UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

“Efeitos biológicos da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* em ratos:
isolamento e caracterização química parcial de uma neurotoxina pró-
convulsivante”

Marcelo Cairrão Araujo Rodrigues

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Psicobiologia

RIBEIRÃO PRETO – SP

2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

“Efeitos biológicos da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* em ratos:
isolamento e caracterização química parcial de uma neurotoxina pró-
convulsivante”

Marcelo Cairrão Araujo Rodrigues

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos
FFCLRP-USP, Departamento de Biologia

RIBEIRÃO PRETO – SP

2003

Rodrigues, Marcelo Cairrão Araujo.

Efeitos biológicos da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* em ratos: isolamento e caracterização química parcial de uma neurotoxina pró-convulsivante. – Ribeirão Preto, 2002.

125 p. :il. ; 30 cm.

Bibliografia: p. 118-125

Tese de doutorado apresentada à FFCLRP/USP, Deptº de Psicologia e Educação, Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Orientador: Prof.Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Data da Defesa:04/02/2003

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro (FCFRP-USP; Depto. Física e Química)

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Marcus Lira Brandão (FFCLRP-USP; Depto. Psicologia e Educação)

Julgamento: APROVADO

Prof. Dra. Mariana da Silva Araújo (UNIFESP/EPM; Depto. Bioquímica)

Julgamento: APROVADO

Prof. Dra. Maria Regina Lopes Sandoval (Instituto Butantã; Depto. Farmacologia)

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos (orientador; FFCLRP-USP; Depto. Biologia)

Julgamento: APROVADO

*Dedico este trabalho à minha esposa
Andrezza Neves Rodrigues.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Diversos foram os que ajudaram de alguma forma para a realização deste trabalho. No entanto, agradeço em especial:

Ao Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos. O Sr. permitiu que eu trilhasse meu próprio caminho e que dessa forma aprendesse. Hoje percebo que acertei em certos pontos desta caminhada e que também cometi muitas falhas. No entanto, saio fortalecido para enfrentar os desafios futuros, tentando não mais repetir os erros do passado. Talvez este seja um dos maiores aprendizados da pós-graduação, muito necessário para continuarmos num mundo científico com cada vez mais perguntas a se fazer e cada vez menos prazo para se responder. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco (Depto. de Fisiologia da FMRP-USP). O Sr. manteve sempre abertas as portas de seu laboratório, possibilitando a mim discussões sobre comportamento, crises convulsivas, circuitarias cerebrais, sistema anticonvulsivante endógeno, sítios de injeção cerebral entre outros tópicos, essenciais à realização deste trabalho. Devo agradecer aqui o precioso (e disputado) tempo gasto pelo Sr. com as correções dos artigos e pelo rigoroso crivo científico, que trouxeram-me incalculável crescimento. Tal colaboração acrescentou muito em minha formação e amadurecimento científico. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (Depto. de Física e Química da FCFRP-USP) e ao mestre Leonardo Gobbo Neto, pela imensa colaboração na espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear da toxina. Agradeço tamanho empenho e boa-vontade, que resultou na elucidação estrutural de um (até o presente momento) dos componentes da fração pró-convulsivante. Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Andrezza Neves Rodrigues não só pelo carinho, apoio e paciência, mas também pelas discussões, pela retirada das 6250 glândulas de veneno de aranha, leitura da tese, pela confecção de tampões e leitura de tubos no espectrofotômetro.

Agradeço ao Prof. Dr. Richard J. Ward (Setor de Bioquímica, Depto. de Química da FFCLRP-USP), pelo valioso apoio durante os primeiros isolamentos da peçonha no cromatógrafo líquido de alta pressão com resina de fase reversa e de troca catiônica.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Miranda (Depto. Biofísica da UNIFESP/EPM), pela contribuição e apoio durante a primeira tentativa de realização da espectrometria de massa dos compostos da peçonha de *P. bistriata*.

Aos Profs. Dr. Wagner E. Avelar e Dr. João Atílio Jorge (Depto. Biologia, FFCLRP-USP), pelas discussões e pela permissão do uso do liofilizador.

Ao Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto, chefe do Laboratório de Neuroquímica (Depto. Bioquímica, FMRP-USP) e ao doutorando Renê Beleboni, pelas discussões e disponibilidade da neurotoxina PbTx 2.2.1.

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão (Depto. Psicologia e Educação, FFCLRP-USP), e seus orientandos do Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, pelas discussões e permissão do uso do criostato.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Martinez, bem com o ao professor aposentado Dr. Jarbas Francisco Giorgini (Depto. Botânica, FFCLRP-USP), pela disponibilidade do uso da câmara fria e do espectrofotômetro.

Aos integrantes da banca de análise da proforma desta tese: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão (Depto. Psicologia e Educação, FFCLRP), Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo (Depto. Bioquímica, UNIFESP/EPM), Prof. Dr. Augusto Cesar Spadaro (Depto. Física e Química, FCFRP-USP) e Profa. Dra. Maria Regina Sandoval (Depto. Farmacologia, Instituto Butantã) pela leitura atenciosa e valiosas críticas e sugestões a respeito do trabalho.

Agradeço ao doutorando Pierre Alexandre dos Santos e ao técnico José Carlos Tomaz (Setor de Química Orgânica, Depto. Física e Química da FCFRP-USP) pelo apoio, amizade e pela espectrometria de massa da peçonha. Agradeço também à

Virgínia Helena Betarello pela atenção, constante apoio e pela realização dos experimentos de ressonância nuclear magnética da peçonha.

A todos os integrantes do Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas: Andréa, Alessandra, Alexandra, Luciana, Renato, Taís e Tiago.

A todos os integrantes do Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental: Christiano, Cristiane, Fredy, Maira, Marcio, Maria Luíza, Olagide, Orfa e Simone.

Aos alunos do Laboratório de Neuroquímica: Renê e Reuters, bem como aos alunos da Psicobiologia: Carlos, Mário (*in memoriam*), Nelson, Regina, Vanessa e Viviane pelo companheirismo, amizade e discussões muito proveitosas.

Aos meus primeiros orientadores: Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo (Depto. Bioquímica, UNIFESP/EPM); Dra. Míriam Aparecida Boin (Depto. Medicina, Disciplina de Nefrologia- UNIFESP/EPM); Prof. Dr. Cristóforo Scavone (Depto. Farmacologia-ICB/USP). Como presente, carrego em mim experiências valiosas provindas de cada um dos senhores.

Ao apoio técnico fornecido pelos senhores Amauri Ramos Pinhal e Antônio José Colusso (Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas), pela amizade e presença, principalmente sob o sol escaldante das coletas; Flávio Del Vecchio, José Antônio Cortes de Oliveira (Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental), Vera Lúcia Aguilar Epifânio e Sílvia Helena Epifânio (Laboratório de Neuroquímica), sempre prontos a estenderem a mão amiga; e Jaime Zeotti (Depto. Botânica, FFCLRP) pela colaboração no isolamento da peçonha bruta.

Ao Sr. Antônio José Colusso, pela gelatinização das lâminas histológicas.

Aos secretários Renata Beatriz Vicentini, Míriam Cristina Osório de Souza, Carlos Augusto C. de C. Almada, Isabel Cristina Gonçalves Marangoni e Neifla Masson, pela grande colaboração e amizade.

Aos funcionários da Comissão de Pós-Graduação da FFCLRP: Maria Inês Joaquim, Denise Aparecida Silveira Santos, Sônia Maria Ribeiro Mendes e Cristina Helena Carvalho de Lima, pela grande amizade e constante apoio.

A todos os funcionários da FFCLRP, pelo constante apoio.

À Sra. Leomina de Jesus Silva de Souza, pela presença constante e amiga em todo o decorrer do trabalho.

Aos animais de experimentação –aranhas e ratos- que tiveram suas vidas ceifadas para a realização do presente trabalho.

Agradeço a meu cunhado Michel Neves Gonçalves pelo carinho, leitura e atenção dada anteriormente à minha dissertação e agora à minha tese.

Agradeço a meus sogros Osmar Gonçalves e Ivanilda Neves Gonçalves, e minha cunhada Ana Paula N. Gonçalves, pelo carinho com que sempre fui recebido.

Agradeço aos meus pais Geraldo Araujo Rodrigues e Nadir Cairrão Rodrigues, minhas irmãs Marla C. A. Rodrigues, Monica C. Rodrigues e ao meu cunhado Cláudio L. Marte. Das reflexões sobre nosso convívio retiro as diretrizes de minha conduta.

À FAPESP (processo número 98/16010-3) pelo financiamento deste projeto de pesquisa através da bolsa de estudos.

*“Veja
Não diga que a canção está perdida
Tenha fé em Deus, tenha fé na vida
Tente outra vez*

*Beba
Pois a água viva ainda tá na fonte
Você tem dois pés para cruzar a ponte
Na...da acabou,
não não não*

*Oh! Tente
Levante sua mão sedenta e recomece a andar
Não pense que a cabeça agüenta se você parar
Não não não não não não
Há uma voz que canta, há uma voz que dança
Há uma voz que gira
Bailando no ar*

*Queira
Basta ser sincero e desejar profundo
Você será capaz de sacudir o mundo
Vai, tente outra vez*

*Tente
E não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
Tente outra vez”.*

Raul Seixas

*"Quem tem consciência para ter coragem
Quem tem a força de saber que existe
E no centro da própria engrenagem
Inventa a contra-mola que resiste".*

*João Ricardo e João Apolinário – Primavera
nos Dentes – Secos e Molhados (MCA do
Brasil, Universal, 1973)*

SUMÁRIO

	p.
Lista de figuras.....	xiv
Lista de tabelas.....	xvi
Lista de abreviaturas e siglas.....	xvii
RESUMO.....	xx
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Neurotoxinas de peçonhas de aranhas.....	5
2.2 A aranha <i>Parawixia bistriata</i>	13
2.3 Neurotransmissão excitatória e inibitória do S.N.C. de mamíferos.....	16
2.4 Indução química de crises convulsivas em ratos: antagonistas GABAérgicos e peçonhas de artrópodos.....	18
2.5 O S.N.C. possui mecanismos próprios para o controle de crises convulsivas.....	20
2.5.1 Circuitarias neuroniais ligadas ao sistema anticonvulsivante endógeno: a <i>substantia nigra pars reticulata</i> (SNPR) e as estruturas prosencefálicas.....	20
3 PROPOSIÇÃO.....	22
3.1 Definição dos problemas.....	22
3.2 Hipóteses de trabalho.....	23
3.3 Objetivos.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Animais de experimentação.....	24
4.1.1 Aranhas.....	24
4.1.2 Ratos.....	25

4.2 Protocolo de purificação da peçonha de <i>P. bistrata</i>	25
4.2.1 Preparo do extrato bruto da peçonha de <i>P. bistrata</i>	25
4.2.2 Primeira e segunda cromatografias (filtração em gel G-50 e G-25).....	26
4.2.3 Terceira e quarta cromatografias (em CLAE com coluna de fase reversa e troca catiônica).....	27
4.2.4 Caracterização química parcial das frações obtidas.....	28
4.2.4.1 Dosagem de proteínas.....	28
4.2.4.2 Estimativa da concentração de ácidos nucléicos.....	28
4.2.4.3 Teste qualitativo de ninidrina das frações isoladas.....	29
4.2.5 Cromatografias em CLAE com detector de matriz de diodos.....	29
4.2.6 Ressonância magnética nuclear (RMN) da fração ativa.....	30
4.3 A fração PbTx 2.2.1.....	30
4.4 Atividade biológica das frações isoladas da peçonha de <i>P. bistrata</i> e da fração PbTx 2.2.1.....	31
4.5 Técnicas.....	34
4.5.1 Cirurgia estereotóxica para implantação de cânula-guia.....	34
4.5.2 Injeção i.c.v.	35
4.5.3 Teste de atividade de fosfatase ácida e alcalina.....	36
4.6 Drogas.....	37
4.6.1 Bicuculina.....	37
4.7 Filmagem, grupos controle e ambientação dos animais à arena teste.....	37
4.8 Coleta, processamento dos dados e análise estatística.....	38
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Isolamento da peçonha por filtração em gel (Sephadex G-50 e G-25) e teste pró-convulsivante e anticonvulsivante das frações isoladas.....	40

5.2 Cromatografia da fração 7 em CLAE (fase reversa e troca catiônica) e teste pró-convulsivante das frações 7.1 a 7.6.....	48
5.3 Teste qualitativo de ninidrina.....	52
5.4 Determinação da concentração protéica e leitura da absorvância em 260 e 280 nm das frações isoladas da peçonha de <i>P. bistrata</i>	53
5.5 Cromatografia das frações com atividade pró-convulsivante em CLAE com detector de matriz de diodos e CLAE-MS.....	55
5.5.1 Resultados da injeção das frações 7, 7.1 e 7.1.1-7.1.4 em CLAE/fase reversa com detecção de matriz de diodos.....	55
5.5.2 Espectrometria de massa das frações ativas (7 e 7.1) em CLAE/fase reversa-MS, condições isocráticas.....	60
5.5.3 Elucidação estrutural da substância majoritária da fração 7 por RMN.....	62
5.6 Teste i.c.v. da toxina PbTx 2.2.1 (protocolo II).....	65
5.7 Teste da atividade de fosfatase ácida e alcalina da fração 1.....	67
6 DISCUSSÃO.....	69
6.1 Isolamento de compostos pró-convulsivantes da peçonha de <i>P. bistrata</i>	69
6.1.1 A fração 7 e seus derivados.....	69
6.1.2 Experimentos com CLAE, CLAE/fase reversa, CLAE/matriz de diodos e CLAE-MS da fração 7 e derivados.....	71
6.2 Efeito anticonvulsivante <i>in vivo</i> da toxina PbTx 2.2.1.....	72
6.3 Discussão sobre o método proposto para isolamento de compostos pró-convulsivantes não-protéicos da peçonha de <i>P. bistrata</i>	73
6.4 Isolamento de outros compostos biologicamente ativos da peçonha de <i>P. bistrata</i>	77
7 CONCLUSÕES.....	78
7.1 Conclusões.....	78
7.2 Perspectivas futuras.....	79

ANEXO A - Dorsal and ventral hippocampal bicuculline microinjection: differential seizures and anticonvulsant effect of intranigral muscimol but not GABA uptake blockers.....	80
ANEXO B – A comparative neuroethological study of limbic seizures induced by <i>Parawixia bistriata</i> venom and kainic acid injections in rats.....	101
ANEXO C – Anticonvulsant and GABA uptake inhibition properties of <i>Parawixia bistriata</i> and <i>Scaptocosa raptoria</i> spiders venom fractions.....	109
ANEXO D – NMR ^1H unidimensional da fração 7.....	115
ANEXO E – HMQC da fração 7.....	116
ANEXO F – COSY ^1H - ^1H e Jres da fração 7.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
APÊNDICE – Sobre o papel utilizado nesta tese	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica das neurotoxinas não-protéicas presentes em peçonhas de aranhas e vespas solitárias.....	10
Figura 2 – Perfil cromatográfico do isolamento de nucleosídeos a partir da peçonha de <i>L. menavodi</i>	11
Figura 3 - Isolamento de diversos compostos da peçonha de <i>B. smithii</i>	12
Figura 4 - Fotos da aranha social <i>Parawixia bistrata</i>	14
Figura 5 - Protocolo I.....	32
Figura 6 - Protocolo II.....	33
Figura 7 - Fluxograma do isolamento da peçonha de <i>P. bistrata</i>	41,42
Figura 8 - Isolamento do extrato bruto proveniente de 2250 e 3250 glândulas de veneno de <i>P. bistrata</i> em Sephadex G-50.....	43
Figura 9 – Isolamento do extrato bruto proveniente de 4000 glândulas de veneno de <i>P. bistrata</i> em Sephadex G-50.....	44
Figura 10 - Isolamento das frações 6 e 7 a 10 em Sephadex G-25.....	46
Figura 11 - Injeção i.c.v. em ratos das frações 6, 7, 8 e 10.....	47
Figura 12 - Cromatografia da fração 7 em CLAE com coluna de fase reversa....	49
Figura 13 - Cromatografia da fração 7.1 em CLAE com coluna de troca catiônica.....	51
Figura 14 - Teste qualitativo de ninidrina para as frações isoladas da peçonha de <i>P. bistrata</i>	52
Figura 15 - Injeção das frações 7 e 7.1 em CLAE/fase reversa com detector de matriz de diodos	56
Figura 16 - Injeção das frações 7.1.1 a 7.1.4 em CLAE/fase reversa com detector de matriz de diodos.....	57

Figura 17 - Injeção das frações 7.2 e 7.3 em CLAE/fase reversa com detector de matriz de diodos.....	58
Figura 18 – Espectro de absorção dos componentes da fração 7.1 em CLAE/fase reversa.....	59
Figura 19 – Detecção dos componentes das frações 7 e 7.1 em CLAE-MS.....	61
Figura 20 – Estrutura química da substância inosina, identificada na fração 7 por RMN.....	62
Figura 21 - Atividade de fosfatase da fração 1.....	68
Figura 22 – Representação esquemática dos equilíbrios químicos presentes ao se utilizar o sal acetado de amônio.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Exemplos de neurotoxinas extraídas das peçonhas de aranhas e com efeitos seletivos sobre o SNC de mamíferos.....	6
TABELA 2 - Coordenadas de microinjeção para o ventrículo lateral direito.....	34
TABELA 3 - Exemplo do cálculo estatístico realizado com o Teste Exato de Fisher.....	39
TABELA 4 - Concentração protéica e estimativa de ácidos nucléicos das frações isoladas da peçonha de <i>P. bistriata</i>	54
TABELA 5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância inosina (CD_3OD).....	64
TABELA 6 - Efeito do pré-tratamento com PbTx 2.2.1 i.c.v. na expressão de crises convulsivas causadas pela posterior injeção de bicuculina (protocolo II)..	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico (ppm)
α -DTX	α -dendrodotoxina
ACN	Acetonitrila
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico, agonista dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos tipo AMPA
AP	Acilpoliamina
Arg-636	Argiotoxina 636
C.I.B.T.D./SIBI	Comissão de Implementação Biblioteca de Teses Digitais do Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade de São Paulo
CACA	Ácido <i>cis</i> -4-aminocrotônico
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE/MS	CLAE acoplado à espectrometria de massa
COSY	Espectroscopia correlacionada, derivado do inglês <i>correlated spectroscopy</i> .
d	Dubleto
dd	Duplo-dubleto
d (l)	Dubleto largo
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EAAT1, 2 ou 3	Transportador de aminoácidos excitatórios 1, 2 ou 3, derivado do inglês <i>excitatory amino acid transporter</i>
EEG	Eletroencefalografia
EM-ESI	Espectrometria de massas por ionização de pulverizador eletrônico, derivado do inglês <i>electron-spray ionization</i>
exp.	Experimento
Fig.	Figura
GABA	Ácido γ -amino butírico
GABA _A , B ou C	Receptor GABAérgico tipo A, B ou C
H1 e 2	Hipóteses de trabalho da presente tese

HD	Hipocampo dorsal; porção dorsal ou ântero-medial do hipocampo
HMQC	Coerência quântica heteronuclear múltipla, derivado do inglês <i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HV	Hipocampo ventral; porção ventral ou pósterio-lateral do hipocampo
HF-7	nucleosídeo sulfatado isolado da peçonha de <i>H. curta</i>
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.v.	Intravenoso
J	Constante de acoplamento (Hz)
JSTX	Toxina extraída da aranha <i>Joro</i> (<i>Nephila clavata</i>)
L-GLU	Ácido L-glutâmico
m-GLU1 a 8	Receptor glutamatérgico metabotrópico tipo 1 a 8
1-Na-spm	1-naftilacetil espermina
NMDA	N-metil-D-aspartato, agonista dos receptores RNMDA
NNC-05-2045	1-(3-(9h-carbazol-9-yl)-1-propyl)-4-(4-methoxyphenyl)-4-piperidinol inibidor da recaptação do GABA
ODS	Octadecilsilano
p	Valor de probabilidade
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida efetuada em condições desnaturantes, em presença de dodecil sulfato de sódio
p-NPP	Fosfato de p-nitrofenila, substrato (incolor) da reação enzimática de fosfatase.
p-NP	P-nitrofenila, produto (colorido) da reação enzimática de fosfatase.

PbTx 2.2.1	Neurotoxina inibidora da captação de GABA isolada em CLAE da peçonha de <i>P. bistriata</i> no laboratório do Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto
RAMPA	Receptor glutamatérgico tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
RCAINATO	Receptor glutamatérgico tipo cainato
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
RNMDA	Receptor glutamatérgico tipo N-metil-D-aspartato
S	singleto
SNAP-5114	Ácido piperidino carboxílico (s)-(-)-1-[2-[tris-(4-metoxifenil)metoxi]etil]-3- inibidor da recaptação do GABA, derivado do inglês: <i>(s)-(-)-1-[2-[tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-3-piperidinecarboxylic acid.</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNPR	<i>substantia nigra pars reticulata</i>
t	triplete
t (l)	Triplete longo
Tab.	Tabela
TC	Crises convulsivas tônico-clônicas
TFA	Ácido trifluoroacético
U.A.	Unidade arbitrária de concentração da peçonha
U.V.	Ultravioleta
WDS	Sacudidela látero-laterais do corpo, comportamento em que o rato lembra as sacudidelas de um cachorro molhado, extraído do inglês <i>wet dog shakes</i>

RESUMO

CAIRRÃO, M. A. R. **Efeitos biológicos da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* em ratos: isolamento e caracterização química parcial de uma neurotoxina pró-convulsivante.** 2002. 125 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

As peçonhas de artrópodos são ricas fontes de neurotoxinas, verdadeiras ferramentas moleculares com ação seletiva e específica sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, e de grande relevância clínico-científica.

Demonstramos recentemente que a peçonha de *P. bistriata*, quando injetada por via intracerebroventricular (i.c.v.), desencadeava crises convulsivas em ratos, um indício da existência de neurotoxinas pró-convulsivantes na peçonha dessa aranha.

O grupo do Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto isolou da peçonha dessa aranha várias neurotoxinas, dentre as quais uma denominada PbTx 2.2.1, que possui a capacidade de inibir a captação do neurotransmissor GABA em sinaptosomas corticais de ratos (*in vitro*), uma ação considerada como potencialmente anticonvulsivante. As frações PbTx 2.2.1 e 1.2.3 protegem retinas de ratos após isquemia. Mas, não se testou o efeito anticonvulsivante dessa fração em experimentos *in vivo*.

O presente trabalho teve dois objetivos: 1- Propor um método cromatográfico para isolar da peçonha de aranhas, neurotoxinas pró-convulsivantes não protéicas e de baixo peso molecular. Isolar e caracterizar parcialmente estas neurotoxinas da peçonha da aranha *P. bistriata*; 2- verificar se a fração PbTx 2.2.1 possui efeito anticonvulsivante *in vivo*.

O isolamento da peçonha de *P. bistriata*, realizado com filtração em gel (Sephadex G-50 e G-25), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (colunas de fase reversa e troca catiônica), e CLAE-acoplado a espectrometria de massa (CLAE-MS) produziu uma fração (fração 7) e um subcomponente (fração 7.1) com atividade pró-convulsivante, após injeção i.c.v. Tal fração apresenta características típicas de ácidos nucleicos. Confirmou-se, através de ressonância magnética nuclear (RMN) que o constituinte majoritário desta fração é o nucleosídeo inosina. O método cromatográfico mostrou-se muito lento. Uma outra fração (fração 6) da mesma peçonha inibiu as crises causadas por bicuculina i.c.v., ao passo que a fração 1 apresentou atividade de fosfatase ácida e alcalina. A injeção i.c.v. da fração PbTx 2.2.1, 20 min antes do convulsivante bicuculina também i.c.v., bloqueou as crises convulsivas em 71,4% dos animais, o que caracteriza um efeito anticonvulsivante *in vivo* desta fração.

Conclui-se que: 1- A peçonha de *P. bistriata* possui, dentre muitas, uma fração (fração 7) com efeito pró-convulsivante quando injetada i.c.v. em ratos. Nesta fração, aparentemente o composto majoritário é o nucleosídeo inosina. A peçonha da mesma aranha possui também uma fração com atividade anticonvulsivante (fração 6) e outra com atividade de fosfatase ácida e alcalina (fração 1). 2- o método cromatográfico proposto pode ser otimizado talvez pelo uso de ultrafiltração; 3- a fração PbTx 2.2.1 apresenta efeito anticonvulsivante *in vivo* no modelo de indução de crises por injeção i.c.v. de bicuculina; Palavras-chave: peçonha de aranha; pró-convulsivante; anticonvulsivante; *Parawixia bistriata*; nucleosídeos, inosina.

ABSTRACT

CAIRRÃO, M. A. R. **Biological effects of the *Parawixia bistriata* spider venom in rats: isolation and partially chemical characterization of a convulsant neurotoxin.** 2002. 125 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Arthropod venoms are rich sources of neurotoxins, molecular tools with selective and specific actions over the mammalian central nervous system with great clinical and scientific importance.

Previous work of our laboratory showed that the spider venom of *Parawixia bistriata*, when injected by intracerebroventricular (i.c.v.) route, induced convulsive seizures in rats, a sign of convulsant neurotoxins.

The group of Professor Joaquim Coutinho-Netto isolated from this spider venom a neurotoxin called PbTx 2.2.1 which is a GABA transporter inhibitor in the rat cortical synaptosomal preparation (*in vitro*), a potentially anticonvulsant property. The fractions PbTx 2.2.1 and 1.2.3 protected retinal cells against ischemia. But, it has not been tested if the PbTx 2.2.1 fraction also has an *in vivo* anticonvulsant action.

Present work has two objectives: 1- to propose a chromatographic methodology to isolate non-protein low molecular weight convulsant neurotoxins from spider venoms. Isolate and partially characterize these neurotoxins from *P. bistriata* venom; 2- test if PbTx 2.2.1 has *in vivo* anticonvulsant effect.

Biochemical venom isolation by gel filtration (Sephadex G-50 and G-25), reverse phase and cationic exchange in high pressure liquid chromatography (HPLC) and also HPLC coupled to mass spectrometry (HPLC-MS), has pointed that the *P. bistriata* spider venom has a fraction (fraction 7) and a subfraction (7.1) with convulsant activity when injected i.c.v. in rats. Fraction 7 has nucleosidic characteristics. Nuclear magnetic resonance (NMR) has showed that the principal component of this fraction is the nucleoside inosine. Another fraction (fraction 6) isolated from the same venom, inhibited seizures induced by i.c.v. bicuculline and the fraction 1 showed acid and basic phosphatase activity.

PbTx 2.2.1, when injected i.c.v. 20 min prior to the convulsant bicuculline (i.c.v.), has blocked seizures in 71.4 % of the animals, what was considered an anticonvulsant effect.

The conclusions are: 1- the spider venom of *P. bistriata* has a fraction (fraction 7) with convulsant action when injected i.c.v. in rats. The major component of this fraction is the nucleoside inosine. This spider venom also has another fraction (fraction 6) with anticonvulsant activity and one with acid and alkaline phosphatase (fraction 1); 2- the chromatographic methodology can be improved, perhaps by ultrafiltration methods; 3- the PbTx 2.2.1 fraction has anticonvulsant effect *in vivo*.

Key-words: spider venom; seizure; anticonvulsant; *Parawixia bistriata*; nucleosides, inosine.

1. INTRODUÇÃO

As aranhas são invertebrados carnívoros que se alimentam principalmente de insetos. Para isso, desenvolveram peçonhas, que nada mais são do que grande reservatório de toxinas com mecanismos de ação seletivos, capazes de paralisar ou matar suas presas.

As neurotoxinas podem ser consideradas “bisturis moleculares”, pois permitem a ativação ou o bloqueio seletivo de diversos componentes do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos tais como: receptores extracelulares, transportadores de neurotransmissores e canais iônicos. Tal ação seletiva possibilita não só o estudo de receptores/transportadores conhecidos, mas também a descrição de novos subtipos. Desta forma, considera-se toda nova neurotoxina muito importante, pois esta permitirá que se conheça mais sobre a própria fisiologia do SNC. Este conhecimento talvez permita que se interfira adequadamente em processos fisiopatológicos, retardando ou minimizando seqüelas decorrentes de síndromes ou acidentes naquele tecido.

O estudo das neurotoxinas pode ser realizado por diversas metodologias. Há os experimentos *in vitro*, onde o SNC de mamíferos é exposto fora do organismo às neurotoxinas. Como exemplos temos a cultura de neurônios, as fatias (“slices”) de núcleos cerebrais, ou a preparação de sinaptosomas corticais de ratos. Esta última técnica consiste na separação, por ultracentrifugação com gradiente de densidade, de botões sinápticos neuronais metabolicamente ativos (os chamados sinaptosomas). Estes botões possuem toda a maquinaria necessária para a síntese, liberação e captação de neurotransmissores. Tanto a preparação sinaptosomal quanto os demais

métodos *in vitro* consistem em poderosas ferramentas da farmacologia de neurotoxinas, permitindo inferir sobre os mecanismos de ação dos compostos.

Diversos avanços tem ocorrido nesta área, inclusive aqueles de nosso próprio laboratório (Pizzo et. al, 2000). No entanto, uma vez que o tecido cerebral fica exposto a uma toxina em um tubo de ensaio, este tecido não conta nestas condições com todos os mecanismos naturais de proteção e interação que possui *in vivo*.

Dentro do organismo, os neurônios interagem intrinsecamente com as células da glia, e contam com o sistema ventricular e da barreira hematoencefálica para excreção de metabólitos e proteção contra ameaças químicas. Assim, a pesquisa com neurotoxinas também é realizada *in vivo*, onde o SNC é exposto aos compostos dentro do próprio organismo. Uma maneira de se acessar a função (e eventualmente disfunção) do SNC de mamíferos expostos a peçonhas consiste no estudo do comportamento de animais de experimentação injetados intracerebralmente com as neurotoxinas. Uma alteração suficientemente intensa sobre o SNC originada por uma toxina atuando em receptores, transportadores, liberação ou síntese de neurotransmissores, pode causar crises convulsivas em animais. Dentre vários exemplos descritos na literatura, encontram-se as crises convulsivas observadas em ratos após a administração da toxina peptídica α -dendrodotoxina (α -DTX), isolada da peçonha da serpente *Dendroaspis angusticeps* (Velluti et al., 1987). Tal resultado significou um relevante efeito biológico, capaz de desestabilizar a homeostase cerebral e foi, posteriormente, associado ao bloqueio específico de um subtipo de canal de potássio dependente de voltagem (Wu et al., 1989) e à capacidade da α -DTX em estimular a liberação de neurotransmissores (Dorandeu et al., 1997).

Demonstrou-se que a peçonha de *P. bistrata* induz crises convulsivas em ratos, quando administrada i.c.v. (Cairrão, 1999; Cairrão et al., 2001 – anexo B). Os estudos da peçonha desta aranha iniciaram-se no laboratório do Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto (FMRP-USP), onde demonstrou-se que este material inibia a captação do neurotransmissor inibitório ácido γ -aminobutírico (GABA) e estimulava a captação do neurotransmissor excitatório ácido L-glutâmico (L-GLU) (Fontana, 1997) no modelo de sinaptosomas do córtex cerebral de rato. Em isolamento posterior, demonstrou-se que frações diferentes atuam em cada neurotransmissor (PbTx 2.2.1 para o GABA e PbTx 1.2.3 para o L-GLU) (Fontana, 1997). Assim, objetivou-se nesta tese estudar a atividade biológica da peçonha de *P. bistrata*, por meio de dois enfoques: I. O isolamento e testes comportamentais em ratos de novos compostos biologicamente ativos (pró-convulsivantes) da peçonha de *P. bistrata*; II. Caracterizar os efeitos *in vivo* da neurotoxina PbTx 2.2.1, isolada pelo doutorando Renê O. Belebony, do laboratório do Prof. Dr. Coutinho-Netto.

A tese é apresentada da seguinte forma: no capítulo 2 (Revisão da Literatura) é apresentado uma revisão teórica das bases científicas em que este trabalho se insere. No capítulo 3 é definido nosso problema de estudo, as hipóteses que levantamos e os objetivos propostos. No capítulo 4 são apresentados os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento da pesquisa, bem como o desenho experimental e as técnicas utilizadas. No capítulo 5 são apresentados os resultados dos experimentos realizados. No capítulo 6 discutimos esses resultados obtidos à luz da literatura pertinente. No capítulo 7 são apresentadas as conclusões do trabalho. Nos anexos encontram-se os trabalhos publicados ou em processo de publicação, relacionados ao material desta tese. Na última parte do trabalho encontram-se as

referências bibliográficas, apresentadas segundo as normas técnicas vigentes (USP/Sibi, 2001) e o apêndice, que trata sobre o papel utilizado nesta tese.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neurotoxinas de peçonhas de aranhas

As aranhas são animais caçadores que podem ser consideradas como um dos mais bem sucedidos grupos de invertebrados terrestres. Encontradas em praticamente todos os ambientes e com mais de 40.000 espécies descritas até o momento, perdem em número apenas para os insetos, suas principais presas (Platnick, apud Rash & Hodgson, 2002). Acredita-se que um dos fatores que possibilitaram tamanha adaptação ao meio tenha sido a seleção natural de um aparato orgânico capaz de produzir, armazenar e inocular um conjunto de substâncias químicas -as peçonhas- em suas presas para a caça ou defesa própria. Mas, qual a vantagem de se gastar tamanha energia no desenvolvimento de glândulas secretoras e armazenadoras de veneno, ductos e síntese protéica? As peçonhas possuem componentes que atuam de forma seletiva sobre componentes do SNC ou periférico de vários animais (presas ou não), paralisando, atordoando ou ainda lesando predadores. Desta forma, as neurotoxinas isoladas das peçonhas são importantes ferramentas para as Neurociências, pois permitem a manipulação (bloqueio ou estimulação) de componentes do SNC de mamíferos (Tab. 1).

Tab. 1. Exemplos de neurotoxinas extraídas das peçonhas de aranhas e com efeitos seletivos sobre o SNC de mamíferos. Modificado de Uchitel (1997)

Toxina	Aranha da qual foi extraída	Seletividade	Referência
FTX	<i>A. aperta</i>	Canal de cálcio tipo P	Llinas et al, 1989
ω -Aga IA-IC	<i>A. aperta</i>	Canal de cálcio tipo L	Bindokas & Adams, 1989
ω -Aga IIA e IIB	<i>A. aperta</i>	Canal de cálcio tipo N	Adams et al, 2000
ω -Aga IVA e IVB	<i>A. aperta</i>	Canal de cálcio tipo P/Q	Mints et al., 1992
μ -Aga I-VI	<i>A. aperta</i>	Canal de sódio, induz disparo repetitivo de neurônios	Adams et al., 1989
PhTx2 (Tx2-5 e 2-6)	<i>P. nigriventer</i> (aranha armadeira)	Inibe a inativação de canais de sódio	Araujo et al., 1993
Hanatoxin 1 e 2	<i>P. spatulata</i>	Inibe canais de potássio dependentes de voltagem tipo Kv2.1 em ratos	Swartz & Macckinnon, 1995
HpTx (1-3)	<i>H. venatoria</i>	Inibe canais de potássio dependentes de voltagem tipo Kv4.2 em ratos	Sanguinetti et al., 1997
Arg 636	<i>Argiope sp.</i>	Inibe correntes de cloreto ativadas por cálcio	Sutton et al., 1998
FTX 3.3	<i>A. aperta</i> (sintetizado quimicamente)	Inibe correntes de cloreto ativadas por cálcio	Sutton et al., 1998

Há vários exemplos do uso de neurotoxinas nas Neurociências: utilizou-se a neurotoxina JSTX para verificar a presença ou ausência da subunidade GLUR2 em estudos sobre a composição dos receptores glutamatérgicos tipo RAMPa presentes na glia de ratos (Meucci & Miller, 1998). A descrição e caracterização de novos subtipos de canais de potássio, cálcio e cloreto no SNC necessita de bloqueadores específicos, e as neurotoxinas tem se mostrado imprescindíveis nesta área (Uchitel, 1997; Garcia et al, 1998; Rash & Hodgson, 2002).

As primeiras neurotoxinas identificadas nas peçonhas de aranhas foram proteínas de alto peso molecular e peptídeos (para revisão, veja McCormic & Meinwald, 1993 e Rash & Hodgson, 2002). Como exemplo, a peçonha da aranha viúva negra (*Latrodectus sp*) contém uma neurotoxina ativa apenas em mamíferos (α -latrotoxina, de peso molecular 130 KDa), outra específica sobre crustáceos (latrocrustatotoxina, 120 KDa) e pelo menos cinco moléculas especificamente ativas na neurotransmissão de insetos (as latroinsetotoxinas, 110 a 140 KDa) (Grishin, 1998).

Há diversos relatos sobre a presença de enzimas em peçonhas de aranhas, tais como hialuronidase, cininase e fosfatase alcalina entre outras. Kaiser apud Rash & Hodgson (2002) descreveu pela primeira vez, em 1956, a presença de atividade de hialuronidase na peçonha da aranha *Lycosa raptoria* e *Phoneutria nigriventer*. Schanbacher et al. (1973) isolaram uma hialuronidase com peso molecular de aproximadamente 39 kDa na peçonha da aranha *D. hentzi*. O substrato para a hialuronidase é o ácido hialurônico, que é o maior constituinte da matriz extracelular, o que levou vários pesquisadores a postular que a hialuronidase facilitaria o espalhamento dos outros componentes da peçonha sobre o tecido da presa

(Schanbacher et al., 1973). Akhunov et al. (1981) isolaram uma enzima inativadora de bradicinina (cininase) da peçonha da aranha *L. tredecimguttatus*. Esta cininase mostrou-se uma endopeptidase que cliva as ligações prolina(7)-fenilalanina(8) tanto da bradicinina quanto da angiotensina I, mas esta peçonha não possui atividade proteolítica contra a caseína ou hemoglobina (Akhunov et al., 1996). Estes resultados são interessantes já que cininases não tóxicas são ferramentas úteis para o estudo do sistema calicreína-cinina e possuem ação terapêutica em potencial (Rash & Hodgson, 2002). Heitz & Norment (1974) e Norment et al. (1979) descreveram a presença de fosfatase alcalina na peçonha da aranha *L. reclusa*, através de método fluorimétrico.

Desde o início dos anos 80 descobriu-se que também os compostos não-protéicos e de baixo peso molecular (menores que 1000 Da) presentes nas peçonhas de aranhas possuem grande importância, tanto científica quanto médica. As chamadas poliaminas amidas ou acilpoliaminas (Kawai et al., 1982; Fig. 1A), presentes nas peçonhas de diversas aranhas como a *Joro* (JSTX, isolada da aranha *Nephila clavata*, encontrada no Japão), *Argiope lobata* e até mesmo da vespa solitária *Philanthus triangulum*, são antagonistas glutamatérgicos não-competitivos (bloqueiam os poros dos canais iônicos) dos receptores tipo RNMDA, RAMPA e também do RCANATO (Usherwood & Blagbrough, 1991; Brackley et al., 1993; Washburn & Dingledine, 1996; Moe et al., 1998).

Dado que os receptores glutamatérgicos estão envolvidos na patofisiologia de diversos distúrbios cerebrais em mamíferos, como por exemplo na epilepsia e crises convulsivas (Schwartzkroin & Wyler, 1980; Prince & Connors, 1986; Dingledine et al., 1990), o bloqueio destes receptores pelas acilpoliaminas teoricamente produziria um efeito neuroprotetor e/ou anticonvulsivante. De fato, há relatos de que as

acilpoliaminas possuem efeitos anticonvulsivantes em diversos modelos de indução de crise convulsiva: Jackson & Parks (1990) observaram que uma fração acilpoliamínica (denominada AG2), isolada da peçonha da aranha *Agelenopsis aperta*, amenizou ou suprimiu as crises induzidas pela injeção de ácido caínico (12 mg/kg; i.v.), picrotoxina (3,6 mg/kg; i.v.) e bicuculina (0,5 mg/kg; i.v.). O 1-naftilacetil espermina (1-Na-spm), que é um derivado sintético da acilpoliamina AG2, possui efeito anticonvulsivante no modelo de abrasamento (“*kindling*”) em ratos quando injetado no ventrículo lateral (Takazawa et al., 1996). Esse efeito foi duradouro, desaparecendo apenas 4 dias após a injeção do 1-Na-spm (Takazawa et al., 1996).

Em meados da década de 90, Meinwald & Eisner (1995) descrevem outro tipo de composto não-protéico de baixo peso molecular presente na peçonha da aranha *Hololena curta*, os nucleosídeos sulfatados (Fig. 1C e Fig. 2). São escassos os estudos sobre a atividade biológica dos nucleosídeos sulfatados. Meinwald & Eisner (1995) e McCormic et al. (1999) citam que o HF-7 (isolado da peçonha de *H. curta*), bloqueia os receptores glutamatérgicos tipo RCAINATO. O mesmo grupo citou também que este composto seria eficaz na proteção contra a morte neuronal durante a isquemia (McCormic et al., 1999; Meinwald apud Friedlander, 1999).

Fig. 1. Estrutura básica das neurotoxinas não-protéicas presentes em peçonhas de aranhas e vespas solitárias. A: Acilpoliaminas descritas em peçonhas de aranhas e vespas solitárias. (Usherwood & Blagbrough, 1991). O retângulo denominado espaçador significa um local da molécula ocupado por diferentes radicais, conforme a espécie. B: Acilpoliamina isolada da aranha *Argiope lobata* e denominada argiotoxina 636 (ArgTx-636, 636 Da) (Bateman et al., 1985). C: Nucleosídeo sulfatado HF-7 (631 Da) (Meinwald & Eisner, 1995).

Descreveu-se que os principais componentes de baixo peso molecular da peçonha da aranha *Latrodectus menavodi* foram os derivados nucleosídicos purinérgicos adenosina, guanosina, inosina e o 2,4,6-trihidroxipurina (Fig. 2) (Horni et al, 2001), mas este trabalho não se refere aos efeitos biológicos destes compostos nem a forma como se chegou às suas estruturas moleculares.

Fig. 2. Perfil cromatográfico do isolamento de nucleosídeos a partir da peçonha de *L. menavodi*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna de fase reversa. Composto 1: adenosina; 2: guanosina; 3: inosina; 4: 2,4,6 trihidroxipurina (Horni et al, 2001).

Odell et al. (1994), isolaram, da peçonha da aranha *Brachypelma smithii*, 4 frações: enzima hialuronidase, miotoxinas, acilpoliaminas e nucleotídeos, com a metodologia de filtração em gel (resina Sephadex G-50, Fig. 3). O mesmo grupo sugere ainda que a solução de acetato de amônio 0,1 mol/L constitui uma boa fase móvel, pois este sal seria volátil durante a liofilização.

Fig. 3. Isolamento de diversos compostos da peçonha de *Brachypelma smithii*. Na ordem de saída: enzima hialuronidase, miotoxinas, acilpoliaminas e nucleotídeos. Coluna: Sephadex G-50, 2.1 cm x 200 cm. Fase móvel: acetato de amônio 0,1 mol/L. (Odell et al., 1994).

Em resumo: as neurotoxinas isoladas das peçonhas animais são poderosas ferramentas farmacológicas, úteis não apenas na pesquisa básica, mas também com potencial terapêutico (Usherwood & Blagbrough, 1991; McCormick & Meinwald, 1993; Uchitel, 1997; Rash & Hodgson, 2002). Dentre as toxinas de peçonhas de artrópodos não protéicas e com baixo peso molecular destacam-se as acilpoliaminas e os nucleosídeos sulfatados.

2.2. A aranha *Parawixia bistriata*

A aranha *Parawixia bistriata* (Fig. 4), encontrada na América Central, Amazônia, Nordeste e Sudeste do Brasil (Levi, 1992), é colonial e confecciona teias orbitais.

Seu comportamento alterna-se ritmicamente em quiescência diurna (onde os indivíduos agrupam-se em ninho de teias), e atividade caçadora noturna, onde cada aranha constrói uma teia individual formando uma gigantesca teia caçadora, que é reabsorvida pela manhã (Gobbi et al, 1979). Esta aranha possui um sistema de cooperação na caça, pois as vibrações de uma presa (insetos, como a broca do café) de massa maior que a própria aranha em uma teia individual, atraem aranhas de teias vizinhas, que ajudam na imobilização, e dividem a presa sem hostilidade (Gobbi et al, 1979; Fowler, 1993).

Ensaio com a peçonha da *P. bistriata* em uma metodologia desenvolvida em nosso laboratório (em colaboração com o grupo do Dr. Coutinho-Netto, FMRP)

demonstraram potente ação paralisante em térmitas (cupins), quando injetada via retal (Fontana et al, 2000).

Fig. 4. Fotos da aranha social *Parawixia bistriata*. A: Uma fêmea. A barra de escala representa 2 cm. B, C e D: Fotos diurnas, onde o animal encontra-se quiescente. Notar que a colônia encontra-se envolvida por teias. E: foto noturna, onde os indivíduos afastam-se, e cada aranha tece sua própria teia individual de caça. Fotografias: Marcelo C. A. Rodrigues, 1999 (A), 2001 (B-E)

Fontana (1997; 2001) e Beleboni (2000) observaram que a peçonha bruta fervida de *P. bistrata*, bem como duas frações isoladas (PbTx 1.2.3 e PbTx 2.2.1), possuem ação sobre os sistemas cerebrais de neurotransmissão glutamatérgico e GABAérgico em ratos.

A fração PbTx 1.2.3 (massa molecular 437 Da) estimula a recaptação de glutamato em sinaptosomas do córtex cerebral de ratos e em cultura de células (COS-7, células imortalizadas derivadas de rim de macacos africanos) expressando especificamente o transportador de aminoácidos excitatórios tipo 2 (EAAT2), mas não o tipo 1 (EAAT1) ou o 3 (EAAT3) (Fontana, 2001). A fração PbTx 2.2.1 inibe a captação do neurotransmissor inibitório GABA no modelo de sinaptosomas corticais de ratos (Fontana, 1997; Beleboni, 2000). Estas frações (PbTx 2.2.1 e 1.2.3) diminuíram a morte celular no modelo do glaucoma experimental em ratos (Guizzo, 2001).

Aumentar a disponibilidade de GABA (neurotransmissor inibitório) e diminuir a de glutamato (neurotransmissor excitatório) na fenda sináptica, como foi observado para esta peçonha, poderia significar uma ação potencialmente anticonvulsivante *in vitro*. Dados de nosso laboratório mostraram que a injeção i.c.v. da peçonha bruta deproteinizada de *P. bistrata* apresentou efeito anticonvulsivante no modelo de indução de crises convulsivas agudas induzidas pelo pentilenotetrazol (Cairrão, 1999; Cairrão et al., 2002- anexo C).

Nielsen et al. (1991), observaram que a tiagabina (i.p.), que é um composto inibidor de recaptação de GABA, teve efeito anticonvulsivante em vários modelos experimentais de indução de crises convulsivas, entre estes o teste audiogênico em

camundongos DBA/2, e a injeção i.p. de antagonistas dos receptores GABA como o pentilenotetrazol (120 mg/kg) e bicuculina (4 mg/kg).

Em resumo: da peçonha de *P. bistrata* foi isolada uma fração (PbTx2.2.1) que inibe a captação do GABA. No entanto, esta peçonha também deve conter neurotoxinas pró-convulsivantes, já que sua injeção i.c.v. causa crises convulsivas em ratos (Cairrão, 1999, Cairrão et al, 2001- anexo B).

2.3. Neurotransmissão excitatória e inibitória do SNC de mamíferos

No SNC de mamíferos, o L-GLU (principal neurotransmissor excitatório), atua em receptores que podem ser divididos em duas famílias: a primeira está associada a canais iônicos (ionotrópicos), subdivididos e denominados segundo seus respectivos agonistas em receptores tipo N-metil-D-aspartado (RNMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (RAMPA) e cainato (RCAINATO) (Monaghan et al, 1989; Watkins et al, 1990; Hollman & Heinemann, 1994). A segunda família está associada a proteínas G, compreendendo os receptores metabotrópicos mGLU1 a mGLU8 (Monaghan et al, 1989; Watkins et al, 1990; Hollman & Heinemann, 1994).

O GABA (principal neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos) ativa três classes diferentes de receptores, denominados GABA_A, GABA_B e GABA_C. O receptor GABA_A está associado a canais de cloreto ativados por ligante. Este tipo de receptor é ativado pelo GABA, muscimol, isoguvacina e são inibidos pela bicuculina, gabazina entre outros. Também os receptores GABA_C são acoplados a canais de cloreto. Este tipo de receptor GABAérgico é ativado por GABA e pelo

ácido *cis*-4-aminocrotônico (CACA), e são inibidos pelo ácido acético-4-imidazol, mas não pela bicuculina. Os receptores GABA_B são denominados metabotrópicos, pois são acoplados a canais de cálcio ou potássio via proteínas G, ativando cascatas de segundos mensageiros no citoplasma da célula (para revisão, veja Johnston, 1996; Mehta & Ticku, 1999).

Tanto o L-GLU quanto o GABA são recaptados da fenda sináptica pelas chamadas proteínas transportadoras ou simplesmente transportadores. Atualmente, encontram-se descritos 5 transportadores para o L-GLU. Dois são predominantemente gliais (GLAST e GLT para o rato, e seus homólogos humanos EAAT1 e EAAT2) e três são neuroniais (EAAC para o rato e seu homólogo humano EAAT3; EAAT4 e EAAT5 para o humano) (Amara & Kuhar, 1993; Danbolt et al, 1998 apud Meldrum et al, 1999). Para o GABA, encontram-se descritos 4 tipos de transportadores (GAT 1 a 4; Borden et al., 1992).

Recentemente tem-se verificado que, ao inibir a captação do GABA com drogas como o ácido nipecótico, tiagabina ou riluzole, aumenta-se a disponibilidade de GABA na fenda sináptica, estimulando assim a neurotransmissão inibitória. Esse efeito farmacológico tem sido associado a efeitos anticonvulsivantes e de neuroproteção (Krogsgaard-Larsen et al., 2000).

Em resumo: pode-se estimular a neurotransmissão inibitória por diversas formas, entre as quais: 1- adição de um agonista GABAérgico (como o muscimol), que se liga diretamente ao receptor GABA_A; 2- adição de um inibidor da captação do GABA (como o ácido nipecótico), que faz com que o GABA permaneça mais tempo em ação na fenda sináptica.

2.4. Indução química de crises convulsivas em ratos: antagonistas GABAérgicos e peçonhas de artrópodos

Embora de maneira simplificada, pode-se imaginar que o sistema nervoso central (SNC) de mamíferos funcione no equilíbrio entre a excitação (glutamato) e a inibição (GABA). Sempre que houver um desbalanço, surgem conseqüências desastrosas para o organismo.

Uma tendência à inibição pode levar a um estado de coma ou morte por inibição de centros respiratórios, enquanto que uma excitação exacerbada pode levar a crises convulsivas. Neste contexto, o estudo sistematizado da indução química de crises convulsivas em animais de experimentação possui diversas aplicações nas Neurociências, dentre as quais: o estudo do equilíbrio excitação/inibição, fatores desencadeadores, herança genética, predisposição orgânica e mecanismos endógenos de controle. Há diversas formas de indução química de crises convulsivas em animais (para revisão, veja Löscher & Schmidt, 1988; Meldrum et al., 1999; Moraes et al., 2000; Garcia-Cairasco, 2002), como por exemplo: drogas como o N-metil-D-aspartato, glutamato e ácido caínico, que são agonistas de receptores dos aminoácidos excitatórios (Löscher & Schmidt, 1988; Garcia-Cairasco, 2002). Também a estriquinina, que é um antagonista do receptor inibitório da glicina (localizado na medula espinal) ou então certos agonistas colinérgicos como a pilocarpina (Turski et al, 1984) podem ser utilizados para este fim (Löscher & Schmidt, 1988).

No entanto, os antagonistas dos receptores GABAérgicos estão entre os mais usados quando se deseja induzir crises convulsivas em animais (Löscher & Schmidt, 1988; Garcia-Cairasco, 2002). Nessa classe de fármacos, destacam-se o pentilenotetrazol, a picrotoxina e a bicuculina (Löscher & Schmidt, 1988). A

bicuculina pertence à categoria de antagonistas competitivos do receptor GABA_A (Aidley & Stanfeild, 1996), mas sem ação nos receptores GABA_C (Enz & Cutting, 1998). Já a picrotoxina é extraída da semente de *Anamirta cocculus*, do sudeste da Ásia, e é um antagonista não-competitivo dos receptores GABA_A e GABA_C. Acredita-se que a picrotoxina bloqueie diretamente o canal de cloreto, ligando-se ao poro, ou reduzindo a probabilidade de abertura deste canal por mecanismos alostéricos (Aidley & Stanfeild, 1996; Enz & Cutting, 1998). A picrotoxina, a bicuculina e o pentilenotetrazol produzem o mesmo tipo de crise convulsiva em ratos: crises generalizadas clônicas e tônicas, e são comumente utilizados em estudos de drogas potencialmente anticonvulsivas (Löscher & Schmidt, 1988).

Diversas neurotoxinas extraídas de peçonhas animais induzem crises convulsivas, pois atuam diretamente em componentes do SNC. O estudo comportamental de indução de crises convulsivas por peçonhas de levou à descoberta e isolamento de diversas neurotoxinas, como por exemplo a toxina α -DTX (já citada na Introdução) ou a TS-8F (Carvalho et al, 1998). Obteve-se esta última através de experimentos de injeção intrahipocampal em ratos da peçonha bruta do escorpião *Tityus serrulatus* (5 μ g; Sandoval & Dorce, 1993). Este protocolo causou um ranger de dentes, mioclonias, tremores, ataxia, automatismos orofaciais e sacudidelas de corpo (WDS), evoluindo em 15 a 20 minutos para crises tônico-clônicas e morte. Este protocolo comportamental permitiu, associado a técnicas de isolamento, a descrição da neurotoxina TS-8F (Carvalho et al, 1998). Como o escorpião *Tityus serrulatus* causa inúmeros casos de acidentes em humanos, a descoberta e descrição de neurotoxinas em sua peçonha possui não só importância científica, mas também para a saúde pública.

Em resumo: os modelos experimentais de crises convulsivas possuem grande importância para as Neurociências. Muitas neurotoxinas, quando injetadas em animais, induzem crises convulsivas, e este fenômeno pode ser útil no isolamento de uma neurotoxina e também na determinação de seu mecanismo de ação.

2.5. O SNC possui mecanismos próprios para o controle de crises convulsivas

2.5.1. Circuitarias neuronais ligadas ao sistema anticonvulsivante endógeno: a *substantia nigra pars reticulata* (SNPR) e as estruturas prosencefálicas

À semelhança do que acontece em alguns mecanismos fisiológicos, acredita-se atualmente que as crises convulsivas possam ser controladas por circuitarias remotas endógenas envolvendo diversas estruturas encefálicas (para revisão, veja Iadarola & Gale, 1982; Gale, 1985; Maggio & Gale, 1989; Miller, 1992). Este controle circuital de crises convulsivas faria parte de um sistema anticonvulsivante endógeno. Diversos resultados demonstram que este sistema atua não apenas na inibição de vias específicas, mas possui um mecanismo aparentemente único, com a capacidade de inibir diversos tipos de crises convulsivas. Gale (1985) propôs que um núcleo mesencefálico principalmente envolvido neste último tipo de controle de crises é a *substantia nigra pars reticulata* (SNPR).

Nesse sentido, o estudo do sistema anticonvulsivante endógeno envolve sempre a indução de uma crise convulsiva, e a tentativa de bloqueio destas crises pela manipulação farmacológica da SNPR.

Em resumo: a microinjeção de agonistas inibitórios GABAérgicos (“aumentando” a inibição) na SNPR produz um efeito anticonvulsivante sobre crises

convulsivas originadas em diversas partes do SNC. Baseado nestes conceitos, a microinjeção de um antagonista GABAérgico (como a bicuculina) em uma estrutura cerebral como o hipocampo constituiria a princípio, um bom modelo de estudos sobre o controle de crises convulsivas causado pela injeção de agonistas GABAérgicos (como o muscimol) na SNPR.

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Definição dos problemas

Sabe-se que as peçonhas de aranhas são fontes extremamente ricas de neurotoxinas. Descrevemos anteriormente um efeito pró-convulsivante após injeção i.c.v. em ratos da peçonha de *P. bistrata* (Cairrão, 1999, Cairrão et al., 2001). No entanto, não há relatos sobre o isolamento e teste *in vivo* de neurotoxinas pró-convulsivantes da peçonha desta aranha.

A Sra. Andréia K. Fontana e o Sr. Renê O. Beleboni isolaram a fração PbTx 2.2.1 da peçonha de *P. bistrata*, que inibe a captação do GABA no modelo *in vitro* de sinaptosomas isolados do córtex de rato. Este efeito, apesar de potencialmente anticonvulsivante (estimula a neurotransmissão GABAérgica), necessita de uma avaliação *in vivo*.

Com base nos problemas apresentados, perguntamos:

1. Será que a peçonha de *P. bistrata* não apresenta neurotoxinas pró-convulsivantes?
2. Será que a fração PbTx 2.2.1 apresenta efeito anticonvulsivante *in vivo*?

3.2 Hipóteses de trabalho

Nossas hipóteses de trabalho para responder a estas perguntas foram:

H1: A peçonha de *P. bistrata* deve conter compostos biologicamente ativos pró-convulsivantes.

H2: A fração PbTx 2.2.1 deve apresentar efeito anticonvulsivante *in vivo*.

3.3 Objetivos

1. Propor um método cromatográfico para isolar da peçonha de *P. bistrata* neurotoxinas não protéicas de baixo peso molecular pró-convulsivantes.
2. Avaliar se a fração PbTx 2.2.1 apresenta efeito anticonvulsivante *in vivo*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento para experimentação animal, evitando o sofrimento e a dor desnecessários.

4.1.1 Aranhas

Coletou-se vários ninhos da aranha *P. bistriata* nas cidades do Estado de São Paulo: Ribeirão Preto, Mocóca, Pirassununga, Tambaú e Cajurú. A coleta de invertebrados para fins de pesquisa científica por instituição brasileira é permitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) através da Portaria 332 de 13 de maio de 1990. A espécie estudada não consta da lista oficial de animais em extinção do Estado de São Paulo (segundo consulta ao IBAMA-SP). No entanto, durante as coletas evitaram-se os ninhos cujos animais eram pequenos, os mais altos nas árvores, e nunca coletaram-se todos os ninhos de uma área ou todos os animais de um ninho, de forma a permitir a sobrevivência e preservação da espécie. Enviaram-se alguns espécimens ao Prof. Dr. Antônio Brescovich (Instituto Butantã, SP), que confirmou tratar-se da aranha *Parawixia bistriata* (comunicação pessoal).

4.1.2 Ratos

Ratos Wistar machos (200 a 250g) provenientes do Biotério do *Campus* da USP de Ribeirão Preto foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia, sob ventilação, temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade controlados. Ciclo claro/escuro de 12 h (luz entre 7:00 e 19:00 h). Água e comida *ad libitum*.

4.2 Protocolo de purificação da peçonha de *P. bistrata*

Para responder **H1**, efetuou-se o isolamento da peçonha de *P. bistrata* inicialmente a baixa pressão (filtração em gel), e depois em CLAE (fase reversa e CLAE acoplado à espectrometria de massa). Um diagrama de fluxo resumindo as etapas de cromatografia, bem como as frações obtidas, encontra-se no item 5 (Resultados).

4.2.1 Preparo do extrato bruto da peçonha de *P. bistrata*

Sacrificaram-se as aranhas por congelamento a -20°C . Extraíram-se as glândulas e reservatórios de peçonha com o auxílio de pinça e tesoura oftálmicas. Em tubos de 1,5 mL, contendo 250 glândulas cada, adicionaram-se 250 μL de solução de acetato de amônio. Mantendo-se em ambiente de gelo, maceraram-se com pistilo de vidro as glândulas e reservatórios de peçonha, centrifugou-se a $8000 \times g$ por 5 min, 4°C , e retirou-se o sobrenadante de cada tubo. Repetiu-se por duas vezes (lavagem) o procedimento de extração descrito acima com os precipitados dos tubos. Filtrou-se o extrato aquoso bruto proveniente da união dos sobrenadantes em filtro com poro de

45 µm (Millipore) e liofilizou-se. Dissolveu-se o extrato bruto liofilizado em 5 mL de acetado de amônio (4°C), e aplicou-se na coluna de filtração em gel (Sephadex G-50).

4.2.2 Primeira e segunda cromatografias (filtração em gel G-50 e G-25)

Utilizou-se coluna de vidro de 200 cm x 2,2 cm, com resina Sephadex G-50 para filtração em gel, equilibrada com solução de acetado de amônio. Regulou-se o fluxo da fase móvel a 12 mL/h (4 °C, 3 mL por tubo) (Odell et al, 1994). Após a injeção de azul de dextrana, verificou-se que o volume de saída (*void*) correspondeu a 198 mL. Leu-se a absorvância do eluato em espectrofotômetro (280 nm). A cromatografia da peçonha bruta de *P. bistriata* em G-50 foi repetida duas vezes. Na primeira injetou-se o extrato bruto proveniente de 2250 glândulas, e na segunda, o extrato de 3250 glândulas.

Liofilizaram-se as frações de menor peso molecular (frações 6 a 10, vide Resultados) e cromatografaram-se estas frações em coluna filtração em gel Sephadex G-25 (68 cm x 1,5 cm, fluxo 20 mL/h, fase móvel idêntica à usada na G-50, 3 mL/tubo. Leu-se o eluato a 280 nm, e ensaiaram-se estas frações quanto às atividades anticonvulsivante e pró-convulsivante (protocolo I, Fig. 5).

4.2.3 Terceira e quarta cromatografias (em CLAE¹ com coluna de fase reversa e troca catiônica)

Liofilizou-se a fração, proveniente da cromatografia com G-25, que apresentou efeito pró-convulsivante (fração 7, vide Resultados) e recromatografou-se esta fração em CLAE (Shimadzu 10A) utilizando uma coluna de fase reversa ODS, *Jupiter*, *Phenomenex*, 150 x 4,8 mm, fluxo 1 mL/min). Como fase móvel utilizou-se solvente A: 0,1 % de ácido trifluoro acético (TFA) em água e B: acetonitrila 80 % + 0,09 % TFA em água. Liofilizaram-se e testaram-se as frações resultantes quanto à atividade pró-convulsivante.

Liofilizou-se a fração 7.1 proveniente da cromatografia anterior em CLAE e cromatografou-se esta fração em CLAE utilizando uma coluna de troca catiônica (*Shimadzu*, 70 X 4.8 mm, fluxo 1 mL/min). Como fase móvel usou-se o solvente A: acetato de amônio 0,02 M e B: acetato de amônio 2 M. Liofilizaram-se as frações resultantes.

A leitura do eluato foi fornecida em mV pelo CLAE, mas estes valores são proporcionais à leitura da absorvância em 280 nm.

O fluxograma completo da purificação da peçonha de *P. bistriata* encontra-se na Fig. 8 em Resultados.

¹ Realizada em colaboração com o Prof. Dr. Richard J. Ward (Setor de Bioquímica – Depto. Química da FFCLRP/USP)

4.2.4 Caracterização química parcial das frações obtidas

Para uma caracterização química parcial das frações isoladas, realizou-se a dosagem do teor protéico e de ácidos nucleicos, bem como o teste qualitativo de ninidrina, sensível à presença de aminoácidos e pequenos peptídeos.

4.2.4.1 Dosagem de proteínas

Verificou-se a concentração protéica das frações isoladas da peçonha utilizando o método de Lowry (1951), modificado por Hartree et al. (1972).

4.2.4.2 Estimativa da concentração de ácidos nucleicos

A porcentagem de ácidos nucleicos em uma solução protéica pode ser estimada a partir da razão entre a absorvância em 280 nm (A₂₈₀) e em 260 nm (A₂₆₀), comparando-se com tabela padronizada (Layne apud Boyer, 1993). Quanto maior a porcentagem de ácidos nucleicos na solução, menor a razão A₂₈₀/A₂₆₀, pois os ácidos nucleicos absorvem fortemente a luz ultravioleta (U.V.) no comprimento 260 nm, e os compostos protéicos absorvem mais em 280 nm (para revisão, veja Boyer, 1993). Leram-se a A₂₈₀ e A₂₆₀ das frações isoladas da peçonha de *P. bistrata*, e comparou-se a porcentagem de ácidos nucleicos.

4.2.4.3 Teste qualitativo de ninidrina das frações isoladas

O teste de ninidrina é classicamente utilizado no estudo de aminoácidos e de pequenos peptídeos. A presença de grupos amino terminais fornece, após a reação com a ninidrina uma cor azulada (Mccaldin, 1960; Boyer, 1993). Se o peptídeo contém alto teor do aminoácido prolina ou hidroxiprolina, a cor resultante é amarela (Mccaldin, 1960; Boyer, 1993). Substâncias contendo grupos imino com anéis de 6 ou 4 átomos, como por exemplo a baiquiaina (“*baikiain*”) e o ácido 2-azetidinocarboxílico, ao reagirem com a ninidrina, resultam em uma cor marrom (Mccaldin, 1959).

Aplicaram-se as frações isoladas no papel de filtro (Whatman, 3 MM), aspergiu-se uma solução de ninidrina saturada em acetona, colocou-se o papel em estufa (60°C) e observou-se a cor resultante. Como controle positivo para a reação, aplicaram-se diversas concentrações de glicina (2000 a 0,2 µg). Como controles negativos, aplicaram-se água deionizada e albumina bovina (1 mg/mL).

4.2.5 Cromatografias em CLAE com detector de matriz de diodos²

Submeteram-se as frações isoladas com efeito pró-convulsivante (fração 7 e seus derivados, vide Resultados) a CLAE com detector de matriz de diodos. Cromatógrafo: com coluna de fase reversa C18 (2,1 mm x 150 mm), solvente A: 0.1 % TFA; solvente B: 75% acetonitrila (ACN) dissolvido em A; fluxo: 0,4 mL/min; leitura do eluato com matriz de diodos (“diode array”) integrando as absorvâncias

entre 190 a 700 nm. Executou-se a cromatografia em duas condições: isocrática (1% de B) ou gradiente linear (1 a 95% de B em 30 min).

4.2.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da fração ativa

Submeteu-se a fração ativa (fração 7, vide Resultados) a experimentos de RMN em aparelho Bruker 500 MHz para a determinação estrutural do composto majoritário. Efetuou-se os experimentos mono (^1H) e bi-dimensionais: espectroscopia correlacionada (COSY ^1H - ^1H) e coerência quântica heteronuclear múltipla (HMQC).

Para os experimentos com RMN, a fração 7 foi dissolvida em metanol deuterado (CD_3OD).

4.3 A fração PbTx 2.2.1

A fração PbTx 2.2.1, usada nos protocolos I e II, foi isolada pelo dourando Renê O. Belebony (Depto. Bioquímica, FMRP-USP). Determinou-se a concentração desta fração arbitrariamente. O valor de uma unidade de absorvância em 215 nm foi definido como 1.000 unidades arbitrárias (U.A.). A solução estoque de PbTx 2.2.1 (1 mL) absorveu 2.05, logo ela corresponde a 2050 U.A. No protocolo II (Fig. 6) utilizaram-se 3 μL desta solução estoque, correspondendo então a 6,15 AU / rato de PbTx2.2.1.

² Realizada em colaboração com o Prof. Dr. Antônio Miranda (Depto. de Biofísica da UNIFESP/EPM). Atualmente estamos também em colaboração com o Prof. Dr. Norberto Peoporine Lopes (Depto. Química Orgânica da FCFRP-USP).

4.4 Atividade biológica das frações isoladas da peçonha de *P. bistriata* e da fração PbTx 2.2.1

Decidiu-se utilizar a via de administração i.c.v. para o teste de **H1** e **H2**, pois esta permite o acesso da neurotoxina injetada a grande parte do SNC do animal. Os detalhes do delineamento experimental para teste de **H1** e **H2** encontram-se nas Fig. 5 e 6 (protocolos I e II, respectivamente).

Protocolo I

Fig. 5. Protocolo I (para teste de **H1**), desenhado para verificar se as frações isoladas (frações 6 a 10, Sephadex G-50 e G-25) da peçonha de *P. bistriata* possuem efeito pró-convulsivante ou anticonvulsivante no modelo de injeção i.c.v. de bicuculina. A dose de bicuculina foi padronizada em nosso laboratório de forma a causar crises convulsivas em 100% dos animais controles. T/TC: presença de crises tônicas ou tônico-clônicas.

Protocolo II

Fig. 6. Protocolo II (para teste de **H2**), desenhado para verificar se a fração PbTx 2.2.1, injetada i.c.v em ratos, possui efeito anticonvulsivante no modelo de injeção i.c.v. de bicuculina. A dose de bicuculina foi padronizada em nosso laboratório de forma a causar crises convulsivas em 100% dos animais controles. T/TC: presença de crises tônicas ou tônico-clônicas.

4.5 Técnicas

4.5.1 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia

Confeccionaram-se as cânulas-guia a partir de agulha hipodérmica com 10 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro. Para a implantação das cânula-guia, anestesiou-se o rato com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.). Fez-se a tricotomia e imobilizou-se a cabeça do animal em um aparelho estereotáxico (*Stoelting, USA*). Injetou-se lidocaína/adrenalina subcutânea (2%, anestésico local), expõe-se o crânio do animal e executou-se a perfuração da calvária no ponto referente às coordenadas do ventrículo lateral (Tab. 2). Todas as coordenadas são referentes ao bregma, e foram obtidas segundo o atlas de Paxinos & Watson (1986).

Tab. 2. Coordenadas de microinjeção para o ventrículo lateral direito.

Local	A.P. (mm)	M.L. (mm)	D.V. (mm)
Ventrículo lateral	-1,0	-1,4	-3,4

A.P.: antero-posterior; M.L.: meso-lateral; D.V.: dorso-ventral.

Fixaram-se as cânulas-guia ao crânio utilizando-se dois pequenos parafusos de aço inoxidável e acrílico odontológico. Inseriu-se então um mandril (fio metálico) na cânula-guia, a fim de impedir sua obstrução até o momento do experimento. Após a cirurgia, aplicou-se antibiótico intramuscular (ampicilina e penicilina), e permitiram-se 5 dias de recuperação ao animal antes do experimento.

4.5.2 Injeção i.c.v

Para a microinjeção, imobilizou-se gentilmente o animal e introduziu-se a cânula de injeção através da cânulas-guia para o ventrículo lateral (protocolos I e II, Fig. 5 e 6). Injetou-se através de bomba de infusão (*Insight, BI2000, Brasil*), utilizando-se seringas Hamilton de 10 µL conectadas por um tubo de polietileno PE-10 à cânula de injeção. O volume de injeção de cada substância encontra-se nos protocolos I e II (Fig. 5 e 6). Após cada injeção, permitiram-se 30 s antes da retirada da cânula, para possibilitar a difusão da solução.

Após os experimentos, sacrificaram-se os animais com éter e executou-se perfusão transcardíaca com salina e paraformaldeído tamponados (ambos com tampão fosfato 0,05 mol/L + NaCl 0,075 mol/L pH 7,4). Após a perfusão, administraram-se 3 µL de azul de toluidina (i.c.v.). Removeram-se e congelaram-se os cérebros por 2h a -20°C, e então efetuaram-se manualmente cortes coronais para inspeção visual (verificando se o ventrículo do animal estava preenchido com o corante).

4.5.3 Teste de atividade de fosfatase ácida e alcalina

Embora os objetivos principais do presente trabalho envolvessem os componentes de baixo peso molecular, decidiu-se testar a fração da peçonha de *P. bistriata* que contém os componentes de alto peso molecular (fração 1, isolada através de Sephadex G-50, vide Resultados) quanto à atividade de fosfatase ácida e alcalina, em colaboração com a Prof. Dra. Maria de Lourdes Polizelli (Laboratório de Microbiologia, Depto. de Biologia da FFCLRP-USP).

Para a verificação da atividade de fosfatase, utilizou-se o método colorimétrico no qual o substrato fosfato de p-nitrofenila (p-NPP, incolor), caso tenha um fosfato clivado por reação enzimática, origina o produto colorido p-nitrofenol (p-NP). O surgimento do produto é monitorado por meio de absorvância em 410 nm.

Efetuaram-se as reações da seguinte forma: adicionaram-se 100 µL uma solução de 1 mg/mL da fração de interesse (fração 1), diluída em água deionizada em presença do p-NPP (diluído em 162 µL água,) e tampão (338 µL) Tris 100 mM pH 8,5 (para teste de fosfatase alcalina) ou acetato de sódio 100 mM pH 4,5 (ácida) à temperatura ambiente. Permitiram-se 7 h e 15 min de reação. Em outro protocolo, utilizaram-se 100 µL de uma solução 5,8 mg/mL da fração, a mesma concentração do substrato e tampão Tris 100 mM pH 7,4, incubados a 37 °C por 2h.

4.6 Drogas

Adquiriram-se todas as drogas utilizadas no presente estudo da empresa *Research Biochemicals International (Natick, MA, USA)*. As soluções foram preparadas no dia do experimento. Diluiu-se a bicuculina em salina tamponada (PBS; 0,05 mol/L, pH 7,4), e as demais drogas e peçonhas em água deionizada.

4.6.1 Bicuculina

Utilizou-se a bicuculina (sal de cloreto de metila) para causar crises convulsivas nos ratos em todos os protocolos. Doses: 9µg/3µL/rato para as injeções i.c.v. do protocolo I (Fig. 5); 9 µg/0,2µL/rato para as injeções i.c.v. do protocolo II (Fig. 6).

4.7 Filmagem, grupos controle e ambientação dos animais à arena teste

A arena consistiu em uma cuba de acrílico transparente (“*open field*”) de 60 cm de diâmetro e 30 cm de altura, localizada em sala isolada, com controle de temperatura, baixo ruído interno e iluminada por duas lâmpadas incandescentes brancas (60 W no teto e 25 W, 1 m acima da arena). Antes e depois de cada experimento, limpou-se a arena com álcool (70 e 5 %). Para as filmagens, utilizou-se câmera LG acoplada a um controlador de movimento (*Pan-tilter GAC-PT1- LG*), com direção e foco regulados pelo experimentador em sala anexa. Registrou-se a filmagem em video-cassete (*PANASONIC NV-HD635*), com fitas VHS.

Sempre antes de cada injeção, ambientou-se o animal por 15 min na arena teste. Retirou-se então o animal, procedeu-se com as injeções segundo o protocolo utilizado (I ou II) e retornou-se o rato para a filmagem de 30 min na arena.

4.8 Coleta, processamento dos dados e análise estatística.

A incidência de crises convulsivas foi avaliada nos animais, segundo o protocolo utilizado (I ou II). A presença ou ausência de crises, comparando os grupos controle e experimentais, foi averiguada quanto à significância estatística pelo Teste Exato de Fisher³. Este método é o mais adequado aos presentes protocolos pois ele compara, com grande rigor, a presença ou ausência de fatores em duas populações distintas ($n < 20$) (Bhattacharyya, 1977), fornecendo o valor da probabilidade (p) destes eventos estarem ocorrendo ao acaso. Consideramos as diferenças significativas quando $p < 0.05$. O teste consistiu na construção de matrizes quadradas, onde as linhas e colunas representavam os animais dos grupos controle e experimentais que apresentaram ou não as crises convulsivas, segundo exemplo da Tab. 3.

Neste exemplo, representa-se um grupo controle hipotético composto por 6 animais, onde 5 teriam apresentado crises convulsivas após determinado tratamento (Tab. 3). Neste caso, o grupo experimental também possui 6 animais, e apenas 1 destes teria apresentado crise após o mesmo tratamento dos controles. Este exemplo representa um suposto fenômeno de proteção contra crises convulsivas. Os valores de p são: bicaudal $p = 0,08$ ($p > 0,05$; não significativo), monocaudal $p = 0,04$ ($p < 0,05$;

³ O cálculo foi feito no site de domínio público <http://www.matforsk.no/ola/fisher.htm>

significante). Neste exemplo, a diferença entre o grupo controle e o experimental não seria considerada significativa segundo o teste bicaudal, mas seria significativa se considerado o teste monocaudal.

Tab. 3. Exemplo do cálculo estatístico realizado com o Teste Exato de Fisher.

	Presença de Crise	Ausência de Crise	Total
Grupo Controle	5	1	6
Grupo Experimental	1	5	6

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento da peçonha por filtração em gel (Sephadex G-50 e G-25) e teste pró-convulsivante e anticonvulsivante das frações isoladas

O fluxograma do isolamento da peçonha de *P. bistriata* encontra-se na Fig. 7 (A e B).

Fig. 7A . Fluxograma do isolamento da peçonha de *P. bistriata*. Acet. Amônio: 0,1 mol/L. Para teste da atividade biológica, diluíram-se as frações em água deionizada.

Fig. 7B . Fluxograma do isolamento da peçonha de *P. bistriata*. Acet. amônio: 0,1 mol/L. Para teste da atividade biológica, as frações foram diluídas em água deionizada.

A cromatografia do extrato bruto de 2250 (1ª G-50) e 3250 (2ª G-50) glândulas de *P. bistrata* por filtração em gel Sephadex G-50 com leitura da absorvância do eluato em 280 nm (Odell et al., 1994), resultou em 10 frações (Fig. 8). As frações foram denominadas fração 1 (tubos 84-89 para a 1ª G-50 e 80-93 para a 2ª G-50), fração 2 (102-109 e 94-107, respectivamente), fração 3 (110-125 e 108-122), fração 4 (126-144 e 123-137), fração 5 (154-176 e 166-180), fração 6 (190-234 e 201-245), fração 7 (235-252 e 246-263), fração 8 (253-269 e 264-279), fração 9 (270-284 e 288-293) e fração 10 (285-290 e 294-317).

Fig. 8. Isolamento do extrato bruto proveniente de 2250 (9/12/2000) e 3250 (26/11/2001) glândulas de veneno de *P. bistrata* em Sephadex G-50. As frações foram numeradas de 1 a 10. Fase móvel: acetato de amônio 0,1 mol/L. Fluxo: 12 mL/h; 3 mL/tubo.

Na Fig. 9, observamos o perfil cromatográfico em Sephadex G-50 (3ª G-50), nas mesmas condições anteriores, mas agora com 4000 glândulas. Nesta cromatografia, o eluato foi lido nas absorvâncias 220 e 280 nm. Fração 1 + fração 2 (tubos 81-108), fração 3 (109-124), fração 4 (125-140), fração 5 (163-183), fração 6 (208-240), fração 7 (241-263), fração 8 (264-278), fração 9 (279-286) e fração 10 (287-308).

Fig. 9. Isolamento do extrato bruto proveniente de 4000 (07/05/2002) glândulas de veneno de *P. bistrata* em Sephadex G-50. Leitura: A220 e A280. As frações foram numerados de 1 a 10. Fase móvel: acetato de amônio 0,1 mol/L.

O espectro de absorção em U.V. das frações 1 a 10 na 1ª, 2ª e 3ª G-50 tiveram como picos de absorvância os comprimentos de onda:

Fração 1: 232 nm e 277 nm (tubo 88), 235 nm e 277 nm (tubo 84), 238 nm e 277 nm (tubo 90), respectivamente. **Fração 2:** 226 nm e 280 nm (tubo 102), 229 nm e 280 nm (tubo 94), 229 nm e 280 nm (tubo 103). **Fração 3:** 226 nm e 277 nm (tubo

115), 266 nm e 277 nm (tubo 114), 232 nm e 277 nm (tubo 116). **Fração 4:** 220 nm e 277 nm (tubo 128), 220 nm e 277 nm (tubo 126), 223 nm e 280 nm (tubo 128).

Fração 5: 217 nm e 274 nm (tubo 162), 220 nm e 274 nm (tubo 171), 223 nm e 274 nm (tubo 172). **Fração 6:** 229 nm e 268 nm (tubo 214), 226 nm e 268 nm (tubo 223), 241 nm e 274 nm (tubo 225). **Fração 7:** 220 nm e 250 nm (tubo 243), 223 nm e 250 nm (tubo 252), 220 nm e 250 nm (249). **Fração 8:** 217 nm e 250 nm (tubo 260), 205 nm e 250 nm (tubo 267), 214 nm e 250 nm (tubo 268). **Fração 9:** 217 nm e 253 nm (tubo 277), 223 nm e 268 nm (tubo 293), 214 nm e 256 nm (tubo 282). **Fração 10:** 220 nm e 271 nm (tubo 286), 223 nm e 277 nm (tubo 301), 220 nm e 277 nm (tubo 299).

Após a confirmação do espectro de absorção em U.V., uniram-se as frações correspondentes (mesmo perfil de absorvância em U.V.), que foram liofilizadas e ressuspensas em 1,0 mL de água deionizada. Devido à baixa resolução dos compostos de menor peso molecular (frações 6 a 10, Fig. 8 e 9), uniu-se as frações 7 a 10. Foram aplicadas a fração 6 e as frações 7 a 10 em coluna de vidro com resina Sephadex G-25 (Fig. 10).

As frações foram eluídas nos seguintes tubos: cromatografia da fração 6: **Fração 6:** tubos 19 a 44. Cromatografia das frações 7 a 10: **Fração 6** (contaminante da Fração 7): tubos 25 a 33, absorvâncias máximas em 220 nm e 268 nm (lido no tubo 30); **Fração 7:** tubos 34 a 44, absorvâncias máximas em 223 nm e 250 nm (lido no tubo 39); **Fração 8:** tubos 45 a 52, 214 nm e 250 nm (lido no tubo 47); **Fração 9:** tubos 53 a 58, 214 nm e 253 nm (lido no tubo 55); **Fração 10:** tubos 59 a 74, 223 nm e 277 nm (lido no tubo 64).

Fig. 10. Isolamento das frações 6 e 7 a 10 em Sephadex G-25. Leitura: A280 nm. Este cromatograma mostra o resultado de dois perfis cromatográficos diferentes (para a fração 6 e para as frações 7 a 10).

Ensaíram-se as frações eluídas da coluna G-25 quanto à atividade pró-convulsivante e anticonvulsivante em ratos. Após a injeção i.c.v. da fração 6, 75% dos ratos apresentaram ataxia⁴ (Fig. 11). Diferentemente dos animais controle, a injeção i.c.v. de bicuculina 10 min depois da fração 6 não produziu crise em todos os ratos, caracterizando um efeito anticonvulsivante desta fração. Observou-se proteção em 37,5 % dos animais (Fig. 11). A injeção prévia da fração 6 também diminuiu a morte em 50% dos animais injetados com bicuculina (Fig. 11).

⁴ Dificuldade de locomoção

Observou-se que todos os ratos injetados i.c.v. com a fração 7 apresentaram uma “fuga explosiva”, bem como vocalização, piloereção e exoftalmia, caracterizando um efeito pró-convulsivante desta fração (Fig. 11). Nenhum dos ratos injetados com as frações 8 e 10 apresentaram efeitos pró-convulsivante ou anticonvulsivante (Fig. 11). Não se ensaiou a fração 9 (perdida durante a liofilização).

Fig. 11. Injeção i.c.v. em ratos das frações: 6 (n=8); 7 (n=5); 8 (n=6) e 10 (n=5). **Ataxia:** animais com ataxia; **crise/peçonha:** animais com crises convulsivas em decorrência da injeção da peçonha; **crise/bicu:** animais com crises convulsivas em decorrência da injeção de bicuculina; **mortes/bicu:** mortes em decorrência da injeção de bicuculina; **salina:** salina 0,9% tamponada com fosfato 0,05 M, pH 7.4. As frações foram dissolvidos em água deionizada. * : p<0.05; ** : p<0.01, teste exato de Fisher. Os valores representam a porcentagem de animais dentro de cada grupo.

5.2 Cromatografia da fração 7 em CLAE (fase reversa e troca catiônica) e teste pró-convulsivante das frações 7.1 a 7.6

A cromatografia da única fração que causou crises convulsivas nos ratos (fração 7, Fig. 11), na coluna de fase reversa resultou em um cromatograma com 6 frações, denominados 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5 e 7.6, eluídos em 1,95; 2,52; 3,12; 20,0; 20,3 e 27,3 min respectivamente (Fig. 12). A absorvância do eluato em 220 nm correspondeu sempre a absorvância em A280 (dados não mostrados).

Fig. 12. Perfil cromatográfico da fração 7 em CLAE utilizando-se coluna analítica de fase reversa. O eixo das ordenadas contém valores proporcionais à absorvância em 280 nm, mas fornecidos pelo computador em voltagem. Fluxo: 1 mL/min.

Após a liofilização, as frações 7.1 a 7.6 foram ressuspensas em 60 µL de água deionizada, e injetadas i.c.v. em ratos. Apenas a fração 7.1 provocou as crises convulsivas (em todos os 4 animais testados) já descritas para a fração 7 no item anterior. As crises causadas pela fração 7.1 foram mais severas do que as da fração 7. Os animais chegaram a exibir, além das corridas, crises tônico-clônicas.

A cromatografia da fração 7.1 na coluna de troca catiônica resultou em 4 frações, denominadas 7.1.1; 7.1.2, 7.1.3 e 7.1.4, eluídas em 3,3; 3,9; 4,3 e 4,9 min respectivamente (Fig. 13).

Fig. 13. Cromatograma obtido a partir da fração 7.1 em CLAE utilizando-se uma coluna de troca catiônica. O eixo das ordenadas contém valores proporcionais à absorvância em 280 nm, mas fornecidos pelo computador em voltagem. Realizou-se uma injeção de 10 μ L da fração 7.1 + 40 μ L de solução A. Fase móvel: gradiente linear iniciado aos 4 min, de 100% da solução A (tampão acetato de amônio 0,02M, pH 5,6) para 100% de B (tampão acetato de amônio 2,0 mol/L, pH 5,6) em 30 min. Fluxo: 1mL/min

5.3 Teste qualitativo de ninidrina

As frações de 1 a 10 (cromatografia em Sephadex G-50, Fig. 8) reagiram de forma diferente quando expostas à ninidrina (Fig. 14). As frações 1, 2, 3 e 6, bem como a PbTx 2.2.1 apresentaram cor azulada muito semelhante à glicina, usada como padrão (Fig. 14). As frações 4, 5 e 10 apresentaram cor azulada, mas muito fraca em relação aos demais. As frações 7 e 8, bem como a fração 7.1, também reagiram positivamente à ninidrina, mas exibiram uma cor marrom (Fig. 14M a 14P).

Nem a albumina (1 mg/mL) nem água deionizada (controle) foram positivas no teste com a ninidrina (Fig. 14Q e 14R).

Fig. 14. Teste de ninidrina para as frações isoladas da peçonha de *P. bistrata*. **A**, glicina 2000 μg ; **B**, glicina 200 μg ; **C**, glicina 20 μg ; **D**, glicina 2 μg ; **E**, glicina 0,2 μg ; **F**, glicina 0,02 μg ; **G**, fração 1; **H**, fração 2; **I**, fração 3; **J**, fração 4; **K**, fração 5; **L**, fração 6; **M**, fração 7; **N**, fração 8; **O**, fração 10; **P**, fração 7.1; **Q**, albumina; **R**, água; **S**, PbTx 2.2.1. Notar a gradação de tons azuis da glicina (padrão), muito semelhante às frações 1(**G**), 2 (**H**), 3 (**I**), 6 (**L**), 10 (**O**) e PbTx 2.2.1 (**S**). As frações 7 (**M**) e 8 (**N**), bem como a fração 7.1 (**P**), apresentaram uma cor marrom. Volume aplicado no papel: **A a F**: 10 μL ; **G a O**: 20 μL ; **P a S**: 5 μL .

5.4 Determinação da concentração protéica e leitura da absorvância em 260 e 280 nm das frações isoladas da peçonha de *P. bistrata*

A dosagem protéica bem como a determinação do teor aproximado de ácidos nucléicos das frações encontram-se na Tab. 1. Observa-se que as frações 1, 2, 3 e 6 apresentaram alta concentração protéica e baixo teor de ácidos nucléicos. As frações 4 e 5, apesar da baixa concentração protéica, continham por este método baixo teor de ácidos nucléicos. Já as frações 7, 8 e 10, assim como as frações 7.1.1 a 7.1.4 mostraram-se o inverso: baixa concentração protéica e alto teor de ácidos nucléicos, o que pode ser observado pela razão entre A280/A260 nm (Tab. 4).

Tab. 4. Concentração protéica e estimativa do teor de ácidos nucleicos das frações isoladas da peçonha de *P. bistrata*

Fração isolada	A280	A260	A280/A260	Teor de ácidos nucleicos (%)	[] de proteínas (mg/mL)
1	0,299	0,301	0,993	3,2	17
2	0,013	-	ND	ND	7
3	0,039	0,032	1,22	1,7	15,6
4	-	-	-	-	2,8
5	0,951	0,835	1,14	2,46	3,2
6	0,774	0,746	1,04	3	14,8
7	0,045	0,102	0,44	> 20	0,98
8	0,014	0,079	0,18	>>20	0,11
10	2,132	1,705	1,25	1,5	-
7.1.1	-	-	ND	ND	ND
7.1.2	0,022	0,054	0,41	>20	ND
7.1.3	0,001	0,036	0,03	>>20	ND
7.1.4	0,001	0,056	0,02	>>20	ND

Frações 1 a 10: segundo cromatografia Fig. 1. **Frações 7.1.1 a 7.1.4:** segundo cromatografia Fig. 13. **A280 e A260:** valor da absorvância da amostra em 280 nm e 260 nm, respectivamente. -: zero. ND: não determinado.

5.5. Cromatografia das frações com atividade pró-convulsivante em CLAE com detector de matriz de diodos e CLAE-MS

A fração que apresentou atividade pró-convulsivante (fração 7, apresentada no perfil da Fig. 10), sua subfração com o mesmo efeito biológico (fração 7.1, perfil na Fig. 12) bem como os quatro componentes após recromatografia da fração 7.1 (frações 7.1.1, 7.1.2, 7.1.3 e 7.1.4, perfil na Fig. 13), foram injetados em CLAE com detector de matriz de diodos acoplados a um espectrômetro de massa em série. Como consequência deste acoplamento, há um pequeno retardo (entre 0,03 e 0,16 min) entre a detecção do CLAE (Fig. 15) e a do espectrômetro (Fig. 19).

5.5.1 Resultados da injeção das frações 7, 7.1 e 7.1.1-7.1.4 em CLAE/fase reversa com detecção de matriz de diodos

A injeção da fração 7 em CLAE/fase reversa (isocrático, 1% do solvente B) resultou no cromatograma da Fig. 15A. Note-se que os componentes predominantes eluíram nos tempos 1,08; 1,48 e 4,05 min (Fig. 15A). Já a injeção da fração 7.1, nas mesmas condições, resultou em um cromatograma com predominância dos compostos eluídos a 1,08 e 1,46 min (Fig. 15B). Tal fato sugere que os compostos pró-convulsivantes da fração 7 e 7.1 encontram-se nos picos com 1,08 ou 1,46 min de tempo de retenção, nestas condições cromatográficas.

Fig. 15. Injeção das frações 7 (A) e 7.1 (B) em CLAE /fase reversa, com detector de matriz de diodos. Notar que na fração 7.1 houve uma redução do material eluído em 4,04 min. A ordenada representa a porcentagem relativa dos componentes (normalizada). O detector integrou as absorvâncias de 190 a 700 nm.

Após a injeção da fração 7.1.1 na mesma condição isocrática, pode-se ver o predomínio (em porcentagem) do material com 1,07 min de tempo de retenção (Fig. 16A). Já para a fração 7.1.2, observa-se compostos eluindo aos 1,03 e 1,51 min (Fig. 16B). Tempos de retenção semelhantes também são vistos no cromatograma da fração 7.1.3 (1,1 e 1,49 min, Fig. 16C). A fração 7.1.4, cromatografada nas mesmas condições, teve predomínio de compostos com tempo de retenção de 1,51 min, embora possua também menor quantidade de componentes com 1,09 min de retenção (Fig. 16D).

Fig. 16. Injeção das frações 7.1.1 (A), 7.1.2 (B), 7.1.3 (C) e 7.1.4 (D) em CLAE /fase reversa, com detector de matriz de diodos. Notar que os componentes eluídos em 1,5 min crescem de A a D, enquanto ocorre o inverso com os eluídos em 1,10 min. A ordenada representa a porcentagem relativa dos componentes (normalizada). O detector integrou as absorvâncias de 190 a 700 nm.

Pode-se perceber claramente que as frações 7.2 e 7.3 (sem o efeito pró-convulsivante), contém componentes com tempos de retenção maiores (3,99 e 4,87 min, respectivamente), Fig. 17A e 17B.

Fig. 17. Injeção das frações 7.2 (A), 7.3 (B) em CLAE /fase reversa, com detector de matriz de diodos. Notar o predomínio dos componentes eluídos após os 4 min. A ordenada representa a porcentagem relativa dos componentes (normalizada). O detector integrou as absorvâncias de 190 a 700 nm.

O espectro de absorção dos componentes da fração 7.1 eluídos nos tempos 1,047 min e 1,480 min encontram-se na Fig. 18 A e B, respectivamente.

Fig. 18. Espectro de absorção dos componentes da fração 7.1 com tempo de retenção de 1,047 min (A) e 1,480 min (B) em CLAE /fase reversa, com detector de matriz de diodos. Notar que em (A) só aparece absorvância na região de 220 nm, e em (B) vê-se absorvância também nos comprimentos de onda em torno de 260 nm. A ordenada representa a porcentagem relativa da absorvância (normalizada). Em nenhum dos casos observou-se absorvância em comprimentos de onda maiores que 300 nm. Comparar com Fig. 15 B

5.5.2 Espectrometria de massa das frações ativas (7 e 7.1) em CLAE/fase reversa-MS, condições isocráticas

Dos componentes da fração 7 identificados pelo detector de matriz de diodos (Fig. 15A), apenas aqueles com menor tempo de retenção (próximo a 1,08 min, Fig. 15 A) estavam em concentração suficiente para serem detectados no espectro de massa (1,24 min, Fig. 19 A). Os compostos com tempo de retenção no CLAE ligeiramente maior (1,48 min, Fig. 15 B) não estavam em quantidade relativa suficiente para detecção no espectro de massa (Fig. 19 A). O mesmo fenômeno pôde ser observado com os componentes da fração ativa 7.1. No espectro de massa, verificou-se apenas a presença do material eluído em 1,11 min (Fig 19 B).

Fig. 19. Detecção dos componentes das frações 7 (A) e 7.1 (B) pelo espectrômetro de massa. Comparar com as Fig. 15 e 18. Apenas os primeiros componentes eluídos das frações 7 e 7.1 (Fig. 15 e 18) apareceram no espectro de massa da presente figura. A ordenada representa a porcentagem relativa dos componentes (normalizada). A abcissa e os números sobre os picos representam o tempo levado pelo composto para ser detectado pelo espectrômetro, contado a partir do instante de injeção no CLAE.

5.5.3 Elucidação estrutural da substância majoritária da fração 7 por RMN

A elucidação estrutural da substância inosina (Fig. 20) foi feita com base em espectros de RMN mono (^1H) e bi-dimensionais (COSY ^1H - ^1H e HMQC) e espectrometria de massa (EM-ESI). Estes espectros (Tab. 5; anexos D, E e F), obtidos para a fração 7, permitiram a identificação da substância inosina como parte da mistura desta fração.

Fig. 20. Estrutura química da substância inosina, identificada na Fração 7 por RMN.

No espectro de RMN ^1H desta fração, através da análise de integrais, é possível identificar os sinais relativos a uma das substâncias desta mistura, os quais integram todos para um hidrogênio. Posteriormente, estes sinais identificados foram confirmados pelos espectros de COSY ^1H - ^1H e HMQC.

Analizando-se os sinais referentes a esta substância no espectro de RMN ^1H , nota-se inicialmente dois singletos em δ 8,38 e δ 8,11, característicos dos

hidrogênios aromáticos de nucleosídeos, e que foram atribuídos aos hidrogênios H 8 e H 2, respectivamente.

Observa-se também neste espectro a presença de um dubleto em δ 6,06, que foi atribuído ao hidrogênio anomérico (H 1') de uma unidade de ribose em conformação β , a qual pode ser deduzida pela constante de acoplamento de 5,5 Hz. O alto deslocamento químico deste sinal, indica que a ribose se liga à aglicona através de um nitrogênio, isto é, se trata de um *N*-glicosídeo. O deslocamento químico esperado para uma ribose *C*-glicosídica seria em torno de δ 5,1. Os demais sinais da unidade de ribose se encontram na região entre δ 3,7 e δ 4,7 e apresentam essencialmente os mesmos deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos descritos na literatura.

Por meio do experimento COSY ^1H - ^1H , foi possível individualizar os sinais relativos aos hidrogênios hidroximetínicos da ribose. Partindo-se do sinal referente ao hidrogênio anomérico (H 1'), pode-se ver sua correlação com o hidrogênio H 2'; partindo-se de H 2', observa-se sua correlação com H 3' e assim por diante, atribuindo-se assim os sinais dos hidrogênios da unidade de ribose.

Através do experimento HMQC, que mostra a correlação ^{13}C - ^1H , foi possível obter os deslocamentos químicos dos carbonos C 2, C 8 e de cada carbono da ribose individualmente.

No espectro de massas obtido para a fração, foi observado o íon quase-molecular $[\text{m-H}]^-$ 267, que é condizente com o esperado para a substância inosina. (dados não mostrados).

A análise dos dados espectrométricos em conjunto, e sua comparação com dados da literatura (Gatlin & Davis, 1962; Nakanishi, 1990), confirmou que a substância em questão se trata do nucleosídeo inosina.

TAB. 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância inosina (CD_3OD)

^1H		^{13}C
	d (ppm) [integral ; multiplicidade ; J (Hz)]	d (ppm)
Aglicona		
2	8,11 [1H ; s]	147,8
8	8,38 [1H ; s]	141,8
ribose		
1'	6,06 [1H ; d ; $J=5,5$]	91,2
2'	4,67 [1H ; t ; $J=5,0$]	76,7
3'	4,37 [1H ; t(l) ; $J=4,5$]	72,8
4'	4,18 [1H ; d(l) ; $J=3,0$]	88,2
5'A	3,90 [1H ; dd ; $J_{5',\text{A-}4'}=3,0$; $J_{5',\text{A-}5',\text{B}}=12,5$]	63,6
5'B	3,79 [1H ; dd ; $J_{5',\text{B-}4'}=3,0$; $J_{5',\text{B-}5',\text{A}}=12,5$]	63,6

RMN ^1H em 500 MHz; dados de ^{13}C obtidos a partir de experimento HMQC

Os resultados de RMN da Fração 7 apontaram presença de grande quantidade de acetado na amostra (dados não mostrados).

Os ensaios de RMN não foram efetuados para as frações 7.1 e seus derivados (7.1.1 a 7.1.4) pois estas frações foram destruídas durante os experimentos de espectrometria de massa.

5.6 Teste i.c.v. da toxina PbTx 2.2.1 (protocolo II)

A injeção de bicuculina i.c.v. (segundo o protocolo II) provocou crises tônico-clônicas em 100% dos animais do grupo controle (n=11). Ainda no grupo controle, 9 dos 11 animais morreram em consequência das crises.

Já no grupo experimental dos animais que receberam a fração PbTx 2.2.1 antes da bicuculina, 71,4 % não apresentaram crises e apenas 28,6% morreram. Os resultados deste protocolo estão na Tabela 5. Estes resultados apontam para um efeito anticonvulsivante da fração PbTx 2.2.1.

Tab. 6. Efeito do pré-tratamento com PbTx 2.2.1 i.c.v. na expressão de crises convulsivas causadas pela posterior injeção i.c.v. de bicuculina (protocolo II)

Bicuculina i.c.v.				
(após 20 min)				
Grupo	Crise	Não crise	Mortes	Total
Veículo (água deionizada)	11 (100%)	0	9 (81,1%)	11
PbTx 2.2.1	2 (28,6%)	5** (71,4%)	2** (28,6%)	7

CRISE: número de animais que apresentaram crises tônico-clônicas após a bicuculina i.c.v.; NÃO-CRISE: número de animais que não apresentaram crises tônico-clônicas após a injeção de bicuculina; MORTES: número de animais mortos, num período de 24 h após a injeção i.c.v. de bicuculina. TOTAL: número total de animais de cada grupo; Os número entre parênteses representam a porcentagem de animais. **: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), teste exato de Fisher (bicaudal).

5.7 Teste da atividade de fosfatase ácida e alcalina da fração 1

Ao incubar-se a Fração 1 (Sephadex G-50, Fig. 9) em presença do substrato p-NPP, observou-se uma cor amarela correspondente à formação do produto p-NP tanto em pH 4,5 quanto 8,5, caracterizando atividade de fosfatase ácida e básica (tempo de reação: 7h e 15 min; Fig. 21A). Também em pH 7,4, e temperatura 37 °C, a Fração 1 apresentou atividade de fosfatase (Fig. 21B). A incubação do substrato sozinho nas mesmas condições de temperatura e pH não resultaram em degradação espontânea (dados não mostrados).

Fig. 21. Atividade de fosfatase da fração 1. O eixo das ordenadas contém valores da absorvância em 410 nm. **A.** Atividade de fosfatase ácida (pH 4,5; n=2) e básica (pH 8,5; n=2); concentração da peçonha: 100 μ L de uma solução 1 mg/mL; temperatura: ambiente; tempo de reação: 7h e 15 min.

*: $p < 0,05$, t de Student não-pareado, bicaudal. Nos controles substituiu-se a peçonha pelo mesmo volume de tampão. **B.** Ensaio realizado com 100 μ L de uma solução 5,8 mg/ml da fração, a 37 °C, pH 7,4.

6. DISCUSSÃO

6.1 Isolamento de compostos pró-convulsivantes da peçonha de *P. bistrata*

6.1.1 A fração 7 e seus derivados

No presente trabalho descreveram-se duas frações parcialmente isoladas com efeito biológico pró-convulsivante: a fração 7 e seu derivado 7.1.

A ninidrina reage com os aminoterminais livres de aminoácidos resultando no composto azulado chamado púrpura de Ruheman (Mcaldin, 1960; Voet & Voet, 1995). As colorações das frações 7 e 7.1 (Fig. 14M e 14P) no teste de ninidrina não foram azuladas como ocorreu com a glicina (Fig. 14 A a F), mas marrom (Fig. 14M e 14P). Estes resultados sugerem que talvez a fração 7 e a fração 7.1 contenham prolina ou hidroxiprolina, ou então grupos imino (McCaldin, 1960). No entanto, a conclusão mais segura é que as frações apresentam grupos nitrogenados, já que foram positivas para o teste com ninidrina.

Os experimentos qualitativos usando ninidrina permitem ainda concluirmos que a fração 7 não é composta por proteínas de alto peso molecular pois, se isto ocorresse, o número de aminoterminais livres para a reação seria pequeno se comparado à massa da proteína e o teste seria negativo, como observou-se para a albumina (Fig. 14 Q). Também a dosagem protéica mostrou que a fração 7 e os componentes da fração 7.1 (7.1.1 a 7.1.4) possuem quantidades quase indetectáveis de proteínas (Tab. 4). Complementando a afirmativa de que a fração 7 e seus derivados não apresentam caráter protéico, estas frações apresentam elevado teor de

ácidos nucléicos (Tab. 4). Também as tentativas de se realizar eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS), foram infrutíferas. Mesmo empregando-se a coloração com prata, o método mais sensível que revela ligações peptídicas, nenhuma banda apareceu para a fração 7 (dados não mostrados).

Acreditamos que a fração 7 apresenta alto teor de ácidos nucléicos (Tab. 4) mas provavelmente não contém DNA nem RNA. Esta fração, em contato com brometo de etídeo⁵ (corante específico para DNA ou RNA), não exibiu fluorescência em luz U.V., o que ocorreria com pequenas concentrações de polímeros de nucleotídeos (dados não mostrados). O isolamento da fração 7 em filtração em gel demonstrou que esta não se encontra entre os compostos de maior peso molecular da peçonha (Sephadex G-50, Fig. 8 e 9, cujos poros permitem a retenção de compostos menores de 30000 Da – Voet & Voet, 1995), tendo inclusive ficado retida na filtração em gel com resina G-25 (Fig. 10, com poros que retém compostos menores que 5000 Da, Voet & Voet, 1995).

De fato, os experimentos com RMN demonstraram que o componente majoritário da fração 7 é o nucleosídeo inosina (Fig. 20). Na peçonha da aranha *L. menavodi* (Fig. 2), também Horni et al. (2001) descreveram a presença de inosina e outros ácidos nucléicos. O mesmo grupo cita também que a absorvância em U.V. foi usada como técnica auxiliar para demonstrar que haviam sido isolados nucleosídeos na peçonha daquela aranha.

Caso o composto ativo da fração 7 seja mesmo a inosina, qualquer tentativa de se explicar o seu mecanismo de ação ainda seria prematura. Novos experimentos seriam necessários para averiguar seu efeito sobre receptores ou transportadores de

⁵ Observado em gel de poliacrilamida, realizado no laboratório da Profa. Dra. Maria Helena Goldman – Depto. Biologia – FFCLRP/USP

aminoácidos excitatórios e inibitórios, ou sobre canais iônicos. A única descrição sobre o mecanismo de ação dos nucleosídeos presentes em peçonhas de aranhas, cita que estes compostos seriam antagonistas de RCANATO, e possivelmente úteis na proteção contra morte neuronal em isquemia (McCormic et al, 1999 e Meinwald apud Friedlander, 1999). Há relatos na literatura de que diversos nucleosídeos e agonistas de seus receptores possuem efeitos anticonvulsivantes em mamíferos (Moreau & Huber, 1999; Lara et al, 2001). Já os antagonistas dos receptores de adenosina, por exemplo, são pró-convulsivantes (De Sarro, et al, 1999). A estrutura molecular dos antagonistas dos receptores de adenosina contém também bases púricas e pirimídicas, à semelhança dos nucleosídeos (Williams & Jarvis, 2000). Logo, uma possível explicação é de que a inosina talvez pudesse estar agindo como antagonista de receptores de nucleosídeos, como por exemplo dos receptores de adenosina tipo A_{2A} .

6.1.2 Experimentos com CLAE, CLAE/matriz de diodos e CLAE-MS da fração 7 e derivados

Os compostos biologicamente ativos da fração 7 não ficam retidos em coluna de fase reversa nem em troca catiônica, pelo menos nas condições em que realizamos nossos experimentos (Fig. 12, 13 e 15). O (s) composto (s) pró-convulsivante (s) provavelmente encontra(m)-se entre os de 1,08 min e 1,48 min de tempo de retenção (Fig. 15). No entanto, suspeitamos que os compostos com 1,08 min de tempo de retenção correspondam ao acetado contaminante, já que a varredura de absorvância U.V. deste pico não mostra nenhum fragmento aromático, absorvendo somente em

torno dos 220 nm (Fig. 18A). Já os compostos da fração 7 com tempo de retenção de 1,48 min em CLAE apresentam na varredura U.V. absorvância em 260 nm, que aliás é maior do que a absorvância em 280 nm (Fig. 18B). Suspeitamos que tais picos (1,48 min, Fig. 15 A e B e Fig. 18B) podem corresponder a inosina. Os espectros de massa obtidos no CLAE-MS precisam ser refeitos, pois tanto a fração 7.1 quanto seus derivados 7.1.1 a 7.1.4 estavam em quantidades insuficientes para que o sinal fosse maior que o ruído (dados não mostrados).

Acreditamos que o efeito pró-convulsivante não esteja relacionado à presença do acetato, pois os ratos injetados i.c.v. com as outras frações (6, 8 e 10, Fig. 11) que sofreram rigorosamente o mesmo tratamento que a fração 7 não apresentaram crises convulsivas. De fato, a fração 6 teve efeito anticonvulsivante.

6.2 Efeito anticonvulsivante *in vivo* da toxina PbTx 2.2.1

A injeção de bicuculina i.c.v. (segundo o protocolo II) causou crises tônico-clônicas em todos os animais do grupo controle (n=11). Ainda no grupo controle, 9 dos 11 animais morreram após as crises. Já no grupo experimental, os animais que receberam a fração PbTx 2.2.1 antes da bicuculina não apresentaram crises nem mortes (71,4%, Tab. 6), demonstrando efeito anticonvulsivante *in vivo*. Talvez a PbTx 2.2.1 esteja possibilitando determinados alvos (sítios) a contrabalancear o efeito convulsivo do antagonismo GABAérgico. Estes resultados reforçam aqueles obtidos nos experimentos com sinaptosomas isolados do córtex de rato por (Fontana 1997, 2001; Beleboni, 2000), onde esta toxina é capaz de inibir a captação do

GABA. Este aumento de GABA poderia, em tese, deslocar o antagonista competitivo (bicuculina) dos receptores GABA_A, e desta forma impedir as crises convulsivas.

6.3 Discussão sobre o método proposto para isolamento de compostos pró-convulsivantes não-protéicos da peçonha de *P. bistriata*

O método proposto no presente trabalho (Sephadex G-50, Sephadex G-25, CLAE/fase reversa e CLAE/troca catiônica) pode ser melhorado. Este método possui algumas vantagens, como por exemplo: a não destruição e o fracionamento parcial simultâneo de compostos protéicos e de alto peso molecular durante a purificação. O preparo do extrato e a filtração em gel são realizados a baixa temperatura e condições não-desnaturantes o que permite, pelo menos em tese, que os compostos macromoleculares sejam coletados com atividade biológica. O método de obtenção da fração PbTx 2.2.1 (Fontana, 1997; Beleboni, 2000 e Fontana, 2001), por exemplo, emprega a fervura do extrato bruto da peçonha de *P. bistriata* para a eliminação dos componentes de alto peso molecular, e os desperdiça. Não se sabe ainda a composição exata e completa da peçonha desta aranha. Como exemplo, verificamos no presente trabalho a presença de pelo menos uma (e talvez duas) enzimas com atividade de fosfatase (Fig. 21). Não se testou as frações de maior peso molecular (frações 1 a 5 preparadas pela filtração em gel G-50, Fig. 8 e 9) quanto a outros efeitos biológicos. É possível que estas frações contenham enzimas tais como: proteases, fosfolipases, hialuronidases, cininases entre outras.

No entanto, o presente método possui desvantagens: é relativamente lento e trabalhoso e usa na fase móvel o sal acetato de amônio em um pH em que ele não é

tampão (pH 7,0). Este sal também contaminou a amostra com acetato. Para a retirada do acetato, deve-se acidificar a amostra, de forma que pH fique menor que o pK do ácido acético (pH em torno de 3,7), o que desloca o equilíbrio químico para a formação do ácido acético que é volátil (Dra. Mariana S. Araújo, comunicação pessoal; Fig. 22; também Voet & Voet, 1995). No entanto, quando se estiver trabalhando com uma amostra desconhecida, é impossível prever os efeitos de um abaixamento tão drástico do pH.

Fig. 22. Representação esquemática dos equilíbrios químicos presentes ao se utilizar o sal acetado de amônio. Este sal possui duas ações tamponantes: se utilizado num pH dentro da faixa do primeiro pK (o do ácido acético, que varia de pH 3,7 a pH 5,7) ou do segundo pK (o do amônio, pH 8,3 a pH 10,3). Para não deixarmos a amostra com contaminantes, deve-se alterar o pH e então liofilizá-la. Se o pH estiver em torno de 10,3, praticamente todo o amônio estará na forma de amônia que é volátil. Mas, se o pH for acidificado para 3,7, praticamente todo o acetado estará na forma de ácido acético que também é volátil. No entanto, caso não queiramos variar muito o pH da amostra, ou então desejamos uma solução com capacidade tamponante em pH 7,0, o acetato de amônio não é indicado. (Veja também Voet & Voet, 1995).

O uso do acetado de amônio, porém, pode ser justificado em parte devido a algumas dificuldades inerentes ao próprio objetivo da purificação: obter os compostos de baixo peso molecular (< 1000 Da). Tal fato impede o uso de outros sais comumente usados durante a purificação protéica como o sulfato de amônio, que requerem diálise para serem retirados da amostra. Ao se trabalhar com compostos muito pequenos, corre-se o risco destes compostos serem dializados junto com o referido sal. A presença de pequenas concentrações de sal na fase móvel permite uma melhor solubilização de proteínas (“*salting in*”). Logo, o uso de água deionizada não é muito indicado.

Em novos isolamentos de compostos de baixo peso molecular presentes na peçonha da aranha *P. bistriata*, alteraremos algumas características do método a fim de otimizá-lo. Por exemplo, tentaremos a extração com metanol 50% em água. Tal solvente possui baixa constante dielétrica e precipita algumas proteínas, mas a fração 7 mostrou-se muito solúvel em metanol (os experimentos de RMN foram realizados em 100% CD_3OD) em ambiente de gelo. O metanol pode ser facilmente retirado em secagem com jato de ar, sem a necessidade de acidificar muito a amostra. Este extrato metanólico poderia ser utilizado em uma ultrafiltração com o gás nitrogênio, em uma câmara cujo fundo repousa uma membrana semipermeável específica para permitir a passagem de substâncias de peso moleculares menores de 1.000 Da (por exemplo, a *YMI NMWL* da *Millipore* com tecnologia *Amicon*). Desta forma, o conteúdo do não filtrado (compostos maiores que 1.000 Da) pode ser recuperado, e teríamos rapidamente o conjunto das moléculas pequenas presentes na peçonha. Este filtrado pode ser então ensaiado diretamente em CLAE, e obteríamos um isolamento com elevada eficiência.

6.4 Isolamento de outros compostos biologicamente ativos da peçonha de *P. bistriata*

No presente trabalho obteve-se também outra fração com efeito biológico, mas anticonvulsivante (fração 6).

À semelhança da fração PbTx 2.2.1 (Tab. 4), a fração 6 protegeu os ratos contra as crises provocadas pela bicuculina i.c.v. (Fig. 11). O experimento com ninidrina revelou outra semelhança: ambos apresentaram cor azulada (Fig. 14S e 14L), o que é esperado para aminoácidos ou peptídeos pobres em prolina. Dados preliminares com espectrometria de massa e CLAE com matriz de dióxido de sílica aparentemente apontam que o composto ativo presente na fração 6 corresponde à PbTx 2.2.1., mas tal afirmação ainda necessita de confirmação.

No presente trabalho também descrevemos a presença de atividade de fosfatase na peçonha de *P. bistriata*. Esta atividade, presente em condições fisiológicas (pH 7,4 e 37°C, Fig. 21B) provavelmente pode ser explorada tanto na purificação da (s) enzima (s) presente (s) na fração 1 quanto aos seus efeitos sobre o S.N.C. de mamíferos. Atualmente, sabe-se que o processo de inserção (quinase) e retirada (fosfatase) de grupos fosfato em proteínas, receptores, transportadores e canais iônicos altera substancialmente o funcionamento desses elementos, e relaciona-se com vários processos fisiopatológicos como doenças neurodegenerativas, processos alérgicos, controle de rejeição de órgãos, infecções bacterianas e coagulação sanguínea (Redegeld et al., 1999).

7. CONCLUSÕES

7.1 Conclusões

1. A peçonha de *P. bistrata* possui uma fração (fração 7) com efeito pró-convulsivante quando injetada i.c.v. em ratos. Nesta fração, aparentemente o composto majoritário é o nucleosídeo inosina. A peçonha da mesma aranha possui também uma fração com atividade anticonvulsivante (fração 6) e outra com atividade de fosfatase ácida e alcalina (fração 1).
2. O método cromatográfico proposto no presente trabalho pode ser otimizado, talvez através do uso de ultrafiltração;
3. A fração PbTx 2.2.1 possui efeito anticonvulsivante *in vivo*, no modelo de indução de crises convulsivas pela injeção de bicuculina i.c.v.

7.2 Perspectivas futuras

No presente trabalho, iniciou-se o isolamento e caracterização de uma fração com efeito pró-convulsivante (fração 7) cujo principal constituinte é a inosina. Mas, há mais compostos nesta fração (e nas outras), que precisam ser elucidados quanto à estrutura e função. Pretende-se efetuar a verificação do mecanismo de ação dos compostos das frações (pró-convulsivantes e anticonvulsivantes como a fração PbTx 2.2.1) da peçonha desta aranha através de: microinjeção cerebral de análogos e agonistas/antagonistas de neurotransmissores em regiões específicas; marcação radioativa da toxina para observação das estruturas cerebrais em que ocorre sua ligação; ensaios de imunofluorescência das frações para verificar deslocamento de neurotransmissores como o glutamato e o GABA radioativos; experimentos de grampos de corrente, voltagem e canais iônicos (*current*, *voltage* e *patch clamp*) de canais iônicos entre outros.

Descreveu-se a presença de atividade de fosfatase na peçonha de *P. bistriata*. Pretendemos verificar o efeito biológico desta fração *in vivo* sobre o S.N.C. de mamíferos. Sabe-se que o funcionamento de diversos receptores é grandemente influenciado por fosfatases em diversos fenômenos fisiopatológicos, entre eles as crises convulsivas (Meldrum *et al.*, 1999).

Em dados não apresentados (anexo A), verificou-se que a microinjeção de bicuculina no HD causou crises convulsivas mais homogêneas que o HV. No entanto, surgem as seguintes perguntas: quais estruturas cerebrais o evento ictal da injeção do convulsivante bicuculina recruta durante a expressão das crises TC? Por que 50 % dos animais injetados com a mesma droga no mesmo bcal (HV) apenas tiveram WDS e não as crises TC e fugas? Por qual mecanismo o muscimol conseguiu proteger os animais das crises convulsivas originárias do HD?

Referências Bibliográficas

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

ADAMS, M.E.; BINDOKAS, V.P.; HASEGAWA, L.; VENEMA, V.J. ω -agatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel-web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, p. 861-867, 2000.

AIDLEY, D.J.; STANFIELD, P.R. Drugs and toxins. In:_____. **Ion channels: molecules in action**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. cap.7, p. 225-249.

AKHUNOV, A.A.; GOLUBENKO, Z.;SADYKOV, A.S. Isolation of kininase from the spider venom *Latrodectus tredecimguttatus*. **Dokl. Akad. Nauk. SSSR.**, Moscou v. 25, p. 1478-1480, 1981.

AKHUNOV, A.A.; MAKEVNINA, L.G.; GOLUBENKO, Z.; PASKHINA, T.S. Kininase of the *Latrodectus tredecimguttatus* venom: a study of its substrate specificity. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 32, p. 160-162, 1996.

AMARA, S.G.; KUHAR, M.J. Neurotransmitter transporters: recent progress. **Annu. Rev. Neurosci.**, Palo Alto, v.16, p. 73-93, 1993

ARAÚJO, D.A.M.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; BEIRÃO, S.L. Effects of a toxic fraction, PhTx₂, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, Berlim, v. 347, p. 205-208, 1993.

BATEMAN, A.; BODEN, P.; DELL, A.; DUCE, I.R.; QUICKE, D.L.J.; USHERWOOD, P.N.R. Postsynaptic block of a glutamatergic synapse by low molecular weight fractions of spider venom. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 339, n. 2, p. 237-244, 1985.

BELEBONI, Renê de Oliveira, **Purificação e caracterização bioquímica parcial de frações isoladas da peçonha da aranha social *Parawixia bistriata***. 2000. 93 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

BHATTACHARYYA, G.K. **Statistical concepts and methods**. New York: Wiley, 1977. 639 p. (Wiley series in probability and mathematical statistics).

BINDOKAS, V.P.; ADAMS, M.E. ω -AgaI: a presynaptic calcium channel antagonist from the venom of the funnel-web spider, *Agelenopsis aperta*. **J. Neurobiol.**, New York, v. 20, p. 171-188, 1989.

BORDEN, L.A.; SMITH, K.E.; HARTIG, P.R.; BRANCHEK, T.A.; WEINSHANK, R.L. Molecular heterogeneity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport system. Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.267, p. 21098-21104, 1992.

BOYER, R.F. **Modern experimental biochemistry**. 2. ed. Boston: Addison-Welsey, 1993. 584p.

BRACKLEY, P.T.H.; BELL, D.R.; CHOI, S.K.; NAKANISHI, K.; USHERWOOD, P.N.R. Selective antagonism of native and cloned kainate and NMDA receptors by polyamine-containing toxins. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Amsterdam, v. 266, p.1573-1580, 1993.

CAIRRÃO, Marcelo Araujo Rodrigues, **Análise neuroetológica e estudo da atividade pró-convulsivante e anticonvulsivante *in vivo* da peçonha bruta da aranha *parawixia bistriata*: injeção central e periférica**. 1999. 81 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CAIRRÃO, M.A.R.; GUIZZO, R.; SANTOS, W.F.; GARCIA-CAIRASCO, N. A comparative neuroethological study of limbicseizures induced by *Parawixia bistriata* venom and kainic acid injections in rats. **Brain Res. Bul.**, New York, v. 55, n. 1, p. 79–86, 2001.

CAIRRÃO, M.A.R.; RIBEIRO, A.M.; PIZZO, A.B.; FONTANA, A.C.K.; BELEBONI, R.O.; COUTINHO-NETTO, J.; MIRANDA, A.; SANTOS, W.F. Anticonvulsant and GABA uptake inhibition properties of *P. bistriata* and *S. raptoria* spiders venom fractions. **Pharmaceutical Biol.**, New York, 2002. No prelo.

CARVALHO, F.F.; NENCIONI, A.L.; LEBRUN, I.; SANDOVAL, M.R.; DORCE, V.A. Behavioral, electroencephalographic, and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, New York, v.60, n.1, p. 7-14, 1998.

DE SARRO, G.; DE SARRO, A.; Di PAOLA, E.D.; BERTORELLI, R. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on audiogenic seizure-sensible DBA/2 mice. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 371, p. 137-145, 1999.

DINGLELINE, R.; MCBAIN, C.J.; MCNAMARA, J.O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v.11, n.8, p.334-338, 1990.

DORANDEU, F.; WETHERELL, J.; PERNOT MARINO, I.; TATTERSALL, J.E.; FOSBRAEY, P.; LALLEMENT, G. Effects of excitatory amino acid antagonists on dendrotoxin-induced increases in neurotransmitter release and epileptiform bursting in rat hippocampus in vitro. **J Neurosci Res.**, New York, v. 48, n. 6, p. 499-605, 1997.

ENZ, R; CUTTING, G.R.; Molecular composition of gaba c receptors. **Vision Res.**, Oxford, v. 38, p. 1431-1441, 1998.

FONTANA, Andréia Cristina Kirklin, **Caracterização química e biológica parcial da peçonha da aranha *Parawixia bistriata***. 1997. 118 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FONTANA, Andréia Cristina Kirklin, **Neuromodulação de sinapses glutamatérgicas por componentes purificados da peçonha da aranha social *Parawixia bistriata***. 2001. 167 p. Tese de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FONTANA, A.C.K.; CAIRRÃO, M.A.R.; COLUSSO, A.J.; SANTOS, W.F.; COUTINHO-NETTO, J. Activity of the *parawixia bistriata* crude venom in a new bioassay in termites. **Toxicon**, Oxford, v. 38, p. 133-138, 2000.

FOWLER, H.G. Phylogenetic inertia and the limits of evolution of social behavior in spiders. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 148-150, 1993.

FRIEDLANDER, B. Synthesized spider venom may one day save stroke victims from brain damage **Cornell Chronicle**, Ithaca, v. 30, n.27, 1999. Disponível em: <http://www.news.cornell.edu/chronicle/99/3.25.99/spider_venom.html>. Acesso em: 20 nov. 2002.

GALE, K. Mechanisms of seizure control mediated by gamma aminobutyric acid: the role of the substantia nigra. **Fed. Proc.**, Bethesda, v. 44, p. 2414-2424, 1985

GARCIA-CAIRASCO, N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. **Hearing Res.**, Amsterdam, v. [168, n. 1-2, p. 208-222](#), 2002.

GARCIA, M.L.; HANNER, M.; KNAUS, H.-G.; SLAUGHTER, R.; KACZOROWSKI, G.J. Scorpion toxins as tools for studying potassium channels **Methods Enzymol**, New York, v. 294, p.624-639, 1998.

GATLIN, L.; DAVIS, J.C. Comparison of ribose and deoxyribose nucleosides by NMR and deductions regarding ribose and deoxyribose nucleic acids. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 84, p. 4464-4470, 1962.

GOBBI, N.; ZUCCHI, R.; SAKAGAMI, S.F. General behavioral patterns and life-cycle of the colonial spider, *eriophora bistrata* (araneida:argiopidae). **Bolm. Zool. Univ. S. Paulo.**, São Paulo, v.4, p.65-74, 1979.

GRISHIN, E.V. Black widow spider toxins: the present and the future. **Toxicon**, Oxford, v. 36, n.11, p. 1693-1701, 1998.

GUIZZO, Renato. **Efeito dos antagonistas de receptores excitatórios lamotrigina, nimodipina e cetamina e alguns componentes isolados da peçonha da aranha *Parawixia bistrata* na lesão neuronal seletiva por isquemia seguida de reperfusão: análise histológica qualitativa e quantitativa.** 2001. 112 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 48, p. 422-477, 1972.

HEITZ, J.R.; NORMENT, B.R. Characteristics of an alkaline phosphatase activity in brown recluse venom. **Toxicon**, Oxford, v. 12, p. 181-187, 1974.

HORNI, A.; WEICKMANN, D.; HESSE, M. The main products of the low molecular mass fraction in the venom of the spider *latrodectus menavodi* **Toxicon**, Oxford, v. 39, p. 425-428, 2001.

HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annu. Rev. Neurosci.**, Palo Alto, v.17, p.31-108, 1994.

IADAROLA, M.J.; GALE, K. Substantia nigra: site of anticonvulsant activity by gamma aminobutyric acid. **Science.**, Washington, v. 218, p. 1237-1240, 1982.

JACKSON, H.; PARKS, T.N. Anticonvulsant action of an arylamine-containing fraction from *agelenopsis* spider venom. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 526, n. 2, p. 338-341, 1990.

JOHSTON, G.A.R. GABA_A receptor pharmacology. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 69, n. 3, p. 173-198, 1996.

KAWAI, N.; NIWA, A.; ABE, T. Spider venom contains specific receptor blocker of glutaminergic synapses. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 247, n. 1, p. 169-171, 1982.

KROGSGAARD-LARSEN, P.; FROLUND, B.; FRYDENVANG., K. GABA uptake inhibitors. design, molecular pharmacology and therapeutic aspects. **Curr. Pharm. Des.**, Schiphol, v. 6, p. 1193-1209, 2000.

LARA, D.R.; SCHMIDT, A.P.; FRIZZO, M.E.S.; BURGOS, J.S.; RAMÍREZ, G.; SOUZA, D.O. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 912, p. 176-180, 2001

LEVI, H.W. Spiders of the orb-weaver genus *Parawixia* in america (araneae: araneidae). **Bull. Mus. Comp. Zool.**, Oxford, v. 153, n. 1, p. 1-46, 1992.

LLINAS, R.; SUGIMORI, M.; LIN, J.W.; CHERSKEY, B. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 86, p. 1689-1693, 1989.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res.**, Amsterdam, v. 2, p. 145-181, 1988.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUCH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAGGIO, R.; GALE, K. Seizures evoked from *area tempestas* are subject to control by GABA and glutamate receptors in *substantia nigra*. **Exp. Neurol.**, Orlando, v. 105, p. 184-188, 1989.

MCCALDIN, D.J. The chemistry of ninhydrin. **Chem. Rev.**, Washington, v.60, p. 39-51, 1960.

MCCORMICK, K.D.; MEINWALD, J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. **J. Chem. Ecology**, New York, v. 19, n. 10, p. 2411-2451, 1993.

MCCORMICK, J.; LI, Y.; MCCORMICK, K.; DUYNSTEE, H.I.; van ENGEL, A.K.; van der MAREL, G.A.; GANEM, B.; van BOOM, J.H.; MEINWALD, J. Structure and total synthesis of HF-7, a neuroactive glyconucleoside disulfate from the funnel-web spider *Hololena curta*. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 121, p. 5661-5665, 1999.

MEHTA, A .K.; TICKU, M.K., An update on GABA_A receptors. **Brain. Res. Brain Res. Rev.**, Amsterdam, v. 29, p. 196-217, 1999.

MEINWALD, J.; EISNER, T. The chemistry of phyletic dominance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 92, p. 14-18, 1995.

MELDRUM, B.S.; AKBAR, M.T.; CHAPMAN, A.G. Glutamate receptor and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. **Epilepsy Res.**, Amsterdam, v. 36, p. 189-204, 1999.

MEUCCI, O.; J. MILLER, R. J. Dissociation between the joro spider toxin sensitivity of recombinant α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4- soxazolepropionic acid receptors and their ability to increase intracellular calcium. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 37, p. 1431-1443, 1998.

MILLER, J.W. The role of mesencephalic and thalamic arousal systems in experimental seizures. **Prog. Neurobiol.**, Oxford, v. 39, p. 155-178, 1992.

MINTZ, I.M.; VENEMA, V.J.; SWIDEREK, K.M.; LEE, T.D.; BEAN, B.P.; ADAMS, M.E. P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-aga IV A. **Nature**, London, v. 355, p. 827-829, 1992.

MOE, S.T.; SMITH, D.L.; CHIEN, Y.E.; RASZKIEWICZ, J.L.; ARTMAN, L.D.; MUELLER, A.L. Design, synthesis and biological evaluation of spider toxin (argiotoxin-636) analogs as NMDA receptor antagonists. **Pharm. Res.**, New York, v. 15, n. 1, p. 31-38, 1998.

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. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 29, p. 365-402, 1989.

MORAES, M.F.D.; GALVIS-ALONSO, O.Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Res.**, Amsterdam, v. 39, p. 251-259, 2000.

MOREAU, J-L.; HUBER, G. Central adenosina A_{2A} receptors: an overview. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, Amsterdam, v. 31, p. 65-82, 1999.

NAKANISHI, K. **One-dimensional and two-dimensional NMR spectra by modern pulse techniques**. California: University Science books, 1990. p.61.

NIELSEN, E.B.; SUZDAK, P.D.; ANDERSEN, K.E.; KNUTSEN, L.J.; SONNEWALD, U.; BRAESTRUP, C. Characterization of tiagabine (no-328), a new potent and selective gaba uptake inhibitor. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 196, n. 3, p. 257-266, 1991.

NORMENT, B.R.; JONG, Y.S.; HEITZ, J.R. Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa*-III. Hydrolytic activity. **Toxicon**, Oxford, v. 17, p. 539-548, 1979.

ODELL, G.; HUDIBURG, S.; OWNBY, C.; MILLS, J.; HUEBERT, A.; BARE, J. Neurotoxins in neurobiology. their actions and applications. In: TIPTON, K.F., DAJAS, F. (Ed.). **Ellis Horwood Series**. West Sussex: Chichester, 1994. cap 2, p. 27-42.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 2.ed., California: Academic Press, 1986.

PIZZO, A.B.; FONTANA, A.C.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W.F. Effects of the crude venom of the social wasp *agelaia vicina* on gamma-aminobutyric acid and glutamate uptake in synaptosomes from rat cerebral cortex. **J Biochem Mol Toxicol.**, New York, v.14, n. 2, p. 88-94, 2000.

PRINCE, D.A.; CONNORS, B.W. Mechanisms of interictal epileptogenesis. **Adv. Neurol.**, New York, v. 44, p. 275-299, 1986.

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

REDEGELD, F.A.; CALDWELL, C.C.; SITKOVSKY, M.V. Ecto-protein kinases: ectodomain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation? **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v.20, p. 453-459, 1999.

SANDOVAL, M.R.L.; DORCE, V.A.C. Behavioural and electroencephalographic effects of *tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Toxicon**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 205-212, 1993.

SANGUINETTI, M.C.; JOHNSON, J.H.; HAMMERLAND, L.G. KELBAUGH, P.R. VOLKMANN, R.A.; SACCOMANO, N.A.; MUELLER, A.L. Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. **Mol. Pharmacol.**, Bethesda, v. 51, p. 491-498, 1997.

SCHANBACHER, F.L.; LEE, C.K.; WILSON, I.B.; HOWEL, D.E.; ODELL, G.V. Purification and characterization of tarantula *Dugesiella hentzi* (Girard) venom hyaluronidase. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 44B, p. 389-396, 1973.

SCHWARTZKROIN, P.A.; WYLER, A.R. Mechanisms underlying epileptiform burst discharge. **Ann. Neurol.**, New York, v. 7, n. 2, p. 95-107, 1980.

SUTTON, K.G.; STAPLETON, S.R.; SCOTT, R.H. Inhibitory actions of synthesised polyamine spider toxins and their analogues on Ca^{2+} -activated Cl^- currents recorded from cultured DRG neurones from neonatal rats. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 251, p. 117-120, 1998.

SWARTZ, K.J.; MACCKINNON, R. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. **Neuron**, Cambridge, v. 15, p. 941-949, 1995.

TAKAZAWA, A.; YAMAZAKI, O.; KANAI, H.; ISHIDA, N.; KATO, N.; YAMAUCHI, T. Potent and long-lasting anticonvulsant effects of 1-naphthylacetyl spermine, an analogue of joro spider toxin, against amygdaloid kindled seizures in rats. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 706, n. 1, p. 173-176, 1996.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E. A.; BORTOLOTTI, Z.A.; MORAES MELLO, L.E.A. ; SCHWARZ, M.; TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 321, p. 237-253, 1984.

UCHITEL, O. D. Toxins affecting calcium channels in neurons. **Toxicon**, Oxford, v. 35, n. 8, p. 1161-1191, 1997.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO/Sistema Integrado de Bibliotecas. **Diretrizes para a apresentação de teses e dissertações à USP:** documento eletrônico e impresso (versão preliminar). São Paulo, 2001. Disponível em: <<http://www.bcrp.pcarp.usp.br>>. Acesso em: 20 nov. 2002.

USHERWOOD, P.N.; BLAGBROUGH, I.S. Spider toxins affecting glutamate receptors: polyamines in therapeutic neurochemistry. **Pharmacol Ther.**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 245-267, 1991.

VELLUTI, J.C.; CAPUTI, A.; MACADAR, O. Limbic epilepsy induced in the rat by dendrotoxin, a polypeptide isolated from the green mamba (*dendroaspis angusticeps*) venom. **Toxicon.**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 649-657, 1987.

VOET, D.; VOET, J. Techniques of protein purification. In:_____. **Biochemistry**. 2. Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995. cap 5, p. 71-104.

WASHBURN, M.S.; DINGLELINE, R. Block of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by polyamines and polyamine toxins. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v. 278, n. 2, p. 669-678, 1996.

WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORE, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 25-33, 1990.

WILLIAMS, M.; JARVIS, M.F. Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 59, p. 1173-11185, 2000.

WU, C.F.; TSAI, M.C.; CHEN, M.L.; ZHONG, Y.; SINGH, S.; LEE, C.Y. Actions of dendrotoxin on k⁺ channels and neuromuscular transmission in drosophila melanogaster, and its effects in synergy with k⁺ channel-specific drugs and mutations. **J. Exp. Biol.**, London, v. 147, p. 21-41, 1989.

APÊNDICE – Sobre o papel utilizado nesta tese

Utilizou-se no presente trabalho papel 100% reciclado da marca Reciclato, 90 g/m², produzido em escala industrial pela Cia. Suzano de Papel e Celulose. Em Ribeirão Preto, este papel pode ser encontrado na empresa SPP-NEMO: Av. Mogiana nº 2410, fone 6283038.

ANEXO D

RMN da fração 7; Próton, unidimensional

NMR HMQC da fração 7

ANEXO F – RMN DA FRAÇÃO 7 – COSY E J res