto da aranha *Phoneutria nigriventer* foi purificada em sistema HPLC sob fase reversa num gradiente de 0 a 30% de solução B por 45 minutos a um fluxo de 1,7mL/min, sendo utilizado um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-10AD, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-10A, constituído por duas bombas LC-10AD (bombas A e B), com injetor Rheodyne modelo 7725i com “loop” de 500µL, um sistema controlador Shimadzu (modelo CBM-10A) e coluna semipreparativa C-18 (10 x 250mm, 5µm) (Shiseido). Para a fase móvel, foram utilizados dois solventes, solvente A (água, contendo 0,1% TFA (v/v)) e solvente B (acetonitrila 100% (Mallinckrodt) contendo 0,1% TFA (v/v)). A eluição das frações foi monitorada por medidas de absorção de luz ultravioleta em 214 nm, 254 nm e 280 nm. O controle de aquisição de dados foi feito através do software CLASS LC 10. As frações foram coletadas manualmente em tubos de vidro de 5.0 mL, liofilizadas e mantidas em

freezer -20° C até o uso. As frações secas foram solubilizadas em 200µL de solução 50% MeCN / H₂O, transferidas para tubos Eppendorf de 0,5mL e analisadas em espectrômetro de Massas ESI-MS.

3.5- Espectrometrias de Massas HRMS, ESI-MS / ESI-MSMS

O acompanhamento da homogeneidade das frações foi realizado com uso da espectrometria de massas. A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um Espectrômetro de Massas ESI, do tipo triploquadrupolo modelo QUATTRO II (Micromass). O espectrômetro de massas ESI foi equipado com probe padrão, do tipo electrospray (ESI), auxiliado por uma microbomba de infusão (K D Scientific). O software MassLynx (Micromass) foi utilizado para controle de aquisição de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do cone foi mantida a 80° C e a voltagem na agulha a 3,55 kV, aplicando-se um fluxo de gás secante (nitrogênio) de 200 L/h e um fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) de 20 L/h. O espectrômetro de massas foi calibrado com os picos do envelope de íons-fragmentos da mioglobina de coração de cavalo, produzidos por aplicação de potencial de 40V no cone de amostra. A detecção no espectrômetro de massa foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 3000, em 10 segundos, com uma resolução de aproximadamente 3000; o sistema de aquisição de dados foi operado em modo contínuo.

Para os experimentos de espectrometria de massas seqüenciais, o fluxo do probe ESI foi ajustado para 200µL/h com auxílio da bomba de microinfusão. Foi utilizado Argônio como gás de colisão a uma pressão de $3 \cdot 10^{-3}$ mBar. Os íons fragmentos foram detectados por leituras a cada 4 segundos, com uma voltagem de 40V no cone.

As análises de HRMS foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Norberto P. Lopes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Departamento de Física e Química da USP-RP. Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de Massas modelo: ultrTOF-Q-ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). Condições do Experimento: Bomba de Infusão, Fluxo 150µL/h, Fase Móvel para a Solubilização: H₂O: ACN (50:50). O modo de detecção foi positivo para a Amostra. O Aparelho é de alta resolução

necessitando de calibração interna e externa, antes de realizar as análises. Usa-se para calibração interna uma solução de NA-TFA a 10mg/ml com uma relação das condições do aparelho com os seguintes valores: End Plate: 3500 Volts; Capillary: 4000 Volts; Capillary Exit: 300 Volts; Skimmer 1: 50 Volts; Skimmer 2: 25 Volts.

3.6- Análises por Ressonância Magnética Nuclear

As análises de RMN foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Cláudio F. Tormena, do Instituto de Química da Universidade de Campinas, Campinas, SP. Foram obtidos espectros de ^1H e ^{13}C (em uma dimensão 1D), bem como mapas de contorno em duas dimensões (COSY, gHSQC e gHMBC). As análises de RMN foram realizadas a 25°C, num espectrômetro Bruker DRX 500 operando a 500.11 MHz para ^1H e 125.08 MHz para ^{13}C .

A amostra para obtenção de espectros de RMN foi preparada dissolvendo-se cerca de 3 mg do composto em 0,7 mL de solvente deuterado. A amostra foi filtrada antes de se adquirir os espectros para obter uma melhor resolução digital, pois a ausência de partículas sólidas facilita o ajuste da homogeneidade do campo magnético “shim”.

Os espectros foram obtidos utilizando-se DSS (decil sulfato de sódio) como referência para as medidas de deslocamento químico de hidrogênio e carbono e o sinal do deutério do solvente como “trava do campo-externo” (lock) e também para o ajuste da homogeneidade do campo. Estes espectros foram obtidos utilizando-se as seqüências de pulso padrão da Bruker; a escolha dessas seqüências de pulso depende do tipo de análise necessária para a elucidação estrutural.

3.7- Bioensaios

3.7.1- Neurotoxicidade em Camundongos

Como animais modelo de ensaios de neurotoxicidade em mamíferos, foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculos*) machos com aproximadamente 18,0 g, criados e mantidos junto ao biotério da FUNED. A amostra (Nigriventrina) foi diluída em solução BSA/Salina (0,25mg BSA / mL de Salina 0,9%) e injetado de forma *icv* (5,0µL de solução, correspondendo de 1 a 8 µg/animal). Foram utilizados 5 grupos de 4 animais, com 4 concentrações diferentes de amostra (1, 3, 5 e 8 µg/animal) e para o grupo controle apenas a solução BSA/Salina. Neste experimento observou-se a ocorrência ou não de rigidez corporal e a capacidade locomotora de cada animal. Os experimentos foram realizados junto ao Biotério da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte - Minas Gerais.

3.7.2- Identificação dos Sítios de Ação da Neurotoxina em Cérebros de Ratos, por Técnica Imunoistoquímica.

O método empregado foi executado como descrito previamente por Cesar (2000). Os experimentos foram realizados junto ao Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica com a colaboração da Dra. Lilian M. M. Cesar- Tognoli.

3.7.2.1- Animais

Os animais utilizados nesses experimentos foram ratos Wistar machos adultos com 60 dias e peso aproximado de 250 a 300 g, trazidos para o biotério de experimentação sete dias antes do procedimento cirúrgico para ambientação ao novo local, sendo alojados dois animais por gaiola, com ração e água *ad libitum* e permanecendo num ciclo de claro/escuro de 12:12 horas a partir das 7:00h, em temperatura ambiente de 21°C e umidade relativa do ar de 55%. Os experimentos foram conduzidos em conformidade com as normas do Instituto Nacional de Normas de Saúde e Cuidados na Utilização de Animais de Laboratório (1996) e da Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNESP.

3.7.2.2- Cirurgia para a Colocação da Cânula icv e Habituação

A cânula guia foi implantada no ventrículo lateral (AP = - 0,4; ML = - 1,4; DV = - 3,4) (PAXINOS; WATSON, 1998) sob ação anestésica de cetamina, xylazina e acepromazina (25:5:1 mg/Kg peso corpóreo) sete dias antes da injeção da amostra (Nigriventrina). Durante esse período que antecedeu o experimento, os animais foram manipulados pelo experimentador, pelo menos duas vezes ao dia, durante 10 minutos, para promover a habituação do animal e minimizar o estresse, no momento da injeção intracerebroventricular (icv), que poderia vir a interferir nos resultados finais.

3.7.2.3- Administração das Neurotoxinas

Para a injeção intracerebroventricular (icv), a cânula de injeção foi introduzida pela cânula guia, cerca de duas horas antes do experimento. O grupo teste (n=3) recebeu cerca de 10 μ L de solução contendo a amostra (Nigriventrina) na concentração de 0,1 μ g/ μ L. Já o grupo controle (n=3) recebeu cerca de 10 μ L de veículo [(solução salina 0,9% (m/V))].

3.7.2.4- Perfusão Transcardíaca

Após duas horas decorridas da injeção da amostra (Nigriventrina), tempo em que a marcação da proteína Fos mostrou-se mais efetiva (CESAR, 2000), os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca, primeiramente com solução salina 0,9% (m/V) (cerca de 75mL), seguida pelo fixador formaldeído a 4% (m/V) a 4°C (cerca de 750 a 800mL) durante 25 minutos.

3.7.2.5- Pós-fixação dos Encéfalos e Microtomia

Após a perfusão, os encéfalos foram retirados e colocados em solução fixadora de formaldeído a 4% (m/V), contendo 10% (m/V) de sacarose para crioproteção e pós-fixados por 04 horas, em seguida foram transferidos para uma solução salina de tampão fosfato de potássio (KPBS) contendo 10% de sacarose por

cerca de 08 horas. Os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelamento, com 30 µm de espessura no plano coronal em 05 séries de 01 em 05 e armazenados a – 20°C em solução anticongelante de etileno glicol/glicerol.

3.7.2.6- Expressão da Proteína Fos

Uma série de cortes do encéfalo de cada um dos animais utilizados nos experimentos foi usada para a marcação imunistoquímica. Os cortes foram tratados com 0,3% de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato de potássio (KPBS) + 0,3% de Triton X-100, por cerca de 30 minutos e incubados em soro normal de cabra para bloqueio. Decorrido o tempo necessário, os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-*fos* (Calbiochem Ab-5) feito em coelho, na concentração 1:20000 e 3% de soro normal de cabra em KPBS + 3% de Triton X-100, por 24 horas a temperatura ambiente ou por 48 horas em geladeira, sob constante agitação e no escuro. Os cortes foram então lavados em KPBS e incubados, por 1 hora, em anticorpo secundário biotinilado, feito em cabra contra coelho (Jackson Labs 1:1000) e por mais 1 hora em complexo de avidina-biotina (Vector, 1:500). Após esses procedimentos os cortes foram revelados com tetrahydroclorato de diaminobenzidina 0,05% (DAB, Sigma) e 0,03% de peróxido de hidrogênio dissolvidos em KPBS. Os cortes permaneceram reagindo por cerca de 3 minutos, e para cessar as reações foram realizadas lavagens sucessivas com KPBS (GERFEN; SAWCHENKO, 1984; SHU et al, 1988; SITA et al., 2003). Uma vez ocorrida à reação para a marcação de *fos* os cortes foram montados em lâminas e intensificados em solução de ósmio 0,005% para realçar a reação imunistoquímica.

3.7.2.7- Identificação da Natureza Bioquímico-farmacológica dos Receptores Nervosos Expressando Proteína Fos: Técnica da Dupla-Marcação

Para os experimentos de expressão da proteína Fos e ensaios de duplas marcações foram utilizados anticorpos anti-NMDA-R1.

Nas reações de dupla imunistoquímica, uma série de cortes foi tratada com 0,3% (v/v) de peróxido de hidrogênio em solução tampão KPBS + 0,3% (v/v) de Triton X-100, por cerca de 30 minutos e incubados em soro normal de cabra para bloqueio. Decorrido o tempo necessário, os cortes foram incubados em anticorpo

primário anti- *fos* (Calbiochem Ab-5) feito em coelho, na concentração 1:20000 e 3% (v/v) de soro normal de cabra em KPBS + 3% (v/v) de Triton X-100, por 24 horas à temperatura ambiente, sob constante agitação. Os cortes foram então lavados em KPBS e incubados em anticorpo biotinilado secundário feito em cabra contra coelho (Jackson Labs 1:1000) e em complexo de avidina-biotina (Vector, 1:500), ambos por 1 hora. Após esse procedimento os cortes foram revelados com tetrahydroclorato de diaminobenzidina e níquel 0,05% (DAB-Ni, Sigma) e 0,03% (v/v) de peróxido de hidrogênio dissolvido em KPBS. Os cortes permaneceram reagindo por cerca de 3 minutos e para cessar as reações foram realizadas lavagens sucessivas com KPBS. Em seguida, os cortes foram lavados e incubados em KPBS + 0,3% de Triton X-100 + anticorpos anti-NMDA-R1 (1:1000), sendo incubados por 48 horas em geladeira, sob constante agitação. Os cortes foram lavados em solução de KPBS e incubados em solução contendo anticorpo secundário biotinilado de cabra contra coelho (Jackson Labs, 1:200) por 1 hora, seguida por mais 1 hora de incubação em complexo de avidina-biotina (Vector 1:500). Em seguida os cortes foram incubados em tetrahydroclorato de diaminobenzidina (DAB, Sigma) e 0,01% de peróxido de hidrogênio diluídos em KPBS, por cerca de 3 minutos, sendo a reação paralisada com sucessivas lavagens com KPBS. Os cortes montados em lâminas gelatinizadas.

3.7.2.8- Aquisição das Imagens

As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmera digital Spot RT (Instrumentos Diagnósticos) adaptada a um microscópio Leica DMR e a um computador PC Apple Macintosh Power. Para a aquisição utilizou-se o software Adobe PHOTOSHOP 5.0. As imagens foram trabalhadas usando o programa Corel Draw 12 e apenas ajustes finos, como brilho, contraste e balanço de cores foram utilizados.

3.7.2.9- Análise Estatística

Para a análise quantitativa de células imunorreativas a *fos* foram escolhidos cinco cortes representativos de cada uma das regiões cerebrais de interesse. Em cada um dos cortes, o número de células foi contado numa área tecidual adequada.

A análise estatística utilizada foi o teste *t*-Student e as áreas consideradas estatisticamente significativas foram àquelas que apresentaram $p < 0,05$.

3.7.3- Eletrofisiologia: Neurotoxicidade/Neuroproteção em Ratos

O método empregado foi executado como descrito previamente por Salamoni (2005b). Os experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa, no Laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas – PUCRS, em Porto Alegre, RS.

Durante cada experimento foram utilizados oito ratos da linhagem Wistar, machos com 35 dias pesando cerca de 200g. Os animais foram mantidos num alojamento climatizado, com comida e água à vontade e ciclo claro-escuro de 12 horas. Para decapitação, os animais foram anestesiados com Tiopental (40mg/Kg) intraperitonealmente, seus cérebros foram retirados e submetidos a cortes coronais de 400 μm de espessura. As fatias que contiveram o hipocampo foram isoladas e permaneceram em solução de Ringer normal (contendo: NaCl 130 mM; NaHCO_3 24mM; D-glicose 10 mM; NaH_2PO_4 1,3 mM; KCl 3,5 mM; Mg^{2+} 2 mM; CaCl_2 2 mM; pH entre 7,2), por 1 hora, com constante oxigenação.

Para o estudo de ação da amostra (Nigriventrina) sob os neurônios hipocampais de CA1, uma série de 4 fatias foi perfundida em Ringer normal por 10 minutos. Decorrido esse tempo, em duas dessas fatias, a droga em estudo foi administrada com auxílio de uma bomba pneumática ejetora (PV830, Pneumatic PicoPump WPI). A micropipeta contendo a solução da droga foi posicionada próxima ao eletrodo de registro intracelular na região de CA1 do hipocampo. Em ambos procedimentos a concentração final foi de 0,1 μM e durante todo o registro eletrofisiológico foi observado o padrão de descargas.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Fracionamento do Veneno Bruto / Espectrometria de Massas

A figura 11 apresenta o perfil cromatográfico do fracionamento do veneno bruto da aranha *Phoneutria nigriventer* em sistema HPLC sob fase reversa, num gradiente de 0 a 70% de acetonitrila em coluna preparativa Vydac C4 (46 x 250 mm) a um fluxo de 5mL/min, onde identificamos a fração hidrofílica (fração 1) desse veneno num intervalo de tempo de 0 - 20 minutos e a composição hidrofóbica do veneno (fração 2) no intervalo de tempo de 20 - 160 minutos. As frações correspondentes à composição hidrofóbica do veneno foram reunidas, liofilizadas e armazenadas.

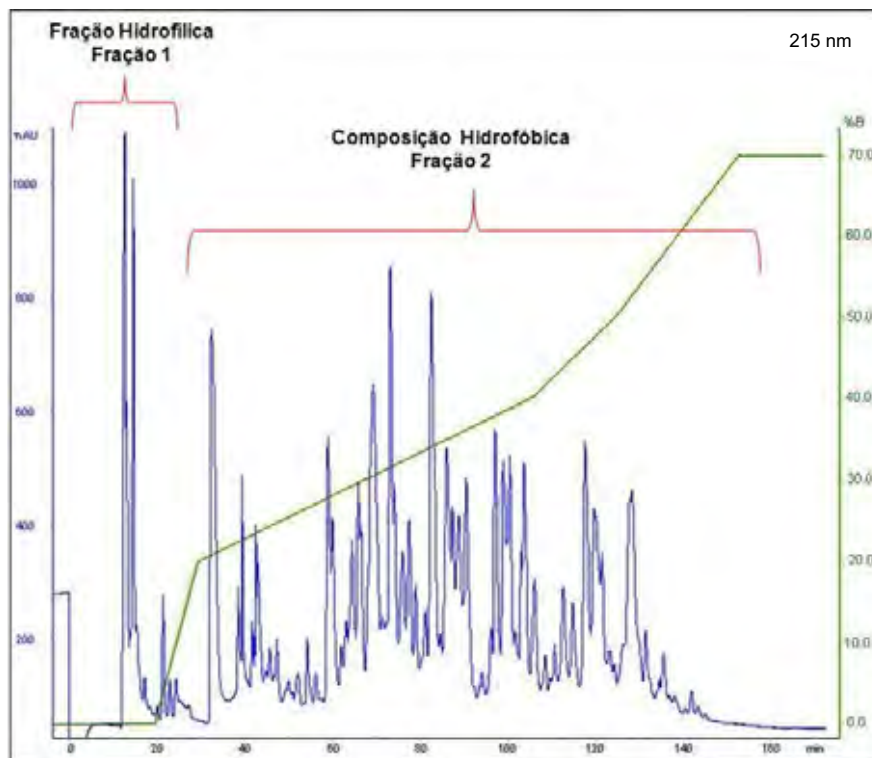


Figura 11- Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno bruto da aranha *Phoneutria nigriventer* em sistema HPLC sob fase reversa, num gradiente de 0 a 70% de acetonitrila em coluna preparativa Vydac C4 (46 x 250 mm) a um fluxo de 5mL/min, com a fração hidrofílica (fração 1) e a composição hidrofóbica (fração 2) do veneno identificadas.

A fração hidrofílica (fração 1) do veneno bruto da aranha *Phoneutria nigriventer* corresponde aos primeiros picos que são eluídos rapidamente devidos às suas propriedades físico-químicas que diferem dos componentes peptídicos / protéicos presentes na composição hidrofóbica (fração 2) em maioria nesse veneno. As toxinas não protéicas de baixas massas moleculares presentes na fração hidrofílica precisam ser caracterizadas. Weinberg et al. (2002) demonstraram num estudo realizado com um pool da fração hidrofílica desse veneno denominado de NORF (nitric oxide releasing fraction), que NORF induz o relaxamento de anéis mesentéricos de artéria de rato mediado pela liberação de óxido nítrico. Nada até então foi descrito em literatura científica sobre os componentes deste pool da fração hidrofílica.

Para o estudo dos componentes não protéicos de baixas massas moleculares desse veneno, um pool da fração hidrofílica (fração 1) foi refractionado em sistema HPLC sob fase reversa, num gradiente de 0 a 30% (v/v) de acetonitrila por 45 minutos, em coluna semi-preparativa C18 (10 x 250 mm) a um fluxo de 1,7mL/min. Foram obtidos 4 subfrações (picos 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4) cujo perfil cromatográfico é apresentado na figura 12. Essas subfrações foram coletadas, secadas, pesadas e a homogeneidade foi monitorada por espectrometria de massas ESI-MS.

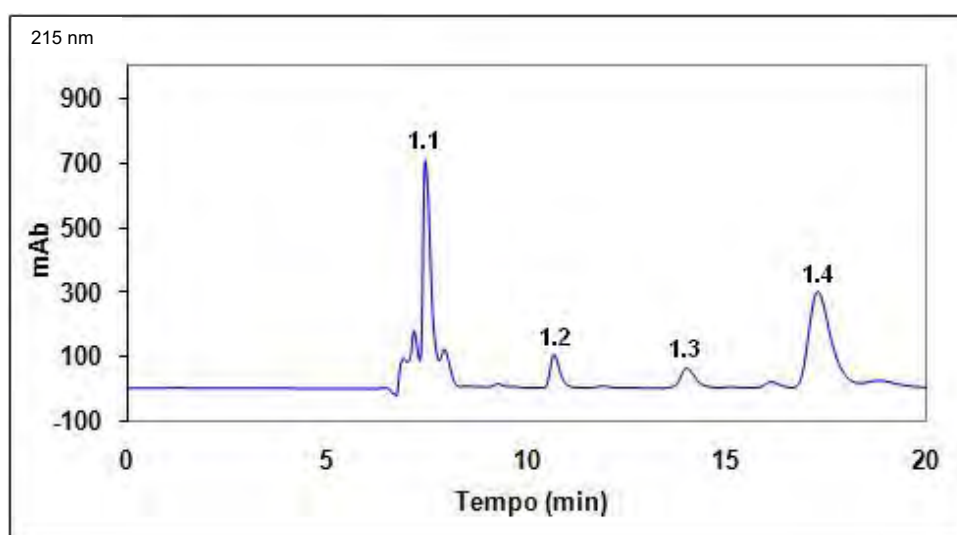


Figura 12- Refracionamento do pool da fração hidrofílica (fração 1) em sistema HPLC sob fase reversa, num gradiente de 0 a 30% (v/v) de acetonitrila por 45 minutos, em coluna semi-preparativa C18 (10 x 250 mm) a um fluxo de 1,7mL/min, com as subfrações identificadas (picos 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4).

Os espectros de massas ESI-MS obtidos pelas análises das subfrações 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4 nos forneceram a homogeneidade e as massas moleculares dos componentes destas subfrações (Fig.13A, 13B, 13C e 13D).

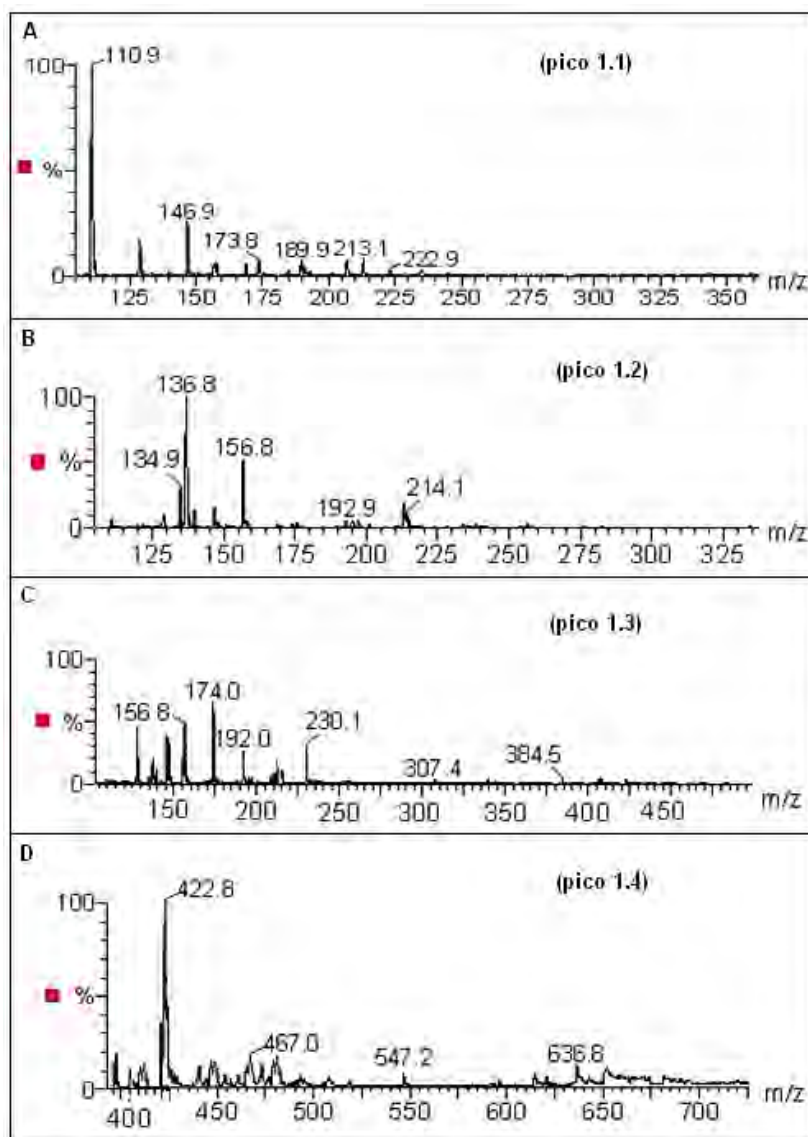


Figura 13- Espectro de massas ESI-MS no modo positivo onde são observados os íons moleculares (m/z) dos componentes das subfrações: A) pico 1.1, B) pico 1.2, C) pico 1.3 e D) pico 1.4.

Após o fracionamento de todos os lotes do veneno, apenas a subfração 1.4 foi obtida em quantidade e homogeneidade suficiente para as análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C . A subfração 1.4 apresentou uma massa molecular de 422 Da e foi submetida à análise de espectrometria de massas HRMS.

4.2- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é considerada uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas no estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução. Tanto que na atualidade é muito comum fazer medidas de RMN para uma determinada substância, mesmo antes de se obter um espectro de infravermelho ou um espectro de massa. Esta constatação está diretamente relacionada com a evolução técnica dos equipamentos de RMN nas últimas décadas. Não tão difundida quanto obter espectros 1D de compostos orgânicos, é a prática de obter espectros em duas dimensões (2D), homo ($^1\text{H}, ^1\text{H}$) e heteronucleares ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$). As técnicas 2D permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ($^nJ_{\text{H,H}}$, $^nJ_{\text{C,H}}$, $^nJ_{\text{C,C}}$) ou espacial (H,H- ou H,C-NOE) entre si. Desta forma é possível fazer um mapeamento estrutural mais preciso do que utilizando somente as técnicas 1D e dados de possíveis compostos similares da literatura, principalmente na análise de estruturas mais complexas (KAISER, 2000).

As análises de RMN de ^1H e ^{13}C forneceram resultados importantes para a resolução estrutural da molécula. Os espectros adquiridos foram relativamente simples, sugerindo que a molécula apresenta uma certa simetria.

Nos espectros de ^1H -RMN (anexo 2) somente dois sinais foram observados com deslocamentos de 2,75 e 2,93 ppm, ambos apresentaram um desdobramento em forma de dubleto e apresentaram uma constante de acoplamento de 15,8 Hz, característico de hidrogênios metilênicos geminais, estes dados foram confirmados pelos espectros de g -HSQC (anexo 4) e COSY (anexo 5), onde foi possível verificar a correlação entre os dois hidrogênios com um mesmo átomo de carbono e entre ambos.

Os espectros de ^{13}C -RMN (anexo 1) apresentaram cinco sinais, um sinal em 43,729 ppm correspondendo ao carbono metilênico; um sinal em 73,698 ppm referente a um carbono quaternário, que devido ao deslocamento químico apresentado, sugere está ligado a grupos elétron-retiradores. Os outros três sinais encontrados no espectro de ^{13}C -RMN estão localizados em 173,825, 173,938 e 177,246 ppm correspondendo provavelmente a carbonos carbonílicos. Os sinais dos carbonos de carbonila nestes deslocamentos químicos são relacionados à carbonilas de amidas e ácidos carboxílicos.

Uma informação importante obtida dos espectros *g*-HMBC (anexo 3) é referente à correlação entre os hidrogênios do metileno e todos os carbonos da molécula, com exceção do hidrogênio H_b, que não apresenta correlação com carbono em 177,246 ppm (C₅), apresentado somente por H_a. Uma explicação para este fato pode ser devido ao arranjo conformacional entre H_b e C₅, onde o ângulo diedro entre ambos encontra-se próximo de 90°, conforme verificado através do uso de modelos moleculares, condizente com o diagrama de Karplus (JACKMAN; STERNHELL, 1978). Já o ângulo entre H_a e C₅ apresenta-se diferente de 90°. Todos os dados espectrais obtidos para a subfração 1.4 estão indicados na tabela 1 e os espectros estão apresentados em anexo.

Tabela 1- Dados espectrais obtidos para os experimentos de RMN 1D e 2D para a subfração 1.4.

C	δC (ppm)	δ H (ppm)	Multip.	J (Hz)	H/H COSY	g-HSQC	g-HMBC
1	43,729 (CH ₂)	2.75 (H _a)	d	15.8	H _b	H _a , H _b	---
		2.93 (H _b)	d	15.8	H _a	---	---
2	73,698 (C)	---	---	---	---	---	H _a , H _b
3	173,825 (C)	---	---	---	---	---	H _a , H _b
4	173,938 (C)	---	---	---	---	---	H _a , H _b
5	177,246 (C)	---	---	---	---	---	H _a

A interpretação dos resultados das análises de RMN levou a proposição da estrutura química apresentada na figura 14 para a subfração 1.4. Esta molécula revelou uma massa molecular de 422 Da e fórmula molecular C₁₂H₁₄N₄O₁₃, confirmada por análises de HRESI-MS. A estrutura foi caracterizada como sendo hidrazil-dioxopiperidina, e denominada por "**NIGRIVENTRINA**".

Uma parte da estrutura proposta, obtida com base nos dados extraídos dos espectros de RMN 1D e 2D e nos fragmentos encontrados nos experimentos de MS-MS, está mostrada na figura 15, indicando os carbonos C₁, C_{1'}, C₂, C₃, C₄ e C₅, como também os hidrogênios H_a e H_b.

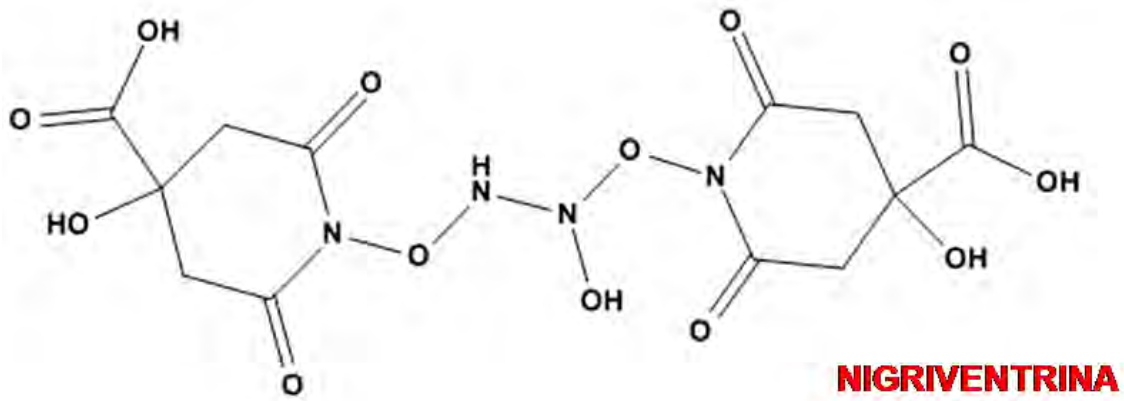


Figura 14- A) Estrutura química proposta para a fração 1.4 do veneno de *P. nigriventer*, baseado nas análises de RMN. Este composto trata-se da hidrazil-dioxopiperidina e foi designada por Nigriventrina.

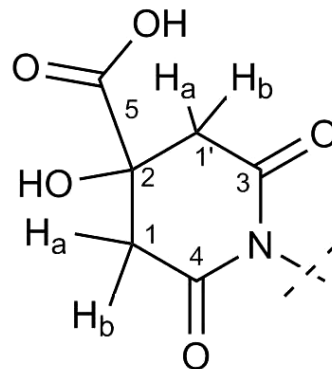


Figura 15- Parte da estrutura da Nigriventrina indicando os carbonos C₁, C_{1'}, C₂, C₃, C₄ e C₅, como também os hidrogênios H_a e H_b.

4.3- Análises de Espectrometria de Massas Sequenciais

O espectro HRMS/MS obtido para o íon molecular de m/z 423.0631 na forma $[M + H]^+$ e seus principais íon-fragmentos ($m/z = 405.0052, 388.9932, 361.0143, 349.0632, 317.0211, 299.9906, 248.0321, 233.9894, 189.0235, 172.9785, 130.8851, 102.8918, 75.0012$) estão mostrados na figura 16B. A interpretação deste espectro está representada na Figura 16A. A interpretação do padrão de fragmentação da molécula é coerente com a estrutura química proposta para o constituinte da fração 1.4, proposta na Figura 14, corroborando a determinação estrutural proposta acima.

A determinação estrutural do produto natural isolado na fração 1.4 do veneno de *P. nigriventer* poderia ainda se beneficiar de análises de RMN de Nitrogênio-15, e até mesmo do desenvolvimento de uma estratégia de síntese orgânica para este composto, para confirmar definitivamente sua estrutura química. Entretanto o tempo disponível para realização da tese não foi suficiente para a realização destas etapas.

Nada foi encontrado na literatura científica a respeito desse tipo de molécula. Sabe-se que a piridina está presente na estrutura de vários alcalóides derivados do aminoácido Lisina, e que a piperidina é produto da redução da piridina; derivados dioxopiperidínicos são componentes básicos de drogas de efeito analgésico, anti-ansiolítico e anti-psicótico (GITTO, 1989).

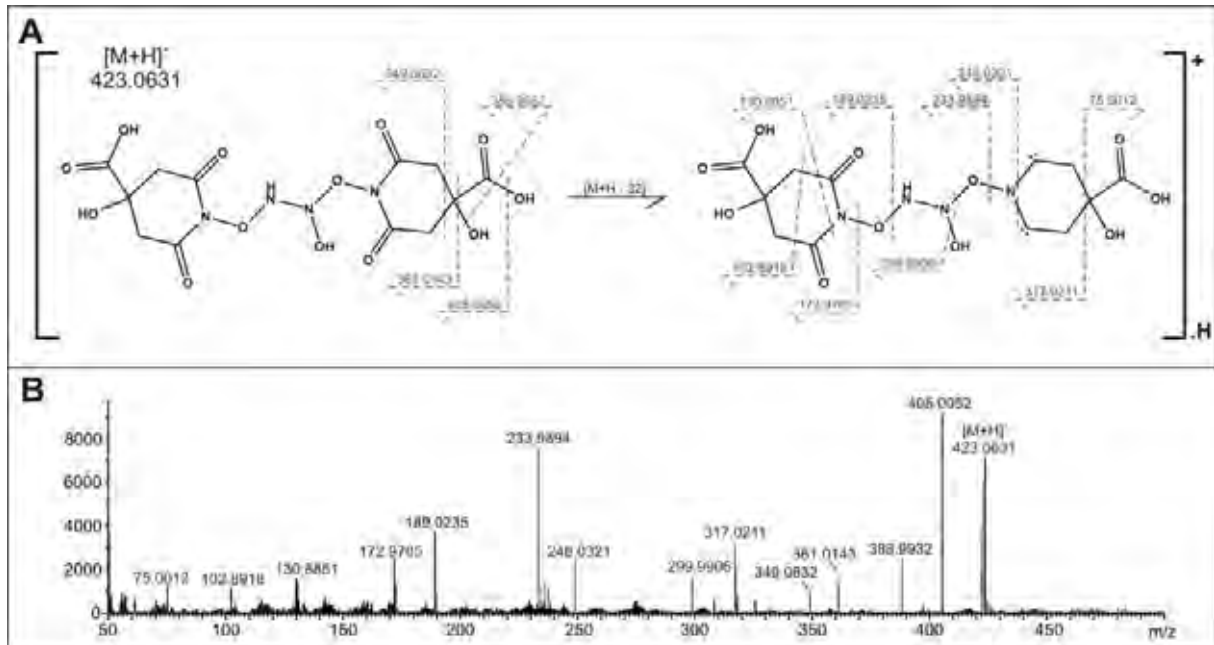


Figura 16- A) Principais íons moleculares identificados por espectrometria de massas HRMS/MS, no estudo de fragmentação da molécula Nigriventrina. B) Espectro de massas HRMS/MS do íon molecular de m/z 423.0631 na forma $[M + H]^+$ e seus principais íon-fragmentos de $m/z = 405.0052$, 388.9932, 361.0143, 349.0632, 317.0211, 299.9906, 248.0321, 233.8894, 189.0235, 172.9785, 130.8851, 102.8918, 75.0012.

4.4- Ensaios Biológicos

4.4.1- Neurotoxicidade em Camundongos

A amostra (Nigriventrina) foi diluída em solução BSA/Salina (0,25mg BSA / mL de Salina 0,9%) e injetado icv 5,0µL de solução em cada animal. Foram utilizados 5 grupos de 4 animais (n = 4) com 4 concentrações diferentes de amostra (1, 3, 5 e 8 µg/animal) e para o grupo controle apenas a solução BSA/Salina. As observações das ações nos camundongos comparadas ao grupo controle foram realizadas: no momento da aplicação (resultados imediatos), cinco, quinze, trinta e, 24h após aplicação. Não houve diferença de ação entre as concentrações aplicadas. As principais reações foram verificadas no intervalo de tempo de 5 a 30 minutos, sendo: inicialmente, rigidez e pequena perda de locomoção, diarreia, patas traseiras e dianteiras distendidas, tremor, imobilidade por alguns minutos, cauda ereta, perda de sensibilidade motora, aceleração da mobilidade, aumento da frequência respiratória, evidenciando claramente vários efeitos neurotóxicos. Todas as ações foram reversíveis e após 24h os camundongos permaneceram aparentemente normais, evidenciando uma ação não letal. Como este conjunto de observações foi constituído de reações complexas, não se determinou a relação efeito/dose.

4.4.2- Estudos de Mecanismos de Ação

4.4.2.1- Identificação das Regiões de Ação da Toxina em Cérebro de Ratos: Imunoistoquímica para Detecção dos Sítios de Expressão da Proteína Fos

A proteína Fos é um fator de transcrição induzível, cuja ativação é uma ferramenta sensível para mapear diferentes estímulos farmacológicos, elétricos e fisiológicos (MORGAN; CURRAN, 1991; LINO DE OLIVEIRA et al., 2001) em neurônios ativados no sistema nervoso central (KOBELT et al., 2004).

Os procedimentos de imunoistoquímica evidenciaram a expressão da proteína Fos em algumas regiões do cérebro após a administração da Nigri ventrina por injeção *icv* contra salina em ratos. A Nigri ventrina promoveu um aumento significativo na expressão da proteína Fos, apresentando afinidade principalmente por áreas do córtex cerebral sensorial, motor, piriforme e núcleo endopiriforme dorsal (fig. 17). Essas regiões corticais são regiões ligadas à percepção do animal e ao controle da musculatura voluntária do mesmo.

Além dessas regiões, o hipocampo, o núcleo septal lateral e o núcleo pré-óptico mediano também apresentaram marcações para a proteína Fos (fig. 18). O hipocampo é peça chave envolvida na memória de contexto. Esta estrutura do sistema límbico é responsável, em especial, pela formação da chamada memória de longa duração. O hipocampo intacto possibilita ao animal comparar as condições de uma ameaça atual com experiências passadas similares, permitindo-lhe, assim, escolher qual a melhor opção a ser tomada para garantir sua preservação (LEDOUX, 1998).

O núcleo pré-óptico mediano tem papel fundamental no controle de respostas cardiovasculares e homeostase de fluídos, está relacionado a sensações de sede do animal. Já o núcleo septal lateral é um dos principais núcleos ativados após estresse excessivo e pode suprimir respostas a estímulos emocionais adversos, sendo alvo para tratamentos de problemas relacionados à ansiedade (THOMAS, 1988).

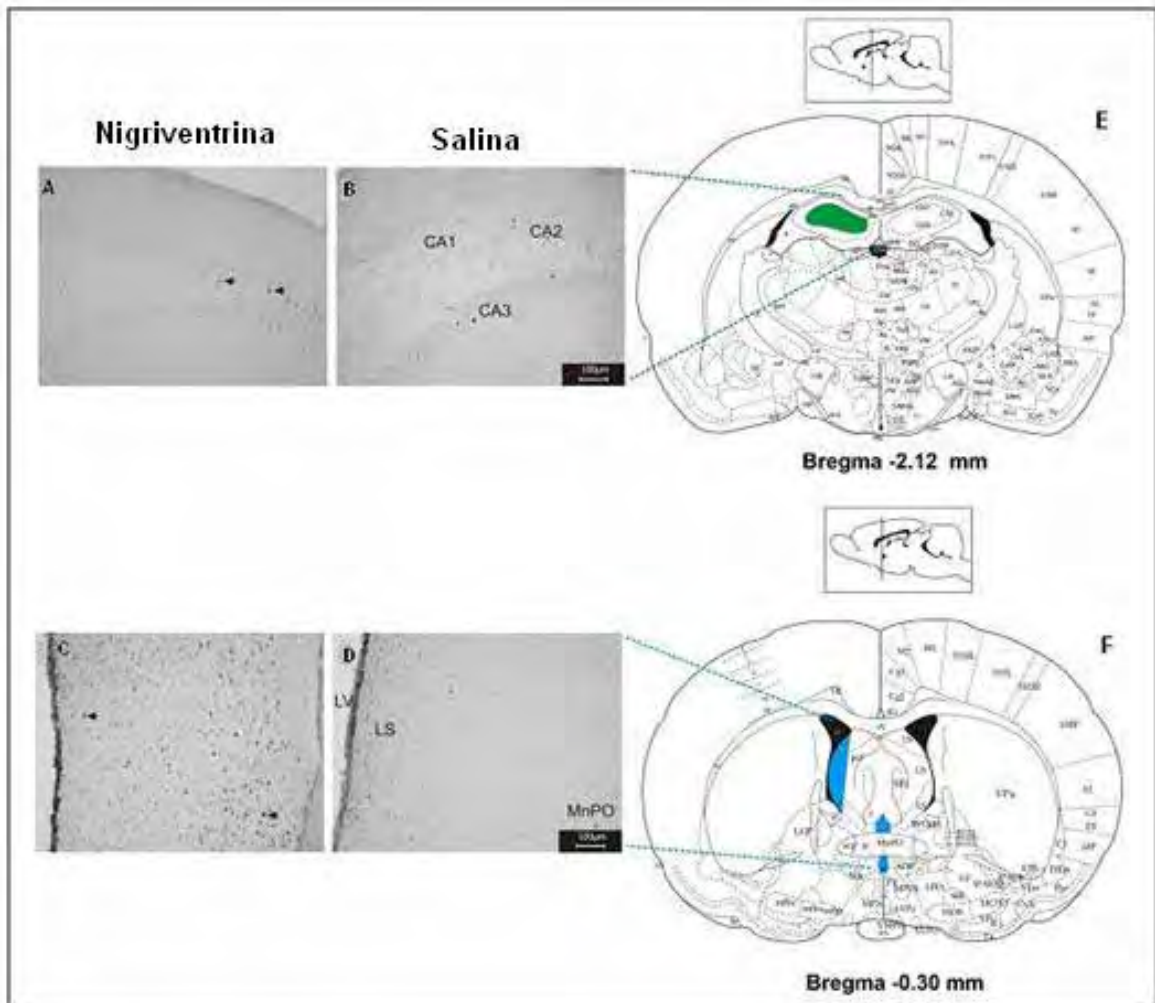


Figura18- Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos dos neurônios assinalados em preto) após a injeção *icv* da Nigroventrina. Imunoreatividade para Fos pode ser observado em A-B: hipocampo; C-D: Núcleo septal lateral e Núcleo pré-óptico mediano; E-F: Representação esquemática da fatia do encéfalo com o mapeamento da ação da toxina, representado no plano coronal pelas regiões assinaladas em verde (E) e azul (F) . Abreviaturas: CA1, CA2 e CA3: Região hipocampal, LS: Núcleo septal lateral, LV: Ventrículo lateral, MnPO: Núcleo pré-óptico. Barra de escala = 100 μm.

Para a análise quantitativa das células *fos*-imunorreativas (*fos*-ir) foram escolhidos cinco cortes representativos de cada uma das regiões cerebrais de interesse. As células *fos*-imunorreativas foram contadas em áreas fixas de 1mm² em todas as regiões descritas. Os valores atribuídos são referentes às médias (\pm SD) do número de células *fos*-positivas, n=3, sendo o grau de significância $p < 0,05$ (teste *t*-Student) observado em todas as áreas. A figura 19 evidencia o número de células *fos*-ir de cada região.

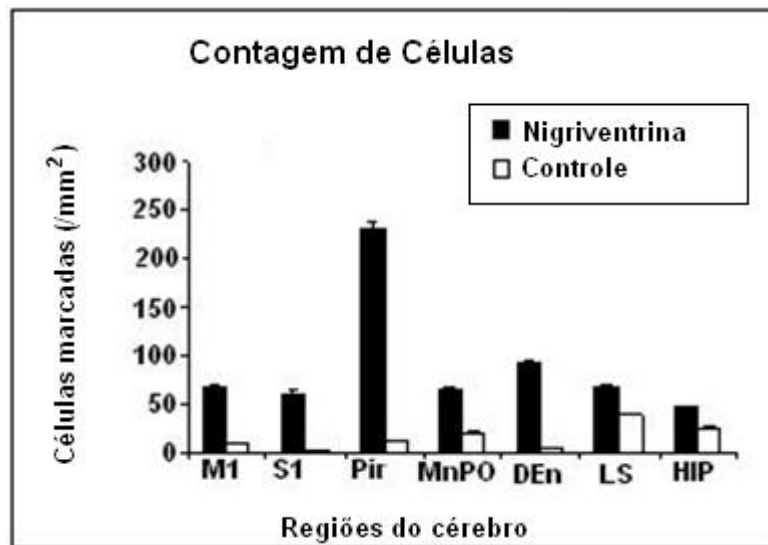


Figura 19- Número médio de neurônios *fos*-ir após administração intracerebroventricular de Nigriventrina 0,1 μ g/ μ L (preto), e animais controle (salina 0,9% m/V – branco), nas principais áreas encefálicas ativadas pela amostra em estudo: córtex motor (M1), córtex sensorial (S1), córtex piriforme (Pir), Núcleo pré-óptico mediano (MnPO), Núcleo endopiriforme dorsal (DEn), Núcleo septal lateral (LS) e hipocampo (HIP). Os valores atribuídos são referentes às médias (\pm SD) do número de células *fos*-positivas, n=3, sendo o grau de significância $p < 0,05$ (teste *t*-Student) observado em todas as áreas.

O córtex é considerado como uma das partes mais importantes do sistema nervoso. Nesta região chegam os impulsos provenientes de todas as vias de sensibilidade que ali se tornarão conscientes e serão interpretadas, como também partem os impulsos nervosos que comandam todos os movimentos voluntários do indivíduo (MACHADO, 2002). Desta forma, os resultados obtidos das regiões que apresentaram a marcação de proteína Fos, sugerem que a Nigriventrina tenha ação relacionada principalmente ao bloqueio dos movimentos musculares voluntários de suas presas, como também no estado de alerta e estresse das mesmas.

4.4.2.2- Identificação da Natureza Bioquímico-farmacológica dos Receptores Associados às Regiões de Ação da Toxina: Experimentos de Dupla Marcação Imunoistoquímica

Com a finalidade de se investigar a natureza bioquímico-farmacológica dos neurônios das áreas Fos-imunorreativas envolvidos na ação da Nigri-ventrina, foram realizados os experimentos de duplas marcações (de expressão de proteína Fos e de receptores nervosos) com anticorpo anti-NMDA-R1.

As duplas marcações para Fos/NMDA-R1 foram observadas nas regiões do Córtex motor (M1), Córtex sensorial (S1), Córtex piriforme (Pir) e Hipocampo (HIP) (fig. 20). Não se observou duplas marcações no núcleo pré-óptico mediano, núcleo endopiriforme dorsal e núcleo septal lateral.

As células duplamente marcadas (núcleos de neurônios expressando proteínas Fos assinalados em negro e os somas dos neurônios corados em marrom, como mostrado na figura 20A) nas regiões corticais foram contadas em regiões de área tecidual de 1mm^2 e os resultados são apresentados e esquematizados no gráfico da figura 21.

Os receptores NMDA-R1 por estarem inseridos no próprio canal iônico, atuam diretamente na abertura do mesmo, promovendo influxo de íons cálcio e sódio, desta forma, a presença da subunidade NR1 é essencial para tornar o canal funcional (HWA; AVOLI, 1992). Os receptores do tipo NMDA possuem funções importantes relacionadas ao estado convulsivo e ao aprendizado por repetição (STONE, 1995), sugerindo aparentemente uma possível relação desta toxina com propriedades pró/ou anti-epileptogênicas.

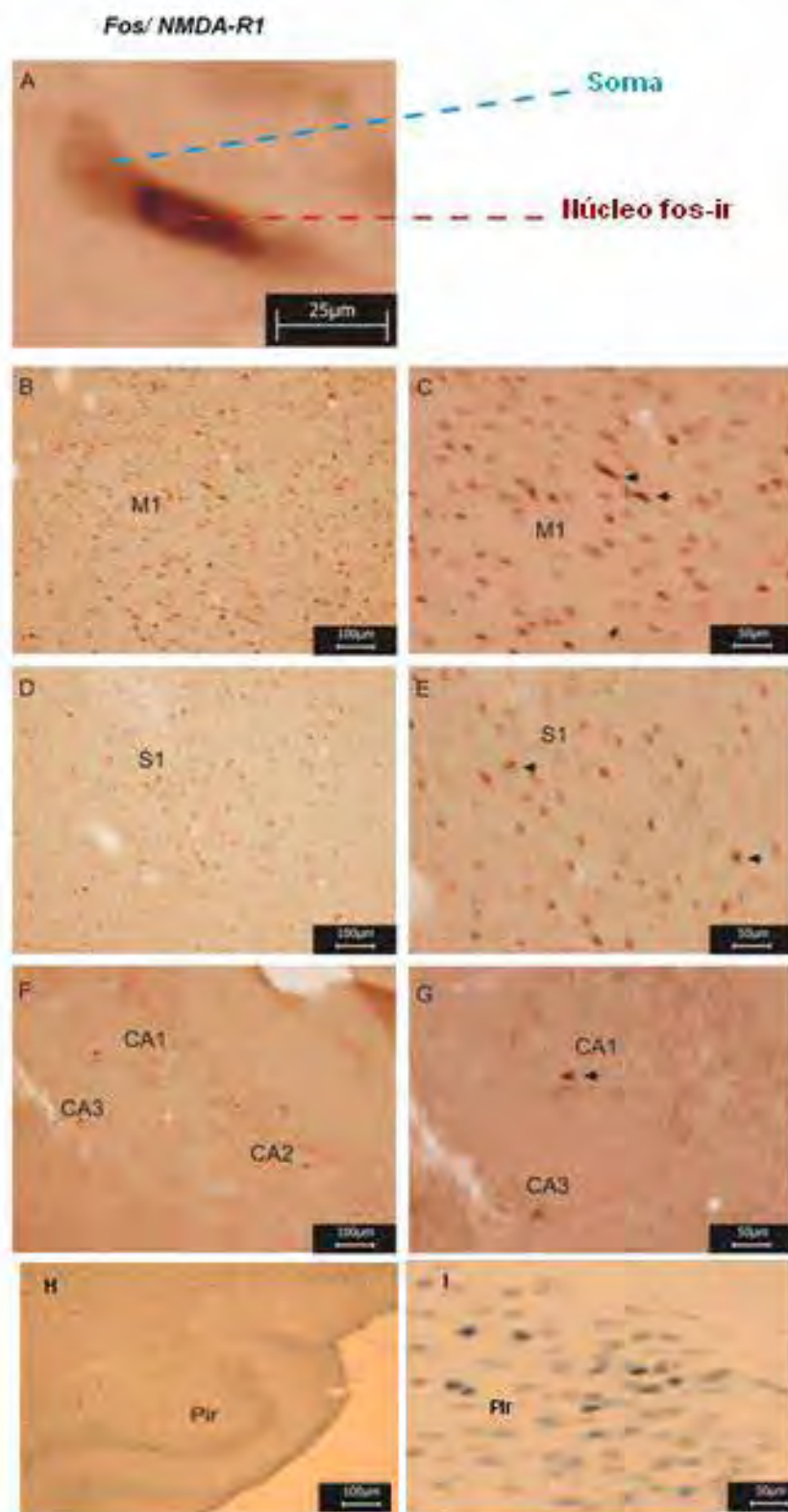


Figura 20- Fotomicrografia de campo claro evidenciando as duplas marcações Fos/NMDA-R1 após a injeção *icv* da Nigroventrina (setas). Em A: detalhe de uma célula duplamente marcada. Em B-C: duplas marcações observadas no córtex motor; em D-E: duplas marcações observadas no córtex sensorial; em F-G: duplas marcações observadas no hipocampo; em H-I: duplas marcações observadas no córtex piriforme. Abreviaturas: M1: Córtex motor, S1: Córtex sensorial; CA1, CA2 e CA3: Região hipocampal; Pir: Córtex Piriforme. Barra de escala: 25 μm em A; 50 μm em C-E- G - I e 100 μm em B - D - F - H.

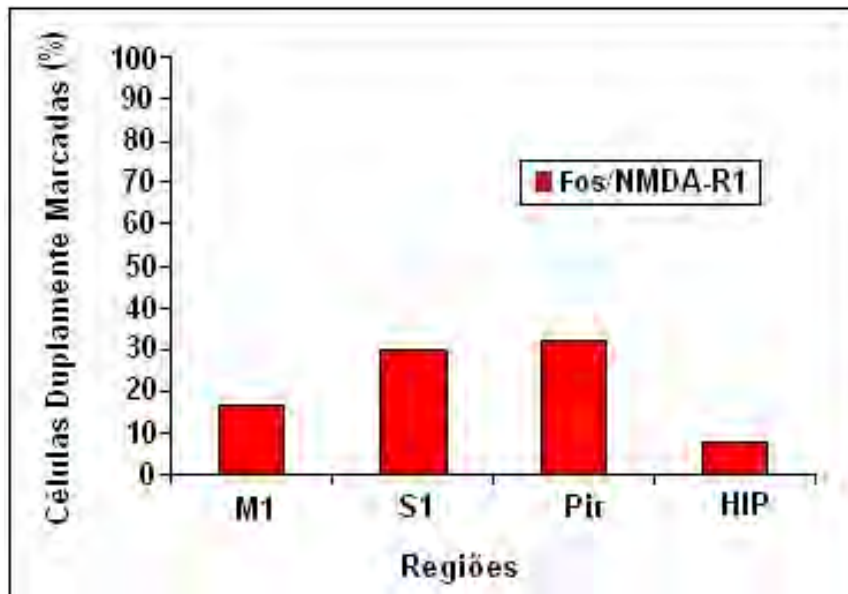


Figura 21- Representação das porcentagens de neurônios duplamente marcados encontrados Fos/NMDA-R1, induzidos pela Nigriventrina nas regiões do cérebro: córtex motor (M1), córtex sensorial (S1), córtex piriforme (Pir) e hipocampo (HIP).

4.4.3- Estudos do Mecanismo de Ação: Eletrofisiologia de Preparações Hipocampais de Cérebros de Ratos

Os neurônios hipocampais da região CA1 são ricos em receptores de glutamato, do subtipo NMDA (SALAMONI, 2005a), e a incubação de fatias de hipocampo de ratos, da região CA1, em solução de Ringer revela a presença de picos correspondendo aos potenciais de ação (região A da Figura 22) dos neurônios destas preparações (cerca de dois picos/segundo). A adição da Nigriventrina causa a completa supressão destes picos (região B da Figura 22), sugerindo que a toxina causou o bloqueio dos receptores NMDA-R1. Portanto, a Nigriventrina poderia estar causando o bloqueio do canal de íons cálcio, uma vez que como já citado anteriormente, os receptores bloqueados (NMDA-R1) estão localizados no interior da luz do próprio canal iônico (HWA; AVOLI, 1992).

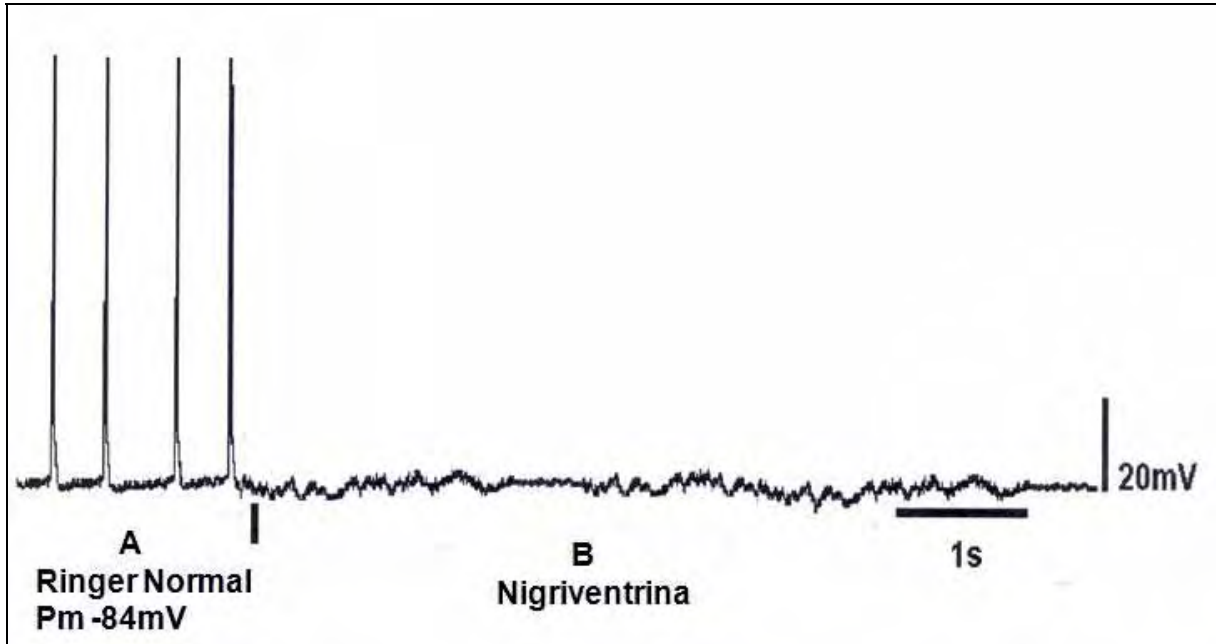


Figura 22- Registro intracelular de neurônio hipocampal de CA1. A) Neurônio perfundido com Ringer normal, Pm -84mV; B) Aplicação da toxina Nigriventrina.

5- CONCLUSÃO

O estudo dos componentes não-protéicos de baixa massa molecular presentes na fração hidrofílica do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, como de outros venenos animais, encontra hoje como principais desafios a complexidade das amostras, a escassez do material biológico, bem como a ausência de bases de dados para a caracterização desses compostos.

São moléculas que se diferenciam dos outros componentes de origem peptídica / protéica desses venenos, apresentando características particulares e cujas propriedades físico-químicas dificultam a purificação e exige a utilização de técnicas microanalíticas sofisticadas e caras, tanto para o auxílio da caracterização estrutural desses compostos, como para o controle de purificação dos mesmos (HEATH; GIORDANI, 1993).

Neste trabalho, para o estudo da fração hidrofílica do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, foram exigidas várias etapas de fracionamento até se alcançar quantidade suficiente de material puro para a coleta de informações sobre os componentes da fração hidrofílica do veneno. Sabíamos da possibilidade dos componentes das frações coletadas não serem totalmente os mesmos em cada um dos lotes de veneno obtido. Esta é uma característica destes componentes que se modificam estruturalmente ou variam a sua ocorrência no veneno de acordo com a época e região da coleta das aranhas e da extração do veneno, bem como a forma de armazenamento e manipulação do mesmo.

A Nigriventrina foi o componente de maior abundância obtido na purificação dessa fração. Pelos resultados até então obtidos na sua caracterização, verificamos se tratar de um composto neuroativo com afinidade por receptores de glutamato subtipo NMDA-R1, principalmente em regiões corticais que estão ligadas à percepção e ao controle dos músculos voluntários dos animais. Os resultados eletrofisiológicos sugerem que a Nigriventrina é um potente bloqueador dos receptores NMDA-R1 e poderá no futuro, se tornar um interessante modelo molecular para o desenvolvimento de uma nova droga de uso em neurologia clínica, como anti-epiléptico, neuroprotetor em doenças neurodegenerativas ou ainda como

ferramenta para investigações nas áreas da neurobiologia. Neste sentido, o presente projeto cumpriu com seu objetivo maior dentro do Programa BIOprospecTA/FAPESP, na prospecção venômica de Artrópodes peçonhentos: investigar e caracterizar estrutural e funcionalmente novos compostos naturais, com potencial de se tornar no futuro uma droga-líder para o desenvolvimento de novos fármacos.

6- REFERÊNCIAS

- AMARA, S. G.; FONTANA, A. C. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochemistry International**. v. 41, p. 313-318, 2002.
- ANTONOV, S. M.; DUDEL, J.; FRANKE, C.; HATT, H. Argiopine Blocks Glutamate-Activated single-channel currents on crayfish muscle by two mechanisms. **Journal of Physiology**, v. 419, p. 369, 1989.
- ANTUNES, E.; MARANGONI, R.A.; BRAIN, S.D.; DE NUCCI, G. *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin in vivo. **Toxicon**, v. 30, n. 9, p. 1011-1016, 1992.
- ARAMAKI, Y.; YASUHARA, T.; HIGASHIJIMA, T.; YOSHIOKA, M.; MIWA, A.; KAWAI, N.; NAKAJIMA, T. Chemical characterization of spider toxin, JSTX and NSTX. **Proceedings of the Japan Academy Sciences**. v. 62B, p. 359-362, 1986.
- ARAÚJO, D. A. M.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; DINIZ, C. R.; BEIRAO, P. S. L. A novel class of polypeptide toxin modifies sodium current inactivation and activation in isolated frog skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 467, p. 365, 1993a.
- ARAÚJO, D. A. M.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; BEIRÃO, P. S. L. Effects of a toxic fraction, PhTx2 from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. **Naunyn-Schmiedeberg's Archive of Pharmacology**, v. 347, p. 205-208, 1993b.
- ATTYGALLE, A.; McCORMICK, K. D.; BLANKSPOOR, C. L.; EISNER, T.; MEINWALD, J. Azamacrolides - a family of alkaloids from the pupal defensive secretion of a ladybird beetle (*Epilachna-Varivestis*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 5204-5208, 1993.
- BARBARO, K. C.; JARED, C.; MOTA, I. Aranhas venenosas no Brasil. Fatos e mitos sobre o perigo que estes animais oferecem a população. **Ciência Hoje**, v. 19, p. 48-52, 1995.
- BARBOSA, W. M. Efeito da ingestão de café sobre a liberação de glutamato sinaptossomal, estimulada por toxina escorpiônica, em ratos. 2006. 58 f. (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

- BARRIO, A.; VITAL BRAZIL, O. Ein neues Verfahren der Giftentnahme bei Spinnen. **Experientia**, v. 6, p.112-114, 1949.
- BATEMAN, A.; BODEN, P.; DEL, J. R.; QUICKE, D. L. J.; USHERWOOD, P. N. R. Postsynaptic Block of Glutamergic Synapse by Low Molecular Weight Fractions of Spider Venom. **Brain Research**, v. 339, p. 237, 1985.
- BINFORD, G. J. An analysis of geografic and intersexual chemical variation in venom of the spider *Tegenaria agrestis* (Agelenidae). **Toxicon**, v. 39, p. 955-968, 2001.
- BOULTER, J.; HOLLMANN, M.; O'SHEA-GREENFIELD, A.; HARTLEY, M.; DENERIS, E.; MARON, C.; HEINEMANN, S. Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. **Science**, v.249, p. 1033-1037, 1990.
- BUCARETCHI, F.; DEUS REINALDO, C. R.; HYSLOP, S.; MADUREIRA, P. R.; DE CAPITANI, E. M.; VIEIRA, R. J. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 42, p. 17-21, 2000.
- CARNEIRO, A. M.; KUSHMERICK, C.; KOENEN, J.; ARNDT, M. H.; CORDEIRO, M. N., CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DINIZ, C. R.; GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, M. V.; PRADO, V. F. Expression of a functional recombinant *Phoneutria nigriventer* toxin active on K⁺ channels. **Toxicon**, v. 41, p. 305-313, 2003.
- CARNEIRO, C. R. D. Ação central do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*: modulação aguda da barreira hematoencefálica, ativação neuronal e envolvimento do óxido nítrico. 2006. 66 f (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- CAROBREZ, A. P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, s. 2, p. 52-58, 2003.
- CASSOLA, A. C.; JAFFE, H.; FALES, H. M.; CASTRO, A. S.; MAGNOLI, F.; CIPOLLA-NETO, J. Omegaphonotoxin- IIA: a calcium channel blocker from the spider *Phoneutria nigriventer*. **Pflügers Archiv**, v. 436, p. 545-552, 1998.
- CASTRO JUNIOR, C. J. ; Pinheiro, A. C. N.; GUATIMOSIM, C.; CORDEIRO, M. N.; SOUZA, A. H.; RICHARDSON, M.; ROMANO-SILVA, M. A.; PRADO, M. A. M.; GOMEZ, M. V. Tx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer*

blocks calcium channels associated with exocytosis. **Neuroscience Letters**, v. 439, p. 170-172, 2008.

CESAR, L. M. M. Determinação das estruturas moleculares e dos mecanismos de ação das tetrahydrobetacarbolinas do veneno da aranha *Parawixia bistriata*. 2000. 67 f. (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

CESAR, LILIAN M. M.; TORMENA, C. F.; MARQUES, M. R.; SILVA, GIL V. J.; MENDES, M. A.; RITTNER, R.; PALMA, M. S. Structure determination of hydroxytripargine: A new tetrahydro-beta-carboline toxin from the venom of the spider *Parawixia bistriata*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, p. 796-800, 2005.

CHAN, T. K.; GEREN, C. R.; HOWELL, D. E.; ODELL, G. V. Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. **Toxicon**, v. 13, p. 61-66, 1975.

CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery From Natural Sources. **AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.

CHRISTINE C. W.; CHOI D. W. Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 108-116, 1990.

CLARK, A. M. Natural Products as a Resource for New Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n.8, p. 1133-1141, 1996.

CODDINGTON, J. A.; LEVI, H. W. 1991. Systematics and evolution of spiders (Araneae). **Annual Review Of Ecology And Systematics**, v. 22, p. 565-592, 1991.

COLLINGRIDGE, G. L.; SINGER, W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. **Pharmacological Sciences**, v. 11, p. 290-296, 1990.

CONTI, F.; WEINBER, R. J. Shaping excitation at glutamatergic synapses. **Trends in Neuroscience**, v. 220, n. 10, p. 451-458, 1999.

COSTA, S. K. P.; MORENO JR.; H.; BRAIN, S. D.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. The effect of *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom on arterial blood

pressure of anaesthetised rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 298, p. 113-120, 1996.

CRUZ-HOFLING, M. A.; LOVE, S.; BROOK, G.; DUCHEN, L. W. Effects of *Phoneutria nigriventer* spider venom on mouse peripheral nerve, Quarterly. **Journal of Experimental Physiology**, v. 70, p. 623-642, 1985.

CUPO P.; AZEVEDO-MARQUES M. M.; HERING S. E. Acidentes por animais peçonhentos: Escorpiões e aranhas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, p. 490-497, 2003.

DAIKHIN, Y.; YUDKOFF, M. Compartmentation of Brain Glutamate Metabolism in Neurons and Glia. **Journal of Nutrition**. v. 130, p. 1026S-1031S, 2000.

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

DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacological Reviews**, v.51, p.7-61, 1999.

DINIZ, C. R. Separation of proteins and characterization of active substances in the venom of the Brazilian spiders. In: **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.35, p.283-291, 1963.

DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; REZENDE JR.; L.; KELLY, P.; FISCHER, S.; REIMANN, F.; OLIVEIRA, E. B.; RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. **FEBS Letters**, v. 263, n.2, p.251-253, 1990.

EARLY, S. L.; MICHAELIS, E. K. J. Presence of proteins and glutamate as major constituents of the venom of the spider *Araneus gemma*. **Toxicon**, v. 25, p. 433-442, 1987.

EISNER, T.; MEINWALD, J.; MONRO, A.; GHENT, R. Defence mechanisms of arthropods .1. The composition and function of the spray of the whipscorpion, *mastigoproctus-giganteus* (lucas) (Arachnida, Pedipalpida). **Journal of insect physiology**, v. 6, p.272-298, 1961.

- ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, v. 82, p. 893-907, 2000.
- ESCOUBAS, P.; QUINTON, L.; NICHOLSON, G. M. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, p. 279-295, 2008.
- FIGUEIREDO, S. G.; GARCIA, M. E.; VALENTIM, A. C.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; RICHARDSON M. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4 (6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **Toxicon**, v. 33, p. 83-93, 1995.
- FIGUEIREDO, S. G.; MAFRA, R. A.; PIMENTA, A. M. C.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; DE LIMA, M. E. Purification and pharmacological activity of two potent insecticidal neurotoxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 3, n. 84, p. 28, 1997.
- FIGUEIREDO, S. G.; PEREZ-GARCIA, M. E. L.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; PATTEN, D.; HALLIWELL, R. F.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurons. **Toxicon**, v. 39, p. 309-317, 2001.
- FISCHER, F. G.; BOHN, H. Die gift sekrete der Brasilianische tarantel *Lycosa Erythrogna* und vanderspinne *Phoneutria fera*. **Zeitschrift fur Physikalische Chemie**, v. 306, p. 265-268, 1957.
- FOELIX, R. F. **Biology of Spiders**. Oxford and New York: Oxford University Press and Georg Thieme Verlag. 330 p., 1996.
- FOLADOR, T. S. Expressão dos receptores de glutamato do tipo NMDA em aves durante o desenvolvimento e envelhecimento. 2008. 41 f. (Mestrado em Fisioterapia) - Universidade Cidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- FONTANA, M. D.; VITAL-BRASIL, O. Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. Brazilian. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, p. 557-565, 1985.
- FREW, R.; HAMILTON, M. G.; LUNDY, P. M. Identification of noradrenaline in venom from the funnel-web spider *Hololena curta*. **Toxicon**, v. 32, p. 511-515, 1994.

- GERFEN, C. R.; SAWCHENKO, P. E. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localizations of an axonally transported plantlectin *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. **Brain Research**, v. 290, p. 219-238, 1984.
- GITTOS, M. W. "Pharmaceutical compositions and medical uses of dioxopiperidine derivatives". Patent: 4835151- 1989.
- GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; GUATIMOSIM, C.; PRADO, M. A. M. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, p. 579-588, 2002.
- GRISHIN, E. Spider neurotoxins and their neuronal receptors. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 783-790, 1994.
- GRISHIN, E. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 276-280, 1999.
- GUATIMOSIM, C.; ROMANO-SILVA, M. A.; CRUZ, J. S., BEIRÃO, P. S. L. KALAPOTHAKIS, E.; MORAES-SANTOS, T.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C. R.; GOMEZ, M. V.; PRADO, M. A. M. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, p. 591-597, 1997.
- HAGIWARA, S.; BYERLY, L. Calcium channel. **Annual Review of Neuroscience**. v. 4, p. 69-125, 1981.
- HEATH, T.; GIORDANI, A. B. Reversed-phase capillary high-performance liquid chromatography with on-line UV, fluorescence and electrospray ionization mass spectrometric detection in the analysis of peptides and proteins. **Journal of Chromatography**, v. 638, n. 1, p. 9-19, 1993.
- HOLLMANN, M.; O'SHEA-GREENFIELD, A.; ROGERS, S. W.; HEINEMANN, S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. **Nature**, v. 342, p. 643-648, 1989.
- HUETTNER, J. E. Kainate receptors and synaptic transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 5, p.387-407, 2003.

HWA, G. G.; AVOLI, M. Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA and non-NMDA receptors in the superficial/middle layers of the epileptogenic human neocortex maintained in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 143, p. 83-86, 1992.

JACKMAN, L. M.; STERNHELL, S. **Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry**, 2.ed, Pergamon Press: Oxford, p 316, 1978.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**; v. 23, n. 2, 2000.

KAISER, E. Venoms, In: BUCKLEY, E. E.; PORGES, N. (Eds.) **American Association for the Advancement in Science**, p. 91, 1956.

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

KAWAI, N.; MIWA, A.; ABE, T. Spider venom contains specific receptor blocker of glutaminergic synapses. **Brain Research**, v. 247, p. 169-171, 1982.

KOBELT, P.; TEBBE, J. J.; TJANDRA, I.; HI-GUNG B.; RÜTER, J.; KLAPP, B. WIEDENMANN, F. B.; MÖNNIKES, H. Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain. **Brain research protocols**, v. 13, n. 1, p. 45-52, 2004.

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

LEÃO, R. M.; CRUZ, J. S.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; BEIRÃO, P. S. L. Inhibition of neuronal highvoltage activated calcium channels by the *Phoneutria nigriventer* Tx3-3 peptide toxin. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 1756-1767, 2000.

LEDOUX, J. **O Cérebro Emocional**: os misteriosos alicerces da vida emocional. 2. ed. Rio de Janeiro: Objetiva, 1998.

- LEGENBRE P.; WESTBROOK G. L. The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurones. **Journal of Physiology**, v. 429, p. 429-449, 1990.
- LINO DE OLIVEIRA, C.; SALES, A. J.; DEL BEL, E. A.; SILVEIRA, M. C. L.; GUIMARÃES, F. S. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 6, p.747-754, 2001.
- LOKENS GARD J.; SMITH R. L.; EISNER T.; MEINWALD J. Pregnanes from defensive glands of a belostomatid bug. **Experientia, Basel**, v. 49, n. 2, p. 175-176, 1993.
- LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon**, v. 26, n.9, p. 759-772, 1988.
- LUCIO, A. D. ; CAMPOS, M. V. ; RICHARDSON, M. ; CORDEIRO, M. N. ; MAZZONI, M. S. ; DE LIMA, M. E. ; PIMENTA, A. M. C.; BEMQUERER, M. P.; FIGUEIREDO, S. G.; GOMES, P. C.; BEIRÃO, P. S. L. A new family of small (4 kDa) neurotoxins from the venoms of spiders of the genus *Phoneutria* with activity on Ca⁺² channels. **Protein and Peptide Letters**, v. 15, p. 700-708, 2008.
- MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**; 2.ed. Editora Atheneu, São Paulo, 2002.
- MAFRA, R. A.; FIGUEIREDO, S. G.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; CRUZ, J. D.; DE LIMA, M. E. PhTx4, a new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom, inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes. **Brain Research**, v. 831, p. 297-300, 1999.
- MAGISTRETTI, J. P.; PELLERIN, L.; ROTHMAN, D. L.; SHULMAN, R. G. Neuroscience: Energy on Demand. **Science**, v. 283. n. 5401, p. 496-497, 1999.
- MATAVEL, A.; CRUZ, J. S.; PENAFORTE, C. L., ARAUJO, D. A. M.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, V. F.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; BEIRÃO, P. S. L. Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2-6. **FEBS Letters**. v. 523, p. 219-223, 2002.
- MATSUDA, K.; KAMIYA, Y.; MATSUDA, S.; YUZAKI, M. Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. **Molecular Brain Research**, v. 100, n. 1-2, p. 43-52, 2002.

- MCCORMICK, J.; MEINWALD, J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, p. 2411-2451, 1993.
- MCCORMICK, K. D.; ATTYGALLE, A.; XU, A.B.; SVATOS, S. C.; MEINWALD, J.; HOUCK, J.; BLANKSPOOR, C. L.; EISNER, T. Chilocorine - heptacyclic alkaloid from a coccinellid beetle. **Tetrahedron**, v. 50, p. 2365-2372, 1994.
- MEINWALD J.; EISNER T. The chemistry of phyletic dominance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 1, p. 14-18, 1995.
- MEINWALD J.; SMOLANOFF J.; MCPHAIL A. T.; MILLER R. W.; EISNER T.; HICKS K. Defense-mechanisms of arthropods nitropolyzonamine - spirocyclic nitro compound from defensive glands of a milliped (*Polyzonium rosalbum*). **Tetrahedron Letters**, v.28, p. 2367-2370, 1975.
- MENEZ, A.; STOCKLIN, R.; MEBS, D. 'Venomics' or: the venomous systems genome project. **Toxicon**, v. 47, p. 255, 2006.
- MIRANDA, D. M.; ROMANO-SILVA, M. A.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; MORAES-SANTOS, T.; PRADO, M. A. M.; GOMEZ, M. V. *Phoneutria nigriventer* toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. **NeuroReport**, v. 9, p. 1371-1373, 1998.
- MIYASHITA, M.; SAITO, H.; MATSUSHITA, M.; MIYAZAWA, M.; ITAGAKI, Y.; NAKAJIMA, T. Total synthesis of Nephilatoxin-1 (NPTX-1), a Joro spider (*Nephila clavata*) toxin having a 4-hydroxyindole nucleus. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n.48, p. 8297-8298, 1997.
- MONAGHAN, D. T.; BRIDGES, R. J.; COTMAN, C. W. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 29, p. 365-402, 1989.
- MONYER, H.; BURNASHEV, N.; LAURIE, D. J.; SAKMANN, B.; SEEBURG, P. H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron**, v. 12, n. 3, p. 529-540, 1994.
- MORGAN, J. L.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system; involvement of inducible proto-oncogenes fod and jun. **Annual Review of Neuroscience**, v. 14, p. 421-451, 1991.

- MORIYOSHI, K.; MASU, M.; ISHII, T.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N.; NAKANISHI, S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 31-37, 1991.
- National Research Development Corporation (London). Maurice W. Gittos. **Pharmaceutical compositions and medical uses of dioxopiperidine derivatives**. US4835151, 23 Dez. 1987.
30 Mai. 1989.
- NUNES, K. P.; COSTA-GONÇALVES, A. C.; LANZA, L. F.; CORTES, S. F.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, A. M. C.; WEBB, R. C.; LEITE, R.; DE LIMA, M. E. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. **Toxicon**, v. 51, p. 1197-1206, 2008.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 581-618, 1998.
- PALFRAMAN, R. T.; COSTA, S. K. P.; WILSONCROFT, P.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; BRAIN, S. D. The effect of a tachykinin NK1 receptor antagonist, SR140333, on oedema formation induced in rat skin by venom from the *Phoneutria nigriventer* spider. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 295-298, 1996.
- PALMA, M. S.; NAKAJIMA, T. A Natural Combinatorial Chemistry Strategy in Acylpolyamine Toxins in Nephilinae Orb-Web-Spiders. **Journal of Toxicology. Toxin Reviews**, v. 24, n. 2, p. 209-234, 2005.
- PALMA, M. S.; YAMANE, T.; CAMARGO, A. C. M. Biodiversidade: preservação e bioprospecção. **Comciência: Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**, Campinas, 2001. Disponível em:<<http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio13.htm>>. Acesso em: 13 Jul. 2007.
- PAPERNA, T.; LAMED, Y.; TEICHBERG, V. I. CDNA cloning of chick brain α -amino-3-hydroxy-5methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors reveals conservation of structure, function and post-transcriptional processes with mammalian receptors. **Molecular Brain Research**, v. 36, p. 101-113, 1996.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in stereotaxic coordinates**. 3.ed. Academic Press, Sidney, 1998.
- PETRALIA, R. S.; YOKOTANI, N.; WENTHOLD, R. J. Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system

using a selective anti-peptide antibody. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 667-696, 1994.

PIMENTA, A. M. C.; RATES, B.; BLOCH JR, C.; GOMES, P. C.; SANTORO, M. M.; DE LIMA, M. E.; RICHARDSON, M.; CORDEIRO, M. N. Electrospray ionization quadrupole time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometric analyses to solve micro-heterogeneity in post-translationally modified peptides from *Phoneutria nigriventer* (Aranea, Ctenidae) venom. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, v. 19, p. 31-37, 2005.

PRADO, M. A. M.; GUATIMOSIN, C.; GOMEZ, M. V.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; ROMANO-SILVA, M. A. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. **Biochemical Journal**, v. 3, n. 14, p. 145-150, 1996.

QUISTAD, G. B.; LAM, W. W.; CASIDA, J. E. Identification of bis(agmatine) oxalamine in venom from the primitive hunting spider, *Plectreuris tristis* (Simon). **Toxicon**, v. 31, p. 920-924, 1993.

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

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

REZENDE JR, L.; CORDEIRO, M. N.; OLIVEIRA, E. B.; DINIZ, C. R. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon**, v. 29, p. 1225-1233, 1991.

RICHARDSON, M.; PIMENTA, A. M. C.; BEMQUERER, M. P.; SANTORO, M.; BEIRAO, P. S. L.; LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; BLOCH JR., C.; VASCONCELOS, E. A. R.; CAMPOS, F. A. P.; GOMES, P. C.; CORDEIRO, M. N. Comparison of the partial proteomes of the venoms of brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. **Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology**, v. 142, p. 173-187, 2006.

ROMANO-SILVA, M. A.; RIBEIRO-SANTOS, R.; RIBEIRO, A. M.; GOMEZ, M. V.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; BRAMMERS, M. J. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release:

studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTx2 and potassium depolarization. **Biochemical Journal**, v. 296, p. 313-319, 1993.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6.ed., Roca Editora, São Paulo, 1996.

SALAMONI, S. D.; COSTA, J. C.; TAVARES, A. A.; AZAMBUJA, N.; PAGLIOLI NETO, E.; PALMA, M. S.; VENTURIN, G. T.; ABREU, D. ; BREDA, R. V. The antiepileptic activity of JSTX-3 is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in human hippocampal neurons. **NeuroReport**, v. 16, p. 1869-1873, 2005a.

SALAMONI, S. D.; COSTA, J. C.; TAVARES, A. A.; AZAMBUJA, N.; PALMA, M. S.; PAGLIOLI NETO, E.; VENTURIN, G. T.; OLIVEIRA, R. M.; ABREU, D.; BREDA, R. V. . Antiepileptic effect of acylpolyaminetoxin JSTX-3 on rat hippocampal CA1 neurons in vitro. **Brain Research**, v. 1048, n. 1-2, p. 170-176, 2005b.

SANCHEZ-PEREZ, A.; LLANSOLA, M.; CAULI, O.; FELIPO, V. Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. II. Signaling pathways and physiological modulators regulating NMDA receptor function. **Cerebellum**, v. 4, n. 3, p. 162-170, 2005.

SANTOS, R. G. D.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; DE LIMA, M. E. Binding sites and acrions of Tx1, a neurotoxin from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, in guinea pig ileum. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1565-1569, 1999.

SANTOS, R. G. D.; VAN RENTERGHEM, C.; MARTÍN-MOUTOT, N.; MANSUELLE, P.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C.R.; MORI, Y.; DE LIMA, M. E.; SEAGAR, M. *Phoneutria nigriventer* Omega-phonetoxin IIA blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with Omega-conotoxin-binding sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 13856-13862, 2002.

SCHAMBACHER, F. L.; LEE, C. K.; HALL, J. E.; WILSON, I. B.; HOWELL, D. E.; ODELL, G. V. Composition and properties of tarantula *Dugesiella hentzi* (Girard) venom. **Toxicon**, v. 11, p. 21-29, 1973.

SCHOUSBOE, A.; HERTZ, L.; DRINGEN, R.; ROBINSON, S. R. Astrocytes: Glutamate producers for neurons. **Journal of Neuroscience Research**. v. 57, p. 417-428, 1999.

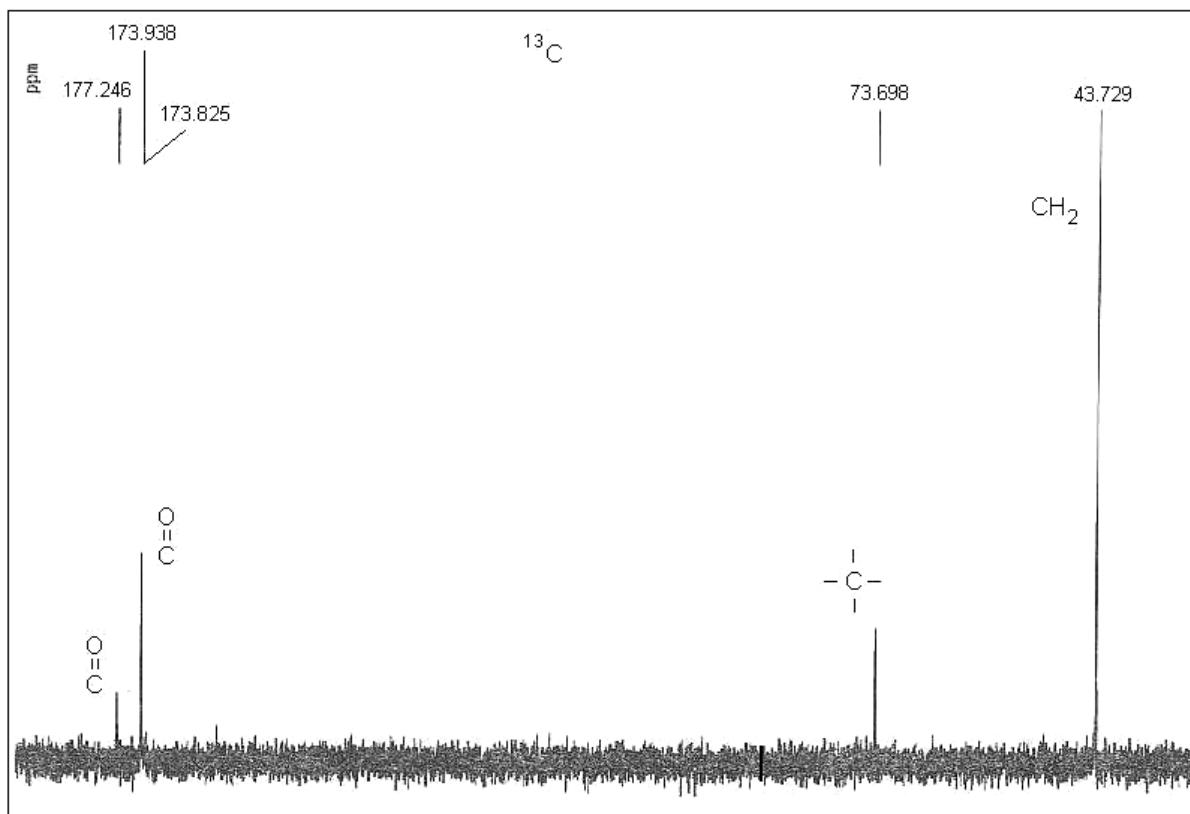
SCHVARTSMAN, S. **Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 288.

- SHU, S.; JU, G.; FAN, L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neuroscience Letter**, v. 85, p. 169-171, 1988.
- SILVA, S. T.; TIBURCIO, I. C. S.; CORREIA, G. Q. C.; AQUINO, R. C. T. **Escorpiões, Aranhas e Serpentes: aspectos gerais e espécies de interesse médico no estado de Alagoas**. edUFAL, Maceió, 54 p. 2005.
- SIMÓ, M.; BRESCOVIT, A. D. Revision and cladistic analysis of the Neotropical spider genus *Phoneutria* Perty 1833 (Araneae, Ctenidae), with notes on related Cteninae. **Bulletin British Arachnological Society**, v. 12, n. 2, p. 67-82, 2001.
- SITA, L. V.; ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Dopamine and melanin-concentrating hormone neurons are distinct populations in the rat rostromedial zona incerta. **Brain Research**, v. 970, p. 232-237, 2003.
- SMOLANOFF J.; KLUGE AF.; MEINWALD J.; MCPHAIL A.; MILLER R.W.; HICKS K.; EISNER T. Polyzonimine - novel terpenoid insect repellent produced by a millipede. **Science**, v. 188, n. 4189, p. 734-736, 1975.
- SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V.; HYARIC, M. L.; AMARANTE, G. W.; CARDOSO, S. H. Métodos de preparação e atividade biológica do ácido quinolínico. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 694-698, 2003.
- SPOOREN, W.; BALLARD, T.; GASPARINI, F.; AMALRIC, M.; MUTEL, V.; SCHREIBER, R. Insight into the function of Group I and Group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: behavioural characterization and implications for the treatment of CNS disorders. **Behavioural Pharmacology**, v. 14, n. 4, p. 257-277, 2003.
- STONE, T. W. **Neuropharmacology**. 1.ed. W. H. Freeman Spektrum Editory, Oxford. 140p, 1995.
- SUBRAMANIAM, S.; MCGONIGLE, P. Quantitative autoradiographic characterization of the binding of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5, 10-imine ([³H]MK-801) in rat brain: regional effects of polyamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 256, n. 2, p. 811-819, 1991.

- TAKUMI Y.; BERGERSEN L.; LANDSEND A. S.; RINVIK E.; OTTERSEN O. P. Synaptic arrangement of glutamate receptors. **Program Brain Research**, v. 116, p. 105-121, 1998.
- THOMAS. E. Forebrain mechanisms in the relief of fear: The role of the lateral septum. **Psychobiology**, v. 16, p. 34-44, 1988.
- TRONCONE, L. R. P.; LEBRUN, I.; MAGNOLI, F.; YAMANE, T. Biochemical and pharmacological studies on a lethal neurotoxic polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom. **Neurochemical Research**, v. 20, p. 879-883, 1995.
- USHERWOOD, P. N. R.; DUCE, I. R.; BODEN, P. Slowly-reversible block of glutamate receptor channels by venoms of the spiders, *Argiope trifasciata* and *Araneus gemma*. **Journal of Physiology**, v. 79, p. 241-247, 1984.
- VIEIRA, L. B.; KUSHMERICK, C.; REIS, H. J. DINIZ, C. R.; CORDEIRO M. N.; PRADO, M. A. M.; KALAPOTHAKIS, E.; ROMANO-SILVA, M. A.; GOMEZ, M. V. PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K⁺-evoked increase in [Ca²⁺]_i and Ca²⁺-dependent glutamate release in synaptosomes. **Neurochemistry International**, v. 1267, p. 1-6, 2003.
- WATKINS J. C.; JANE D. E. The glutamate story. **British Journal of Pharmacology**, v. 947, n. 1, p. 122-130, 2006.
- WEINBERG, M. L. D.; CORDEIRO, M. N.; DE LIMA, M. E.; OLIVEIRA, L. C.; DINIZ C. R. Endothelium-dependent relaxation of rat mesenteric arterial rings by a *Phoneutria nigriventer* venom fraction. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 88, p. 189-196, 2002.
- WELSH, J. H.; BATTY, C. S. 5-Hydroxytryptamine content of some Arthropod venoms and venom-containing parts. **Toxicon**, v. 1, p. 165-173, 1963.
- WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical Journal**, v. 325, p. 289-297, 1997.
- YONAMINE, C. M.; TRONCONE, L. R. P.; CAMILLOA, M. A. P. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal *Phoneutria nigriventer* spider toxin. **Toxicon**, v. 44, p. 169-172, 2004.
- ZARAIN-HERZBERG, A.; LEE-RIVERA, I.; RODRÍGUEZ, G.; LÓPEZ-COLOMÉ A. M. Cloning and characterization of the chick NMDA receptor subunit-1 gene. **Molecular Brain Research**, v. 137, p. 235-251, 2005.

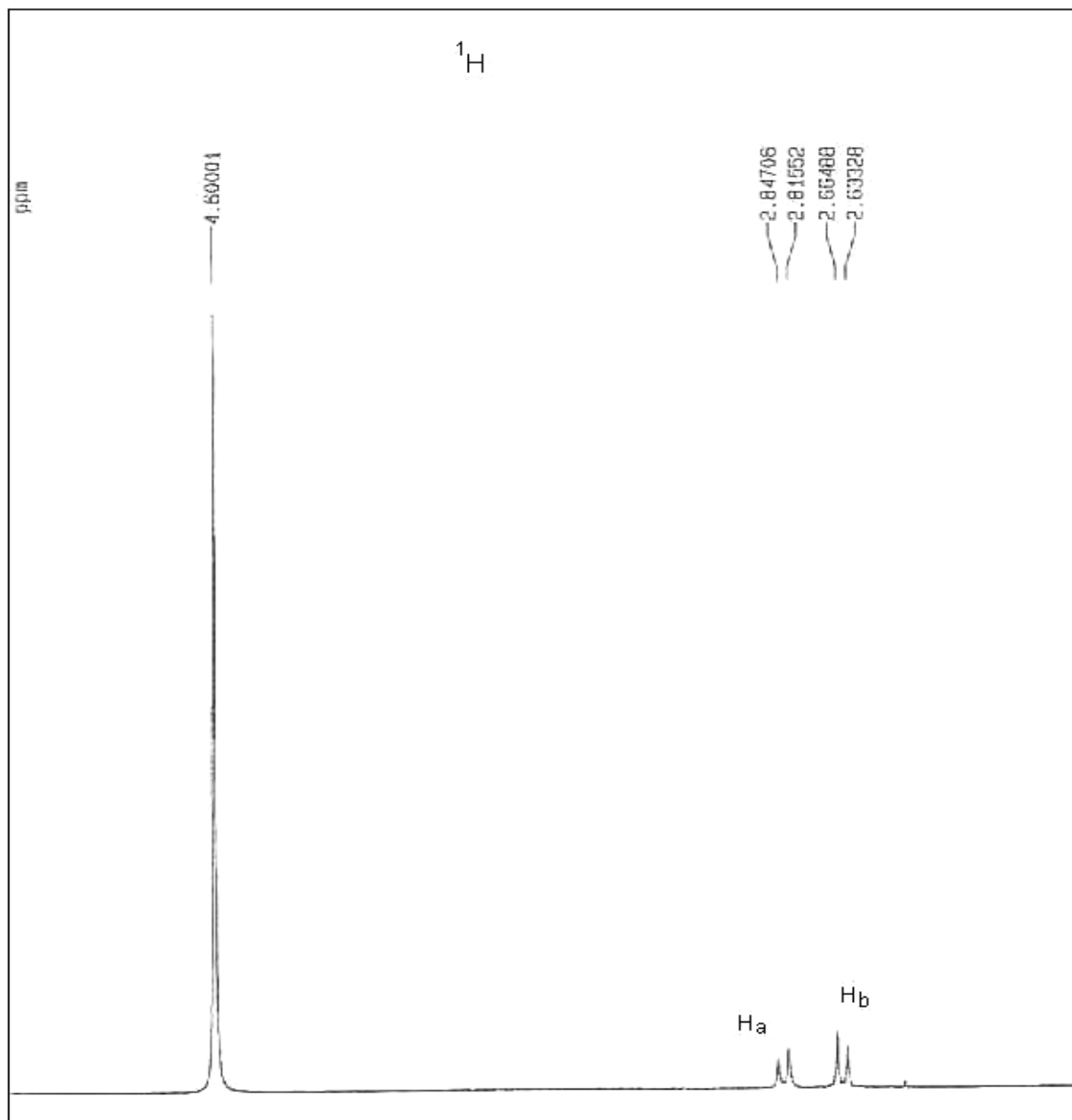
7- ANEXOS

7.1- Anexo 1- Espectro ^{13}C -RMN da amostra Nigriventrina.

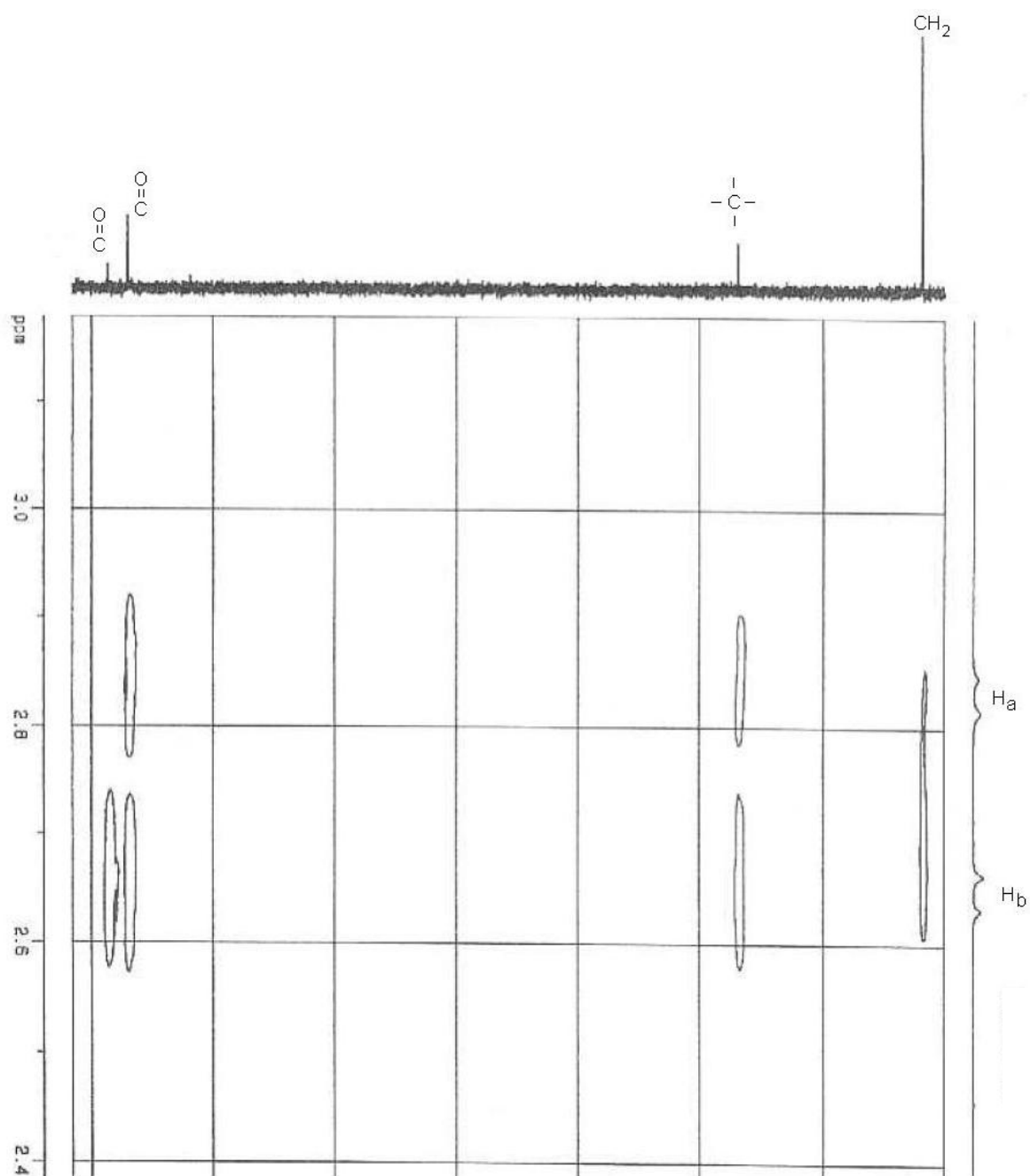


Anexo 1- Espectros de ^{13}C -RMN apresentando cinco sinais, um sinal em 43,729 ppm correspondendo ao carbono metilênico; um sinal em 73,698 ppm referente a um carbono quaternário. Outros três sinais localizados em 173,825, 173,938 e 177,246 ppm correspondendo provavelmente a carbonos carbonílicos relacionados à carbonilas de amidas e ácidos carboxílicos.

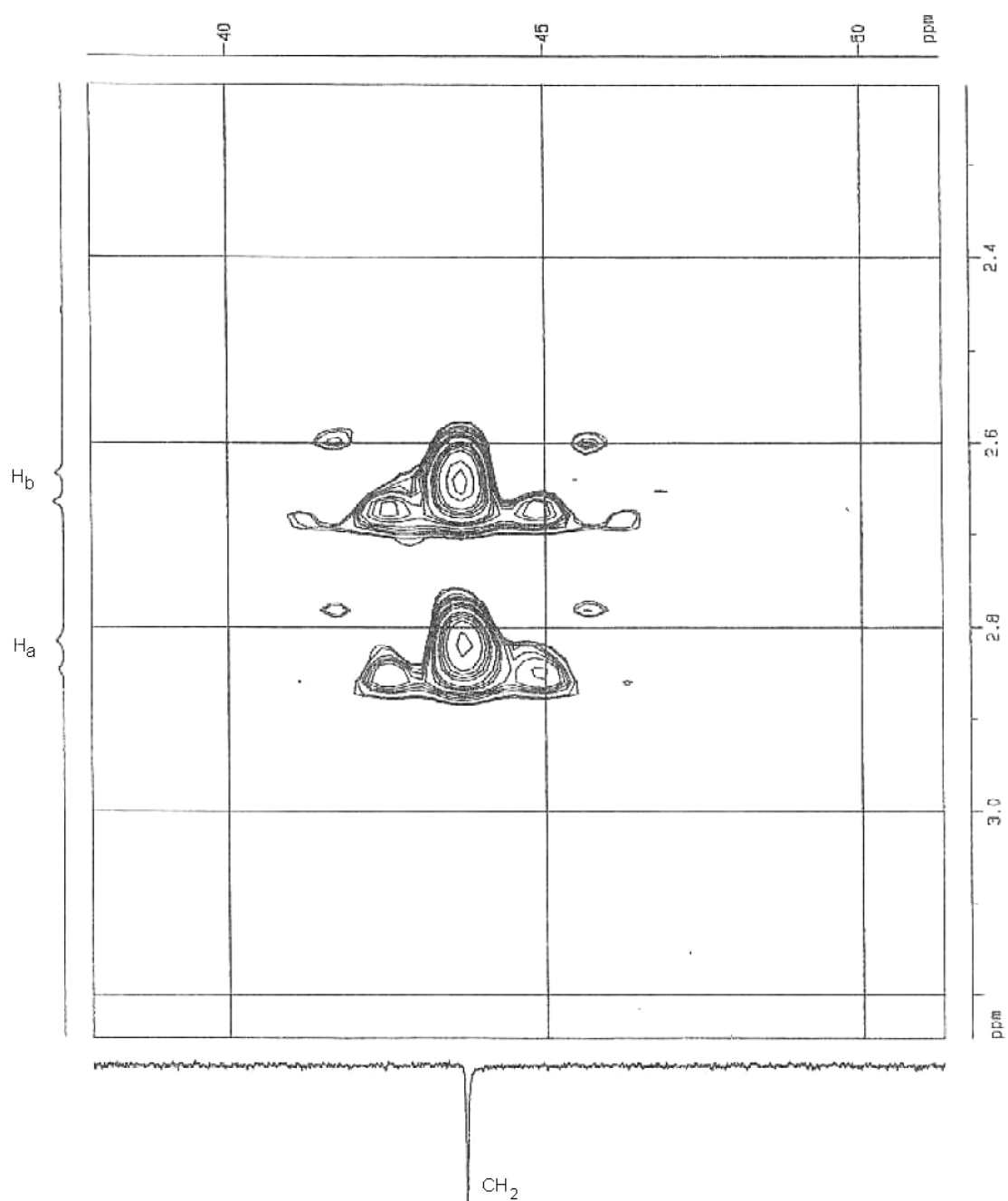
7.2- Anexo 2- Espectro ^1H -RMN da amostra Nigriventrina.



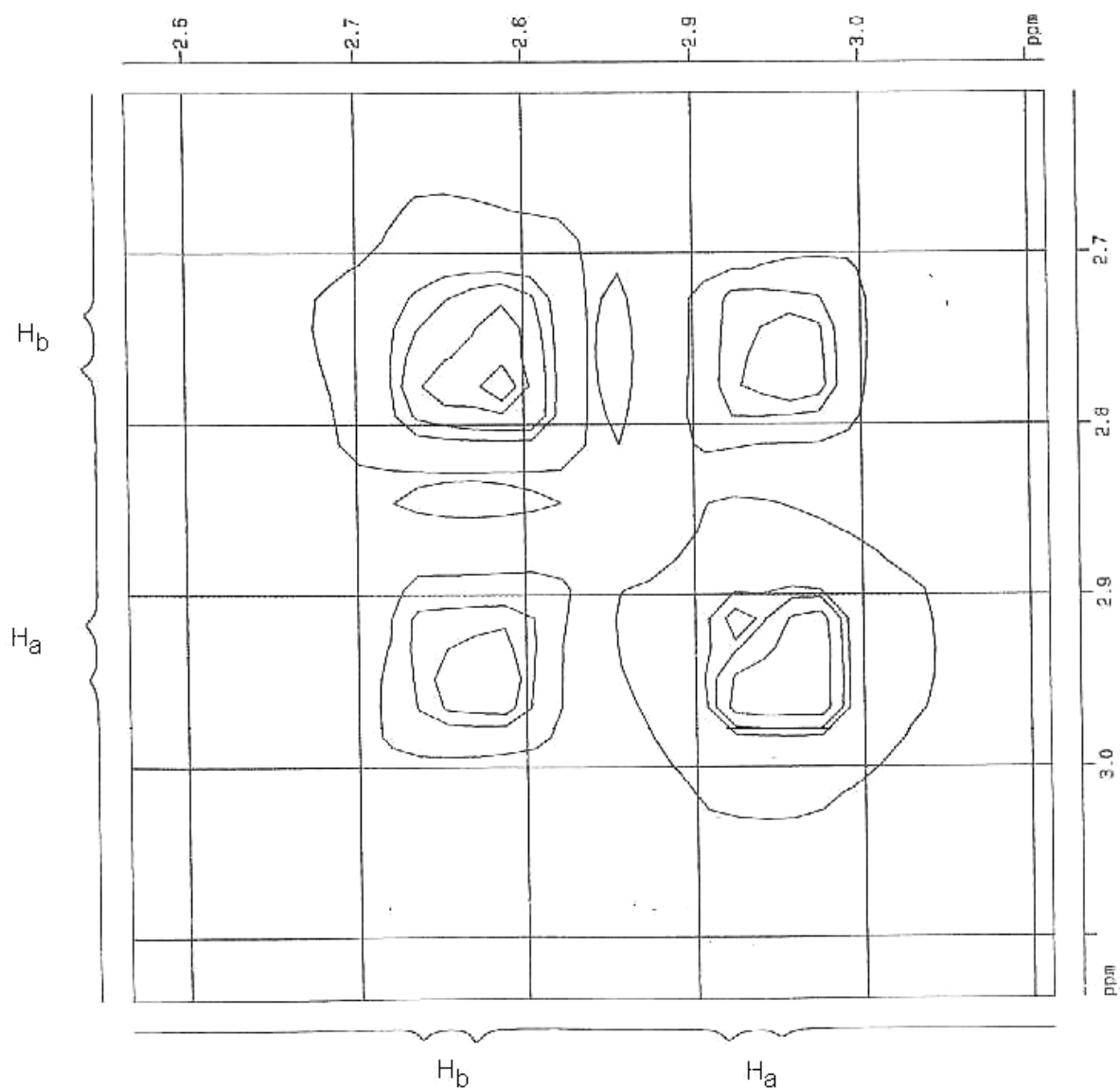
Anexo 2- Espectros de ^1H -RMN onde foram observados dois sinais com deslocamentos de 2,75 e 2,93 ppm, ambos apresentaram um desdobramento em forma de dubleto e apresentaram uma constante de acoplamento de 15,8 Hz, característico de hidrogênios metilênicos geminais.

7.3- Anexo 3- Espectro 2D *g*-HMBC da amostra Nigriventrina.

Anexo 3- Espectros *g*-HMBC apresentando a correlação entre os hidrogênios do metileno e todos os carbonos da molécula, com exceção do hidrogênio H_b, que não apresenta correlação com carbono em 177,246 ppm (C₅), apresentado somente por H_a.

7.4- Anexo 4- Espectro 2D *g*-HSQC da amostra Nigriventrina.

Anexo 4- Espectros *g*-HSQC onde é possível verificar a correlação entre os dois hidrogênios metilênicos com um mesmo átomo de carbono (CH_2).

7.5- Anexo 5- Espectro 2D *g*-COSY da amostra Nigriventrina.

Anexo 5- Espectros *g*-COSY onde é possível verificar a correlação entre os hidrogênios metilênicos.