

# **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Clonagem e expressão da sequência codificante para o peptídeo maduro LTx4 da  
aranha *Lasiadora* sp em sistema pET21b.**

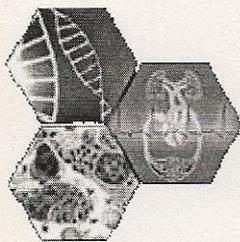
Universidade Federal de Ouro Preto  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

**Filippe Gadioli Pimentel**  
**Ouro Preto, dezembro de 2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal de Ouro Preto  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

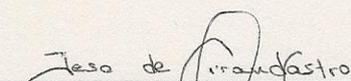


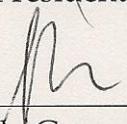
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

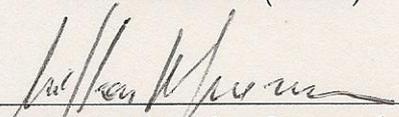
**“Clonagem e Expressão da Sequência Codificante para o Peptídeo Maduro  
LTx4 da Aranha *Lasiodora SP* em Sistema pET21b”**

Aos 03 dias do mês de dezembro de 2010, às 14:00h, no Auditório do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno Filippe Gadiolli Pimentel. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suely Gomes de Figueiredo  
Examinadora (UFES)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade  
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 03/12/2010

**Universidade Federal de Ouro Preto**  
**Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**

**Clonagem e expressão da sequência codificante para o peptídeo maduro LTx4 da aranha *Lasiodora* sp em sistema pET21b.**

**Filippe Gadiolli Pimentel**  
**ORIENTADOR: PROF. DR. IESO DE MIRANDA CASTRO**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Molecular

Ouro Preto, dezembro de 2010

*Dedicatória*

---

*“Penso noventa e nove vezes e nada descubro;  
deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio  
- e eis que a verdade se me revela”.*  
*(Albert Einstein)*

*Aos meus pais Gilson e Janete  
Aos meus irmãos Vinícius e Lícia  
Com todo meu amor e gratidão*

À CAPES pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

À cidade de Ouro Preto e à Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), onde vivi muitos dos melhores momentos de minha vida e onde adquiri aprendizados que levarei sempre comigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro, pela oportunidade no laboratório, pela confiança depositada em meu trabalho, pelo exemplo de comprometimento com a ciência e pelos bons momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão, por coordenar, juntamente com o professor Ieso, o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM).

À aranha *Lasiadora* sp e a seu peptídeo LTx4, por me fornecerem ferramentas que proporcionaram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Dr. Hélio Hideo Babá (meu professor de Bioquímica I) e Dr. Evanguedes Kalapothakis pela participação na construção da biblioteca de cDNA da aranha *Lasiadora* sp.

À minha madrinha de graduação, professora de Biologia Molecular e amiga, Dra. Renata Guerra de Sá.

Ao professor Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade pelas valiosas discussões científicas.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) e ao Laboratório de Imunoparasitologia (LIP). Obrigado pelo convívio e pelo uso dos equipamentos. Aos amigos do Laboratório de Enzimologia e Biofísica, Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC) e Laboratório de Doença de Chagas.

Aos amigos de pós-graduação: Auffy, Igor “Água Moli”, Rodolfo Pessoti, Natália, Roberta, Karina, Alínia, Larissa, Ramon “Mamona”, Tiago “Listerine”.

À Cida, secretária do NUPEB, pela prestatividade, amizade e apoio.

À Maria José Trópia, por sempre estar bem disposta a ajudar, pelo ótimo convívio e pela amizade ao longo desses anos no LBCM.

Às amigas Carol e Pilar pelo auxílio nos experimentos de sequenciamento.

Aos amigos do LBCM: Aninha, Bruna, Cristiana, Edgar, Érica, Eriquinha, Fernando, Gabi, Guto, Natália, Max, Renata, Soraia, Sr. Bráz.

À Laura pela grande ajuda e por compartilhar comigo as dúvidas, as dificuldades e os sucessos com a LTx4.

Aos amigos da época de graduação: Amanda Padilha, Érica Pimenta, Luana, Rafael, Pedro, Efraim, Samuel.

Ao amigo Mateus Bastos “Doze” pela grande ajuda e pelas discussões científicas mesmo à distância. Valeu my friend!

À amiga Régia “Sorine” pelo companherismo, excelentes momentos de risadas e por ser uma das pessoas mais singulares que conheço.

Aos indispensáveis amigos Anderson Proust e Thiago Mafra, por compartilharem frustrações e desilusões, mas, principalmente, pela torcida, ótimo convívio, amizade e por estarem presentes nos cafés na cantina e nos momentos de risadas, tornando mais divertida a minha passagem pelo LBCM. Lembrem-se sempre: “Dápáfazê”!

À gloriosa República Peripatus e aos irmãos peripatanos, que muito contribuíram para minha formação pessoal e onde passei momentos inesquecíveis. Sentirei saudades e espero voltar sempre. Lá fiz eternos amigos.

Aos amigos Vinícius Barbosa de Paiva “Rocêro” e Guilherme Henrique Biasoli Peron “Lerdeza”, que me acompanharam em Ouro Preto depois da vida republicana. Vocês são amigos/irmãos que levarei para sempre comigo.

À minha namorada Camila, por todo amor, paciência, carinho, dedicação, companherismo e compreensão nesses últimos anos de Ouro Preto.

A todos os meus familiares, avós e avôs, tias e tios, primas e primos. Sei que mesmo de longe vocês estavam torcendo por mim.

Aos meus pais, Janete e Gilson, por me trazerem a esse mundo, por todo amor e confiança depositados em mim e pelo apoio psicológico e financeiro. Também aos meus irmãos Vinícius e Lícia, meus melhores amigos, companheiros e cúmplices. É impossível expressar com palavras toda a minha gratidão. Amo vocês.

A Deus, por ter me dado serenidade para aceitar as coisas que não pude mudar, coragem para mudar as que estavam ao meu alcance e sabedoria para perceber a diferença entre elas.

Peptídeos neurotóxicos encontrados em venenos animais têm despertado um grande interesse de pesquisadores. A possibilidade de utilizá-los como ferramentas moleculares para estudos em canais iônicos, além do uso como bioinseticidas e/ou como biofármacos, tem impulsionado as pesquisas nessa área. Experimentos com o veneno bruto da aranha caranguejeira *Lasiadora* sp mostraram que o mesmo atua em canais iônicos de pequenos vertebrados e de invertebrados. Recentemente, construímos uma biblioteca de cDNA a partir dos mRNAs presentes na glândula de veneno dessa aranha. A varredura desta biblioteca, usando a técnica de ELISA, e o sequenciamento de DNA, permitiram a identificação de cinco toxinas presentes no veneno, nomeadas LTx1, LTx2, LTx3, LTx4 e LTx5. Experimentos realizados com a toxina recombinante LTx2, em células musculares BC3H1, mostraram que esse peptídeo bloqueia canais de cálcio tipo-L e inibe a recarga de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares. A estrutura primária do peptídeo LTx2 é muito similar a dos peptídeos LTx1 e LTx3, portanto, espera-se que essas toxinas possuam mecanismos de ação semelhantes. Por outro lado, a sequência de aminoácidos da LTx4 e da LTx5 são bem diferentes, tanto quando comparadas com a LTx1, LTx2 e LTx3, quanto entre si, o que leva a acreditar que elas possam atuar em diferentes canais e/ou ter diferentes mecanismos de ação. Neste trabalho, a sequência codificante para o peptídeo maduro LTx4 foi subclonada no vetor de expressão pET21b (Novagen). A estratégia foi inserir o gene de interesse sob o controle do promotor T7 e obter um produto expresso em fusão com uma cauda de seis histidinas. A confirmação da clonagem foi realizada através de PCR, digestão do DNA plasmidial com endonucleases de restrição e, finalmente, sequenciamento dos DNAs extraídos dos clones positivos. A indução da expressão do peptídeo LTx4 foi realizada com a adição de 1mM de IPTG ao meio de cultura. Nos ensaios de imunodeteção utilizamos o anticorpo monoclonal anti His-Tag. O peptídeo recombinante foi identificado tanto em experimentos de Western Blot como em experimentos de Dot Blot. O peptídeo recombinante foi expresso exclusivamente na forma de corpos de inclusão e em maiores quantidades após três a quatro horas de indução. O perfil protéico foi analisado em géis de poliacrilamida (Tricina-SDS). Experimentos de purificação do peptídeo encontram-se em andamento.

## *Abstract*

---

Peptide neurotoxins found in animal venoms have attracted great interest of researchers. The possibility of using them as tools for molecular studies of ion channels in addition to use as biopesticides and/or as biopharmaceuticals has boosted research in this area. Experiments with the venom of the spider *Lasiodora* sp showed that it acts on ion channels of small vertebrates and invertebrates. Recently, we constructed a cDNA library from mRNAs present in the venom gland of this spider. The screen of this library, using ELISA and DNA sequencing, allowed the identification of five toxins in the venom, named LTx1, LTx2, LTx3, LTx4 and LTx5. Experiments conducted with recombinant toxin LTx2 in muscle cells BC3H1 showed that this peptide blocks L-type calcium channels and inhibits  $\text{Ca}^{+2}$  recharge from intracellular stores. The primary structure of the peptide LTx2 is very similar to the peptides LTx1 and LTx3, and consequently it is expected that these toxins have similar action mechanisms. On the other hand, the amino acids sequences of LTx4 and LTx5 are quite different, both when compared with LTx1, LTx2 LTx3 and as between themselves, which leads to believe that they can act on different channels and/or have different action mechanisms. In this work, the coding sequence for the mature peptide LTx4 was subcloned at the expression vector pET21b (Novagen). The strategy used was to insert the gene of interest under the control of T7 promoter and obtain the expression product in fusion with a six histidine tag. The cloning confirmation was performed by PCR, plasmid DNA digestion with restriction enzymes, and finally, sequencing of DNAs extracted from the positive clones. The induction of LTx4 peptide expression was performed by addition of 1mM IPTG to the culture medium. At the immunodetection assay, we used monoclonal antibody anti His-tag. The recombinant peptide was identified by both Western Blot and Dot Blot experiments. The recombinant peptide was expressed exclusively as inclusion bodies and in larger amounts after three to four hours of induction. The protein profile was analyzed on polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS). Peptide purification experiments are in course.

---

<b>RESUMO</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aranhas caranguejeiras</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Estudo de toxinas animais</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Estudo de toxinas de aranhas</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1 Ação na liberação de neurotransmissores</b>	<b>9</b>
<b>1.3.2 Ação em canais iônicos</b>	<b>12</b>
<b>1.3.3 Ação em canais de sódio dependentes de voltagem (Na<sub>v</sub>)</b>	<b>13</b>
<b>1.3.4 Ação em canais de potássio</b>	<b>16</b>
<b>1.3.5 Ação em canais de cálcio voltagem-sensível</b>	<b>19</b>
<b>1.4 Estudos com o veneno da aranha <i>Lasiadora</i> sp</b>	<b>24</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	<b>27</b>
• Amplificar, a partir do clone isolado da biblioteca de cDNA, a sequencia codificante para o peptídeo LTx4;	<b>27</b>
• Proceder a ligação no vetor pET21b ou pET16b;	<b>27</b>
• Transformar células de <i>Escherichia coli</i> TOP10F' com o produto de ligação;	<b>27</b>
• Verificar a inserção do fragmento por PCR, cortes com endonucleases de restrição e sequenciamento;	<b>27</b>

•	Induzir a expressão do peptídeo recombinante em <i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3) pLysS;	27
•	Identificar o peptídeo por imunoblotting;	27
•	Verificar se o peptídeo recombinante está sendo expresso na fração solúvel ou em forma de corpos de inclusão;	27
•	Realizar testes de purificação do peptídeo usando de uma resina de afinidade.	27
3.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1	Microorganismos	28
3.2	Meios de cultura	28
3.2.1	Composição do meio LB (Luria-Bertani)	28
3.2.2	Composição do meio LB-XIA	28
3.2.3	SOC	28
3.2.4	Meio Circlegrow (MP Biomedicals, LLC)	29
3.3	Reagentes e soluções	29
3.4	Vetores de clonagem e expressão	32
3.4.2	Sub clonagem da sequência codificante para a LTx4 nos vetores de expressão pET21b e pET16b	32
3.5	Amplificação da sequência da LTx4 madura	34
3.5.1	Digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição	35
3.5.2	Construção da sequência da LTx4 com códons mais frequentes para <i>E.coli</i> e anelamento das fitas direta e reversa	36
3.5.3	Purificação dos DNAs	37
3.5.4	Reação de ligação	38
3.5.5	Verificação da presença de inserto nos clones obtidos	38
3.6	Preparo de células competentes de <i>E. coli</i>	39

<b>3.7</b>	<b>Transformação de bactérias</b>	<b>39</b>
<b>3.8</b>	<b>Eletroforese em gel de agarose</b>	<b>40</b>
<b>3.9</b>	<b>Extração de DNA plasmidial de bactéria</b>	<b>40</b>
<b>3.10</b>	<b>Sequenciamento do DNA</b>	<b>41</b>
<b>3.10.1</b>	<b>Mini prep para sequenciamento</b>	<b>41</b>
<b>3.10.2</b>	<b>PCR para reação de sequenciamento</b>	<b>42</b>
<b>3.10.3</b>	<b>Precipitação da reação de sequenciamento</b>	<b>43</b>
<b>3.11</b>	<b>Expressão da proteína recombinante</b>	<b>43</b>
<b>3.12</b>	<b>Extração de proteínas totais</b>	<b>44</b>
<b>3.13</b>	<b>Separação das frações protéicas e solubilização da fração insolúvel</b>	<b>44</b>
<b>3.14</b>	<b>SDS-Tricina-PAGE</b>	<b>45</b>
<b>3.15</b>	<b>Coloração de gel de poliacrilamida por nitrato de prata</b>	<b>45</b>
<b>3.16</b>	<b>Western Blot</b>	<b>46</b>
<b>3.17</b>	<b>Dot Blot</b>	<b>46</b>
<b>3.18</b>	<b>Purificação da proteína recombinante utilizando resina de Cobalto</b>	<b>47</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Clonagem da sequência codificante para o peptídeo LTx4 maduro</b>	<b>48</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Tentativa de clonagem em sistema pET16b</b>	<b>48</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Clonagem da sequência codificante para o peptídeo LTx4 no vetor pET21b nos sítios de <i>Bam</i>HI e <i>Xho</i>I</b>	<b>50</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Clonagem da sequência codificante para LTx4 no vetor pET21b nos sítios de <i>Nde</i>I e <i>Xho</i>I</b>	<b>52</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Sequenciamento do DNA</b>	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>Perfil de expressão da LTx4 recombinante</b>	<b>55</b>
<b>4.3</b>	<b>Western Blot</b>	<b>57</b>

<b>4.4 Tentativa de purificação da LTx4 recombinante usando resina de afinidade</b>	<b>58</b>
<b>4.5 Dot Blot</b>	<b>60</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>70</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	<b>71</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>72</b>
<b>11. ANEXO 1</b>	<b>90</b>

Abs	Absorbância
cDNA	DNA complementar
CTAB	<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i> (Brometo de Cetil-Trimetilamônio)
Da	Dáltons
dNTP's	Desoxiribonucleotídeos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorvente ligado à enzima)
Gal	Galactose
GET	Glicose/EDTA/Tris
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-thiogalactopiranoside
kDa	Kilo dáltons
Lqh	Toxina isolada do veneno do escorpião <i>L. quinquestriatus hebraeus</i>
LTx	Toxina isolada do veneno da aranha <i>Lasiadora</i> sp.
mRNA	RNA mensageiro
NEM	N-Ethilmaleimide
nm	Nanômetros
NMDA	N-metil-D-aspartato
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PEG	Polietilenoglicol

pI	Ponto isoelétrico
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PMSF	<i>Phenylmethylsulphonylfluoride</i> (Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoreto)
p/v	Peso por volume
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotações por minute
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TAE	Tampão Tris/Acetato/EDTA
TE	Tampão Tris/EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etano-1,2-diamino
THP	Tris(hidroxipropil)phosphine
tRNA	RNA transportador
TTX	Tetrodotoxina
X-GAL	5-Bromo-4-Cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase
$\alpha$ -LTx	$\alpha$ -latrotoxina

Figura 1 - Aranha do gênero <i>Lasiadora</i> sp .....	3
Figura 2 - Estrutura molecular dos canais de sódio dependentes de voltagem ( $Na_v$ ) e locais de ligação das neurotoxinas .....	15
Figura 3 – Estrutura obtida por de raio-X do canal de $K_v1.2$ .....	18
Figura 4 - Estrutura molecular das subunidades dos canais de $Ca_v$ encontrados nas membranas celulares .....	20
Figura 5 - Mapa circular do vetor pET16b .....	49
Figura 6 - Gel de poliacrilamida 8% .....	50
Figura 7 - Gel de agarose 1% .....	52
Figura 8 – Mapa do vetor pET21a .....	54
Figura 9 – SDS-Tricina-PAGE dos extratos totais obtidos nos diferentes tempos de indução com 1mM de IPTG.....	56
Figura 10 - Western Blotting de réplica do gel mostrado na figura 9 .....	57
Figura 11 - SDS-Tricina-PAGE do extrato total proveniente do processo de indução utilizando a resina de afinidade HIS-Select™ Cobalt Affinity Gel (Sigma).....	59
Figura 12 – Dot Blotting .....	61
Figura 13 - Análise da sequencia dos aminoácidos do peptídeo LTx4 recombinante pela ferramenta <i>Compute pI/Mw</i> .....	65
Figura 14 - Análise da estrutura secundária da LTx4 recombinante pela ferramenta disponível em <a href="http://knottin.cbs.cnrs.fr/Tools_1D.php">http://knottin.cbs.cnrs.fr/Tools_1D.php</a> .....	66
Figura 15 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da LTx4 com outras toxinas de aranha.....	67

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aranhas caranguejeiras

As aranhas pertencem a um grupo antigo de artrópodes. O fóssil mais antigo conhecido é do período Carbonífero, com aproximadamente 300 milhões de anos. Depois dos insetos, as aranhas constituem o grupo de invertebrados que obtiveram mais sucesso na colonização do planeta, com aproximadamente 40 mil espécies descritas (Platnick, 1993). Podem ser encontradas em todo o hábitat terrestre, do litoral até regiões alpinas, de desertos até florestas tropicais. Muitas se adaptaram a viver nos mesmos ambientes que os homens. As aranhas em sua maioria não são naturalmente agressivas, sendo geralmente inofensivas para os seres humanos; entretanto, existem algumas espécies que são responsáveis por acidentes perigosos e até mesmo fatais (Rash & Hodgson, 2002).

As aranhas caranguejeiras (filo Artropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, ordem Araneae) são pertencentes à subordem *Mygalomorphae*, que é compreendida por aranhas primitivas. Essas aranhas são predadoras de pequenos animais, assim como a grande maioria dos aracnídeos, mas se destacam por seu tamanho e longevidade, já que podem atingir envergadura de até 25 cm e viver aproximadamente 25 anos. Dentro da subordem *Mygalomorphae* as aranhas da família *Theraphosidae* se sobressaem, com cerca de 860 espécies descritas no mundo todo. As aranhas dessa família são popularmente conhecidas como tarântulas na América do Norte e Europa e como caranguejeiras na América do Sul (King, 2004; Saucier, 2004; Escoubas *et al.*, 2004). As aranhas do gênero *Lasiadora* fazem parte dessa família (Figura 1).

Caranguejeiras são encontradas em diversos nichos ecológicos, preferencialmente em regiões tropicais e semi tropicais (King, 2004). Para capturar suas presas essas aranhas utilizam suas quelíceras ortognatas (dispostas paralelamente ao eixo maior do corpo), que são dotadas de grandes agulhões e se movem no plano longitudinal, sendo capazes de ferir e matar presas como pequenos pássaros e outros vertebrados de pequeno porte, além de invertebrados, incluindo aranhas de sua própria espécie (Ruppert *et al.*, 2005). O veneno desses animais atua em invertebrados e

vertebrados com diferente intensidade (Escoubas *et al.*, 2004). Há relatos de picadas de aranhas da família *Theraphosidae* na América do Sul, África, Ásia e Austrália (Lucas *et al.*, 1994; Schmidt, 1989; Isbister *et al.*, 2003), porém, em geral seu veneno não causa danos graves para os humanos. Na grande maioria dos casos os sintomas são dores locais moderadas, coceiras, edema e rigidez local. Nos casos mais graves as picadas provocam espasmos musculares prolongados (Escoubas *et al.*, 2004; Isbister *et al.*, 2002). A dor proveniente da picada é consequência do ferimento provocado pelos grandes aguilhões, baixo pH do veneno (pH5.0) e pela ação de aminas biogênicas: serotonina, histaminas, adenosina, poliaminas e ATP (Chan *et al.*, 1975; Schanbacher *et al.*, 1973a; Cabiness *et al.*, 1980; Schanbacher *et al.*, 1973b). Todavia, existem relatos de acidentes graves causados pela picada da Mygalomorpha australiana *Atrax robustus* que levavam até a morte antes do desenvolvimento do anti-veneno (Hartman & Sutherland 1984, Sutherland 1983, Torda et. al. 1980, Weiner 1961).

Apesar do grande tamanho de seus aguilhões a principal forma de defesa das caranguejeiras são seus pêlos urticantes. Quando ameaçadas elas esfregam as patas posteriores em seu abdômen e lançam esses pêlos no possível agressor, causando irritação na pele e mucosas que, em alguns casos, podem desencadear reações de hipersensibilidade (Lucas *et al.*, 1994) .



**Figura 1 - Aranha do gênero *Lasiadora* sp**

## **1.2 Estudo de toxinas animais**

Animais venenosos são encontrados em quase todo o reino animal, onde mais de 100.000 espécies estão distribuídas nos principais filos: cordata (répteis, peixes, anfíbios, mamíferos), equinoderma (ouriço-do-mar, estrela-do-mar), molusca (caracóis, polvos), anelídea (sanguessugas), artrópoda (aracnídeos, insetos, miriápodes), cnidária (anêmonas, águas vivas, corais). A manutenção da vida nos diferentes habitats, a disputa por alimentos e a necessidade de defesa levou a uma grande diversidade biológica, possibilitando a ocupação por parte dos animais venenosos em muitos dos ecossistemas existentes (Calvete *et al.*, 2009; Menez *et al.*, 2006). A consequência desse processo evolutivo foi o surgimento de uma grande variedade de peçonhas e de venenos, compostos desde pequenas moléculas à proteínas complexas, que podem variar em estrutura e função entre famílias, gêneros, espécies e indivíduos (Mebis, 2001). Grande parte dos animais que se utilizam de toxinas, tais como aranhas,

escorpiões, lacraias, cobras, *Conus*, insetos, entre outros, possuem maquinaria genética para a produção desses compostos (Mebs 2001, Escoubas & Rash 2004).

Os venenos são bibliotecas de peptídeos e proteínas, seletivamente adaptadas para atuarem nos sistemas vitais de suas presas e vítimas, podendo interromper a atividade de enzimas vitais, agir em receptores e canais iônicos, desarranjar os sistemas nervoso central e periférico, cardiovascular e neuromuscular, agir na coagulação sanguínea e na homeostase celular (Calvete *et al.*, 2009). Em alguns venenos são encontradas neurotoxinas que atuam em receptores celulares com alta especificidade e seletividade (Escoubas *et al.*, 2000b), o que as torna instrumentos importantes para o estudo de mecanismos biológicos presentes nessas células (Gwee *et al.*, 2002).

Devido a essas inúmeras propriedades as toxinas são ferramentas de grande interesse para pesquisadores de diferentes áreas. São úteis para o estudo de processos fisiológicos e farmacológicos, pois podem atuar nos sistemas nervoso central e periférico, no sistema cardiovascular, no sistema hormonal e no sistema imunológico. Além disso, compreender o mecanismo de ação dos venenos é importante para a elucidação do funcionamento de canais iônicos e para o desenvolvimento de drogas, bioinseticidas e anticorpos altamente específicos (Menez *et al.*, 2006). Os modos de ação das neurotoxinas têm permitido aos pesquisadores estudarem os mecanismos envolvidos na neurotransmissão, já que essas toxinas ligam-se especificamente a determinados receptores de membranas neuronais, podendo estimular ou inibir a liberação de neurotransmissores, tais como o glutamato (Barral e cols., 2001) e afetar a transmissão colinérgica.

Até o momento são estimadas cerca de 700 espécies de caracóis, 750 espécies de serpentes peçonhentas, 1.500 espécies de escorpiões e 40.000 espécies de aranhas, fornecendo aos pesquisadores um enorme reservatório de componentes bioativos ainda inexplorados, que podem ser usados no tratamento de diversas doenças que não respondem aos métodos terapêuticos disponíveis. Além disso, casos de envenenamento têm importância nas questões de saúde pública em escala mundial, já que estes animais são encontrados em todos os continentes e em quase todos os países. (Calvete *et al.*, 2009).

Rocha e Silva e colaboradores descreveram o primeiro relato científico de estudos com toxinas animais através do descobrimento de um peptídeo que pode ser

usado no controle da pressão arterial. Os autores observaram que, ao injetar o veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca* na corrente sanguínea de mamíferos, ocorria o acúmulo de bradicinina no organismo dos animais. Esse acúmulo de bradicinina se dá devido à inibição da enzima ECA (enzima conversora da angiotensina), causada pela ação do veneno da serpente (Rocha e Silva *et al.*, 1949). O acúmulo de bradicinina no organismo exerce efeito hipotensor, pois, medicamentos que inibem as ECA's (Capitopril, Enalapril, Benazepril) são responsáveis por inibir a degradação da bradicinina, o que leva à vasodilatação e conseqüentemente, queda na pressão arterial (Ferreira *et al.*, 1970). Através de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* com os venenos de serpentes das famílias *Viperidae* (víboras) e *Crotalidae*, foi observado que várias etapas de processos fisiológicos complexos, tais como coagulação sanguínea, ativação plaquetária e fibrinólise, podem ser afetados pela ação das proteínas presentes nesses venenos (Braud *et al.*, 2000). Estudos sobre a composição desses venenos mostraram que, mesmo em diferentes famílias, há uma grande similaridade estrutural entre as proteínas que compõem estes venenos (serino proteases, metaloproteases, PLA<sub>2</sub>, lectinas tipo-C, desintegrinas), porém com diferentes alvos de ação (Markland, Jr., 1997; Ogawa *et al.*, 1992; Nobuhisa *et al.*, 1997; Ogawa *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 1995; Nakashima *et al.*, 1993).

Os caracóis do gênero *Conus* são os animais marinhos peçonhentos mais estudados até o momento. Com aproximadamente 500 espécies descritas, estima-se a existência de 100.000 toxinas em seus venenos (Han *et al.*, 2008). Os componentes desses venenos são utilizados principalmente no tratamento da dor crônica (Gray *et al.*, 1988). As conotoxinas são divididas em duas super famílias: as que são ricas em pontes dissulfeto, e que atuam em receptores de glutamato do tipo NMDA (neurotensina, vasopressina) e as que são pobres em pontes dissulfeto, e agem em canais iônicos (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) e em receptores nicotínicos de acetilcolina (Terlau *et al.*, 2004). Estudos realizados com conotoxinas em modelos animais demonstraram que algumas delas possuem ação cardioprotetora, neuroprotetora, antiepiléptica e analgésica. Pesquisas recentes sugerem o uso das conotoxinas no tratamento contra câncer, distúrbios neuromusculares e psiquiátricos (Han *et al.*, 2008; Terlau *et al.*, 2004). O peptídeo sintético ω-conotoxina M-VII-A, obtido do caracol *Conus magus*, bloqueia canais de cálcio do tipo-N. Esta toxina é utilizada como anestésico no tratamento de dores

crônicas e é conhecida comercialmente como ziconotida (Calvete *et al.*, 2009; McIntosh *et al.*, 1982).

Produzidas pelas bactérias *Clostridium botulinum*, as neurotoxinas botulínicas (BoNT) estão entre as toxinas mais perigosas para os seres humanos (~100 bilhões de vezes mais tóxicas que o cianeto). O envenenamento alimentar causado por essas bactérias pode ser mortal e é conhecido como botulismo (Singh, 2000). As BoNT possuem 7 sorotipos, identificados como A, B, C, D, E, F e G, dos quais os subtipos A e B são utilizados comercialmente. Muitas clínicas de dermatologia realizam tratamentos faciais com o uso dessas toxinas. A injeção intramuscular da toxina botulínica em doses terapêuticas provoca quimiodesnervação temporária do músculo e, conseqüentemente, uma redução localizada da atividade muscular (Carruthers *et al.*, 2005).

Escorpiões são responsáveis por muitos acidentes com humanos e suas picadas podem ser letais, principalmente para crianças e idosos. As espécies *Tityus serrulatus*, *Buthus martensi* Karsch, *Mesobutus tamulus* e *Leiurus quinquestriatus* se destacam nesse cenário (Gwee *et al.*, 2002). O veneno dos escorpiões é composto por uma mistura aquosa contendo mucos, sais inorgânicos, moléculas orgânicas de baixo peso molecular, serotoninas, inibidores de proteases e peptídeos neurotóxicos, os quais variam em estrutura e função, sendo seletivos a diferentes canais iônicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) de insetos, crustáceos e mamíferos (Mebs, 2001; Muller, 1993). Devido a essa alta especificidade esses peptídeos podem ser utilizados em estudos que buscam o descobrimento de bioinseticidas, já que são biodegradáveis e não tóxicos para outros organismos (du Plessis *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2007; Gurevitz *et al.*, 2007).

### **1.3 Estudo de toxinas de aranhas**

Os estudos dos peptídeos tóxicos que compõem os venenos das aranhas vêm crescendo continuamente (De Lima *et al.*, 2007). As aranhas são os animais peçonhentos com o maior número de espécies descritas e, apesar dos estudos estarem aumentando a cada ano, ainda há muito para se explorar e se conhecer sobre seus venenos (Escoubas *et al.*, 2000b).

Os venenos de aranhas são misturas complexas de componentes biologicamente ativos e inativos. Dentre os componentes ativos encontram-se acilpoliaminas, diversos peptídeos neurotóxicos de baixo peso molecular (entre 4 e 10 kDa), geralmente contendo grande número de resíduos de cisteína (entre 6 e 14) (Grishin, 1999) e toxinas dermonecróticas de alto peso molecular (acima de 10 kDa) (da Silva *et al.*, 2004). Os componentes “inativos”, que são neurotransmissores, ácidos nucleicos, aminoácidos livres, íons e sais inorgânicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) atuam, na maioria dos casos, potencializando a ação das neurotoxinas (Cabbiness *et al.*, 1980; Corzo *et al.*, 2003a; Escoubas *et al.*, 2000b; Escoubas *et al.*, 2004; Rash *et al.*, 2002). Os peptídeos encontrados nas peçonhas de aranha podem ser classificados de acordo com a sua atividade específica: (a) promovem a liberação de neurotransmissores, (b) atuam em canais de sódio voltagem-dependentes, (c) atuam em canais de cloreto, (d) atuam em canais de potássio, (e) bloqueiam receptores colinérgicos pós-sinápticos e (f) possuem atividade em canais de cálcio sensíveis a voltagem (Rash *et al.*, 2002).

Juntamente com as proteínas e peptídeos, as acilpoliaminas são os componentes mais estudados e diversificados dos venenos de aranhas (Beleboni *et al.* 2004). As acilpoliaminas podem ser separadas desses compostos por cromatografia líquida de fase reversa, sendo eluídas antes dos peptídeos. A presença de acilpoliaminas parece ser uma característica comum a todos os venenos de caranguejeiras e vespas (Escoubas *et al.* 1995). São moléculas pequenas e potentes, derivadas de poliaminas, que antagonizam várias classes de receptores, tais como receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) e receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), podendo também interagir com canais iônicos dos sistemas nervosos, central e periférico (Olsen *et al.* 2004). Elas são divididas em dois grupos: acilpoliaminas que contêm aminoácidos e acilpoliaminas que não contêm aminoácidos. Os dois grupos atuam de forma semelhante, bloqueando receptores de glutamato e receptores nicotínicos e fazem parte da mesma família de grupos acil aromáticos terminais (McCormick e Meinwald 1995; Blagbrough *et al.* 1994). Estudos realizados por Herold & Yaksh (2005) com AR636, uma acilpoliamina isolada do veneno da aranha *Argiope aurantia*, mostraram que a AR636 provoca paralisia flácida dose-dependente e tem efeito anestésico quando injetada em ratos através de um cateter espinhal. As acilpoliaminas agem também em canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (McCormick *et al.* 1993), e parecem ser também as responsáveis pela rápida paralisia

observada em insetos durante a predação (Osborne 1996). Outra molécula tóxica derivada de uma acilpoliamina é a CNS2103, obtida do veneno da aranha *Dolomedes okefinokensis*, que bloqueia de forma reversível canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo-L e tipo-R em células N1E-115, sem afetar a função de outros canais como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-T (Kobayashi et al., 1992; Stromgaard et al., 2001).

Dentre os principais componentes das toxinas de aranha encontram-se os polipeptídeos com massa molecular de 3 kDa a 8 kDa, que mantêm sua conformação devido a presença de várias pontes dissulfeto. Podem existir ainda modificações amino e/ou carboxi terminais, que auxiliam na manutenção da estabilidade da molécula *in vivo* (Norton & Pallaghy, 1998). Os principais alvos dessas toxinas são os diversos tipos de canais iônicos de membrana (Escoubas *et. al.*2000).

Desde a década de 90 é sugerido o uso de venenos como bioinseticidas (Maeda *et al.*, 1991; McCutchen *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1991). Estudos sobre a ação específica de peptídeos tóxicos presentes nos venenos de aranhas têm sido realizados em diferentes organismos, sugerindo aplicações agroquímicas contra larvas de *Spodoptera litura* e *Helicoverpa armigera* (Bloomquist, 2003; de Castro *et al.*, 2004; Rajendra *et al.*, 2006; Corzo *et al.*, 2000) e também contra insetos de importância médica (moscas e mosquitos) como relatado em pesquisas com o veneno das aranhas australianas *Atrax* e *Hadronyche* (Maggio *et al.*, 2002). Alguns experimentos comparativos, utilizando-se de venenos de aranhas e comparando a sua ação contra insetos e camundongos, sugerem que a alta toxicidade/letalidade do veneno em insetos não se aplica em camundongos (Corzo *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Lipkin *et al.*, 2002; De Lima *et al.*, 2002). Muitas patentes para o uso de bioinseticidas já foram obtidas através de descobertas envolvendo toxinas de aranhas (De Lima *et al.*, 2007).

Existem várias abordagens que podem ser usadas para aproveitar o potencial inseticida dos peptídeos de aranha que atuam em canais iônicos. Uma descoberta interessante é que alguns desses peptídeos tóxicos são ativos via oral em alguns insetos (Khan et al., 2006) e outros artrópodes como carrapatos (Mukherjee et al., 2006). A toxicidade oral desses peptídeos pode supostamente ser aumentada ao acoplar às toxinas com proteínas carregadoras, tais como a lectina *snowdrop*, que aumentaria as chances de disponibilizar essas toxinas em sua forma ativa na hemolinfa de insetos (Fitches et

al., 2004; Down et al., 2006; Pham Trung et al., 2006). Isso aumenta a probabilidade de que certos peptídeos possam servir como inseticidas naturais em determinadas circunstâncias, tais como o controle de ectoparasitas de animais domésticos e na pecuária.

Os dados farmacológicos existentes sugerem que os peptídeos tóxicos atuam principalmente em canais de sódio (Brown *et al.*, 1988; Corzo *et al.*, 2000; De Lima *et al.*, 2007; Sheumack *et al.*, 1985), de cálcio (Liang, 2004; Escoubas *et al.*, 2000a; Dutra *et al.*, 2008; Cassola *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001) e de potássio (Maggio *et al.*, 2002; Tedford *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2000).

### **1.3.1 Ação na liberação de neurotransmissores**

A liberação fisiológica de neurotransmissores dos terminais nervosos despolarizados ocorre por um processo de exocitose vesicular. A comunicação intercelular no sistema nervoso central depende da liberação de neurotransmissores e do controle preciso da sua ação em seus receptores pré e/ou pós-sinápticos. A terminação do sinal requer a rápida eliminação dos neurotransmissores liberados, que são inativados por degradação enzimática (ex: acetilcolina) ou por recaptura ativa nos terminais nervosos (ex: glutamato, glicina, GABA). Os terminais dos neurônios são dotados de mecanismos complexos de transporte através da membrana capazes de reconhecer seletivamente os neurotransmissores endógenos liberados e de removê-los do espaço extracelular (Eulenburg & Gomeza, 2010; Raiteri *et al.* 2000). Os transportadores seletivos de membrana são essenciais para esse processo. Em algumas condições, tais como a presença de certas drogas ou alterações nas características iônicas causadas por determinadas patologias (ex: isquemia), a liberação de neurotransmissores ocorre por um mecanismo diferente da exocitose. Nesses casos os transportadores de membrana podem trabalhar bidirecionalmente, carregando neurotransmissores não somente do fluido extracelular para os terminais nervosos, mas também vice e versa, num processo chamado liberação mediada por carreador (Raiteri *et al.* 2000).

Os aminoácidos glutamato (Glu), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glicina (Gly), aspartato (Asp), taurina (Tau), e D-serina (Ser) são neurotransmissores ou neuromoduladores. Glu e Asp são os neurotransmissores excitatórios primários do sistema nervoso central, enquanto GABA e Gly são os transmissores inibitórios primários (Kennedy *et al.* 2009).

O glutamato (ácido glutâmico) é o neurotransmissor excitatório mais comum no sistema nervoso central de mamíferos e no sistema periférico de insetos. É armazenado nas vesículas sinápticas e sua liberação ocorre através de exocitose cálcio-dependente nas fendas pré-sinápticas, onde se liga a seus receptores. Os receptores de glutamato podem ser classificados como ionotrópicos ou metabotrópicos, se diferenciando por sua afinidade e localização (Eulenburg & Gomeza, 2010; Greenamyre *et al.*, 1994; Beleboni *et al.* 2004). Os receptores ionotrópicos são subdivididos em NMDA (n-metil-d-aspartato) e não-NMDA, e são seletivos a íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (Dingledine *et al.*, 1999), enquanto os receptores metabotrópicos são acoplados às proteínas-G e atuam através de um segundo mensageiro (Rash *et al.*, 2002). Os receptores não-NMDA incluem os receptores AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) e receptores Kainato. Apesar de serem classes de receptores estruturalmente relacionadas, eles diferem em seu papel funcional na neurotransmissão do glutamato. Enquanto que os receptores AMPA são os principais mediadores da transmissão sináptica excitatória rápida, receptores Kainato parecem possuir predominantemente funções modulatórias. Devido à baixa afinidade desses receptores para glutamato, sua ativação é bem próxima à sua localização nas regiões sinápticas. Já os receptores NMDA possuem alta afinidade para glutamato e receptores NMDA ativos podem ser encontrados nas regiões sinápticas e em outros locais. Essa classe de receptores é amplamente bloqueada por  $\text{Mg}^{2+}$  sob condições de repouso. Adicionalmente, o glutamato ativa receptores metabotrópicos (mGluRs), que são acoplados à proteína-G e modulam a atividade de enzimas produzindo segundos mensageiros (ex: fosfolipase-C ou adenilil ciclase). Os receptores mGluRs contribuem para a regulação da neurotransmissão glutamatérgica no cérebro (Eulenburg & Gomeza).

A  $\alpha$ -latrotoxina ( $\alpha$ -LTx), obtida do veneno da aranha do gênero *Latrodectus*, é uma proteína extremamente neurotóxica que provoca uma grande liberação de neurotransmissores nas fendas sinápticas de vertebrados e invertebrados (Pinto *et al.*,

1974; Cull-Candy *et al.*, 1973). A liberação destes neurotransmissores resulta no bloqueio na transmissão nervosa, levando à paralisia muscular (Henkel *et al.*, 1999; Harvey, 1990; Tzeng *et al.*, 1978).

Estudos com o veneno da aranha *Steatoda paykulliana*, que é fisicamente muito semelhante com as aranhas do gênero *Latrodectus*, mostraram que em baixa concentração, o veneno aumentou a condutância da membrana lipídica e em alta concentração estimulou a liberação de neurotransmissores em células neuronais do tipo PC12 (Cavalieri *et al.*, 1987).

A toxina Tx4(5-5), isolada e purificada a partir da fração PhTx4 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, possui uma alta ação inseticida com efeitos neurotóxicos em doses muito baixas observados em *Musca domestica* (mosca doméstica), *Periplaneta americana* (baratas) e *Acheta domesticus* (grilos). Além do mais, essa fração apresenta grande potencial inseticida, pois causa efeitos no hipocampo do cérebro de ratos, o que sugere uma especificidade a canais iônicos de insetos (de Figueiredo *et al.*, 2001). Estudos com a toxina Tx4(6-1) dessa mesma aranha mostraram sua ação no sistema nervoso periférico de insetos. A Tx4(6-1) atua estimulando a liberação de glutamato nas junções neuromusculares (Figueiredo *et al.*, 1995). A fração PhTx2 também é responsável por estimular a liberação de glutamato. Já a toxina Tx3-4 inibe progressivamente a liberação de glutamato estimulada por KCl e também inibe a liberação de glutamato independente de  $Ca^{2+}$ , além de exercer inibição não competitiva na reabsorção desse neurotransmissor (Romano-Silva *et al.* 1993).

Trabalhando com o veneno das aranhas *Argiope trifasciata* e *Argiope florida*, Usherwood e colaboradores, na década de 80, identificaram vários antagonistas de receptores de glutamato, chamados de argiotoxinas (Usherwood *et al.*, 1984). A inibição pós sináptica na junção neuromuscular é uma propriedade comum do veneno de oito aranhas da família *Araneidae* (Usmanov *et al.*, 1985).

### 1.3.2 Ação em canais iônicos

Canais iônicos são proteínas integrais de membrana que permitem o fluxo de íons através da membrana celular, regulando o potencial de membrana e o balanço iônico da célula. Estímulos podem causar alterações no potencial de membrana e conseqüentemente a abertura dos canais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  dependentes de voltagem, provocando um fluxo de corrente através das células e a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Canais iônicos dependentes de ligantes presentes nas fendas pós-sinápticas atuam na alteração do potencial de membrana (Eckert *et al.*, 2002). A condução do impulso nervoso ocorre através de sinais elétricos chamados de potenciais de ação, que são gerados pelo fluxo dos íons que percorrem os canais existentes na membrana celular. Neurotransmissores podem ser excitatórios, provocando a despolarização da membrana, ou inibitórios, levando a uma hiperpolarização da membrana celular. Contudo, nenhuma molécula é inerentemente excitatória ou inibitória, já que um neurotransmissor pode exercer qualquer uma das duas funções se os gradientes iônicos forem alterados (Eckert *et al.*, 2002). Como moduladores do potencial de membrana os canais iônicos participam de funções importantes no organismo, tais como a secreção de hormônios e de neurotransmissores, contração muscular e expressão gênica.

Estudos realizados mostram que alguns peptídeos tóxicos de baixo peso molecular de venenos animais agem especificamente sobre canais iônicos (Atkinson & Wright, 1992b e Rash & Hodgson, 2002). Os avanços nos estudos de toxinas têm fornecido aos pesquisadores ferramentas importantes para a investigação do papel fisiológico dos canais iônicos, permitindo também o mapeamento de sítios específicos nos receptores que podem ser de interesse como alvos para novas drogas (Escoubas *et al.* 2000).

### 1.3.3 Ação em canais de sódio dependentes de voltagem ( $\text{Na}_v$ )

Os canais de sódio dependentes de voltagem ( $\text{Na}_v$ ) medeiam o aumento na condutância de sódio durante a fase de despolarização rápida do potencial de ação, sendo por esse motivo um elemento estrutural indispensável no controle da excitabilidade celular em sistemas biológicos. Esses canais são alvos de diversas toxinas animais e vegetais e de grande variedade de inseticidas agroquímicos orgânicos, incluindo o DDT, N-alquilaminas, dihidropirazóis, oxadiazinas e piretróides. Em eucariotos, a estrutura desses canais é composta por uma única subunidade  $\alpha$  formadora de poro, composta de quatro domínios homólogos não idênticos (I-IV). Cada domínio possui seis segmentos transmembrana supostos (S1-S6). Os quatro domínios se entrelaçam em sentido horário e a proximidade dos domínios I e IV forma a entrada do poro exterior e o filtro de seletividade. Os segmentos S4 (os mais conservados) são constituídos por aminoácidos carregados positivamente (Arg ou Lys) em intervalos de três resíduos e transportam as cargas para o exterior, atuando como sensores de voltagem para iniciar a ativação dependente de voltagem sobre influência de mudanças no campo elétrico. A inativação dos canais de sódio é mediada pela região onde os domínios III e IV se conectam, que contém resíduos chave de aminoácidos hidrofóbicos (IFM). Em associação com a subunidade  $\alpha$  encontram-se duas subunidades menores auxiliares ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  e/ou  $\beta_4$ ) de aproximadamente 30 kDa, que são indispensáveis para o funcionamento normal da cinética do canal e da dependência a voltagem, mas não são essenciais para o fluxo iônico, seletividade iônica e modulação farmacológica. Os canais  $\text{Na}_v$  se mantiveram bastante conservados ao longo da evolução, sendo bem semelhantes entre mamíferos e insetos, tanto em estrutura quanto em função. Porém, esses canais se diferenciam farmacologicamente em sua seletividade a quatro grupos de inseticidas agroquímicos, tais como o DDT e seus análogos, piretróides, N-alquilamidas, oxadiazinas e diidropirazóis, assim como a diversas neurotoxinas seletivas a canais  $\text{Na}_v$  derivadas de venenos de aracnídeos (Revisado por Nicholson, 2007).

Grande parte das toxinas com ação inseticida atua em canais de sódio dependentes de voltagem, que são os responsáveis por gerar o potencial de ação e transmitir toda a informação aos nervos, músculos e coração (De Lima *et al.*, 2007).

Pequenas alterações na homeostase da membrana dos canais de sódio resultam em consequências significativas para a excitabilidade da membrana, causando a paralisia do organismo (Martin-Moutot *et al.*, 2006).

Os canais de sódio dependentes de voltagem são encontrados na maioria dos neurônios e músculos esqueléticos e podem ser classificados em canais sensíveis à tetrodotoxina (TTX), presentes no cérebro e nos músculos esqueléticos, e em canais resistentes à TTX, presentes no coração e em neurônios sensoriais periféricos da glanglia (Weiss *et al.*, 1986).

As  $\mu$ -agatotoxinas ( $\mu$ -Aga-I a  $\mu$ -Aga-VI), obtidas do veneno da aranha *Agelenopsis aperta*, foram os primeiros peptídeos tóxicos com ação em canais de sódio descritos (Skinner *et al.*, 1989). São altamente similares entre si e são constituídos de 36 e 38 aminoácidos respectivamente, sendo oito resíduos de cisteína e quatro pontes dissulfeto. As  $\mu$ -agatotoxinas apresentam similaridade com as curtatoxinas (Ct-I e Ct-II) do veneno da aranha *Hololena curta* (Stapleton *et al.*, 1990) e com as toxinas Tx1 e Tx2-9 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (Cordeiro *et al.*, 1992). Estudos com o peptídeo tóxico PhTx2, obtido após fracionamento do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* mostraram que esse peptídeo atua em canais de sódio voltagem-dependentes de sapos (Araujo *et al.*, 1993).

As toxinas que atuam em canais  $Na_v$  promovem o aumento do influxo de sódio através da membrana, despolarizando de forma duradoura as células e induzindo um estímulo neuronal pré-sináptico, causando uma intensa liberação de neurotransmissores e levando à paralisia da presa. Todos os peptídeos tóxicos de aranhas que atuam em canais de sódio já descritos apresentam o mesmo mecanismo de ação, semelhante àqueles descritos para as  $\alpha$ -toxinas de escorpiões e para as toxinas de anêmonas-do-mar (Escoubas *et al.*, 2000b).

A figura 2 mostra um desenho esquemático de um canal de  $Na_v$ .

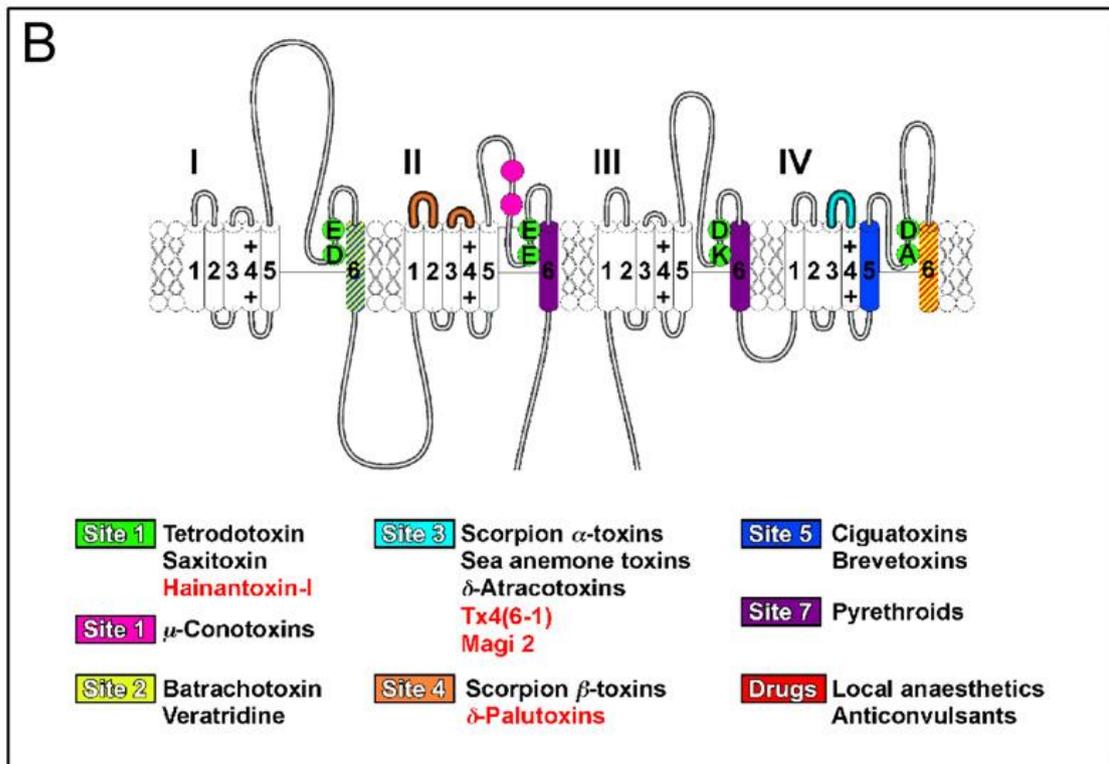
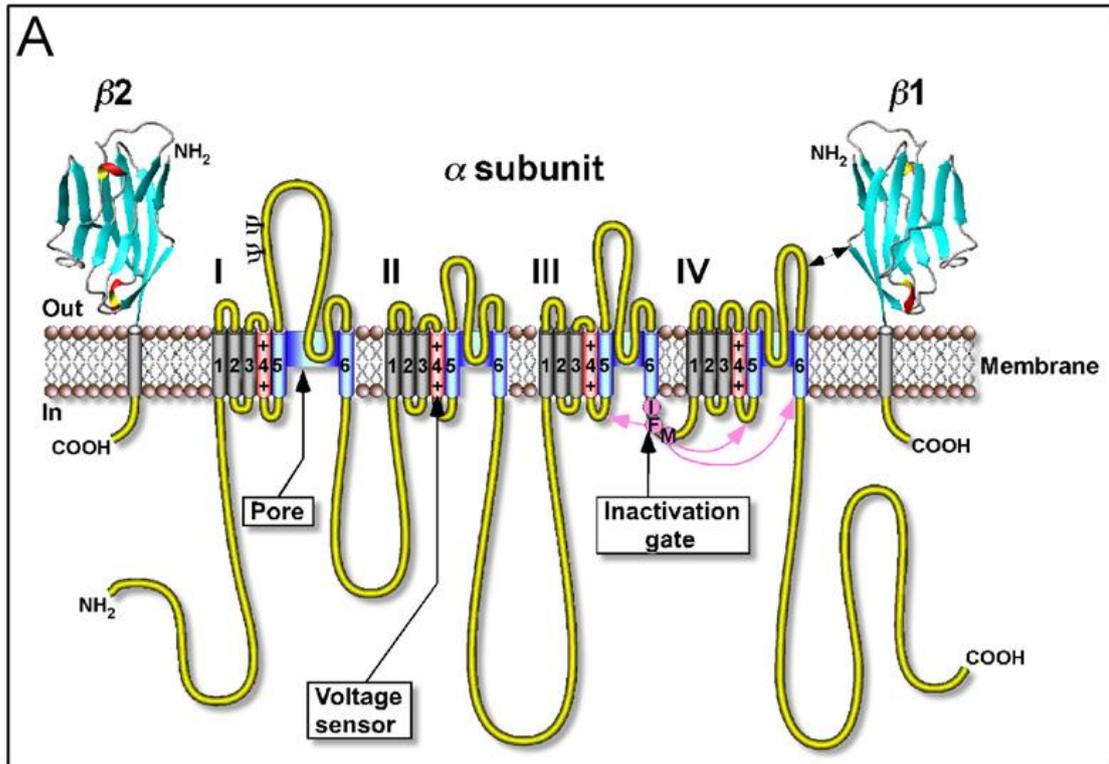


Figura 2: Estrutura molecular dos canais de sódio dependentes de voltagem ( $\text{Na}_v$ ) e locais de ligação das neurotoxinas. (A) Representação esquemática das estruturas das subunidades constituintes dos  $\text{Na}_v$ , mostrando a subunidade  $\alpha$  com os quatro domínios homólogos no centro e as

subunidades  $\beta$  auxiliares. Os cilindros (S1-S6) representam os segmentos de  $\alpha$ -hélice supostos dentro de cada domínio, onde os segmentos S4 (vermelho) representam os sensores de voltagem. A cadeia polipeptídica representada pela fita amarela é aproximadamente proporcional ao comprimento da cadeia de aminoácidos. A região de inativação (magenta) é representada pela partícula de inativação (resíduos hidrofóbicos IFM) com setas na mesma cor indicando os locais que supostamente formam o canal receptor responsável pela inativação. Os segmentos lineares do poro, S5 e S6, que formam as paredes da via de condução dos íons são mostrados em azul. Os domínios extracelulares das subunidades  $\beta 1$  e  $\beta 2$  são mostrados e representados como estruturas do tipo imunoglobulinas, similares à proteína mielínica P0.  $\Psi$ , locais de provável N-glicosilação. (B) Locais nos canais  $\text{Na}_v$  onde se ligam neurotoxinas conhecidas. Os círculos verdes representam os anéis de resíduos de aminoácidos exteriores (EEDD) e interiores (DEKA) que formam o filtro de seletividade e o sítio 1 do receptor de neurotoxina proposto para toxinas guanidínicas solúveis em água, tetrodoxina (TTX), saxitoxina (STX). Alguns locais de ligação de  $\mu$  toxinas praticamente se sobrepõem àqueles da TTX e foram omitidos para clareza. No caso dos sítios dos receptores 3 e 4, somente áreas onde existem mais de cinco locais de ligação foram indicados. As toxinas de aranhas seletivas a esses canais estão identificadas por em texto vermelho. Fonte: Nicholson, 2007.

#### 1.3.4 Ação em canais de potássio

Os canais de potássio constituem o maior e mais diversificado subgrupo de canais iônicos e desempenham funções regulatórias centrais, tais como: regulação do potencial de membrana da célula, regulação da liberação de neurotransmissores, da frequência cardíaca, da secreção de insulina, da excitabilidade neuronal e da contração muscular (Corzo *et al.*, 2003a; Shieh *et al.*, 2000). Os canais  $\text{K}^+$  são tipicamente tetrâmeros, constituídos por quatro subunidades  $\alpha$  formadoras de poro e em alguns casos subunidades  $\beta$  adicionais que regulam a função do canal (Beleboni *et al.*, 2004). Esses domínios que circundam o poro são sensíveis a voltagem e se movimentam em resposta a mudanças na voltagem da membrana celular, promovendo a abertura do poro (Milescu *et al.*, 2007).

Os canais de  $\text{K}^+$  são classificados em três diferentes tipos de canais: (a) canais de potássio retificadores de entrada, (b) canais de potássio voltagem dependente e (c) canais de potássio com domínio de dois poros (Corzo *et al.*, 2003a).

Dentre os componentes ativos encontrados nos venenos de aranhas, os peptídeos que atuam em canais de potássio são os menos abundantes (Grishin, 1999). Todavia, existem relatos de algumas toxinas de aranha que atuam em canais de potássio. Um desses exemplos são as toxinas homólogas Hanatoxina 1 e 2 (HaTx1 e HaTx2), isoladas do veneno da tarântula chinesa *Grammostola spatulata*, que bloqueiam canais  $K_v2.1$ , em concentrações nanomolares (Swartz *et al.*, 1995).

As pirotóxicas (PaTxs) encontradas no veneno da tarântula chilena *Phrixotrichus auratus* bloqueiam exclusivamente os canais de potássio dependentes de voltagem dos tipos  $K_v4.2$  e  $K_v4.3$  (Diochot *et al.*, 1999). As hanatoxinas, as heteropodatoxinas e as pirotóxicas apresentam uma estrutura peptídica similar, compostas de 28 a 32 aminoácidos e com grande homologia entre si (Corzo *et al.*, 2003a).

A argiotoxina 636 (Arg-636), isolada do veneno da aranha *Argiope* sp. é uma acilpoliamina que inibe canais de sódio dependentes de ligantes e também inibe canais de  $K^+$  dependentes de voltagem do subtipo Kir2.1 (Lee *et al.* 1999).

As heteropodatoxinas (HpTx1 e HpTx2), isoladas do veneno da aranha *Heteropoda venatória* apresentam alta similaridade com as toxinas HaTx1 e HaTx2. Experimentos com miócitos ventriculares isolados do coração de ratos mostraram que as mesmas prolongam o potencial de ação, sugerindo que estes peptídeos bloqueiam canais de  $K^+$  (Sanguinetti *et al.*, 1997).

O peptídeo stromatoxina (ScTx1), isolado do veneno da tarântula *Stromatopelma calceata*, foi caracterizado como um forte inibidor dos canais de potássio dos subtipos  $K_v4.2$  e  $K_v2.2$  ( $EC_{50} = 21.4$  nM). Entretanto, esse mesmo peptídeo inibiu fracamente os canais dos subtipos  $K_v2.1$  e  $K_v2.1/K_v9.3$  (Escoubas *et al.*, 2002).

As toxinas que interagem com canais iônicos dependentes de voltagem atuam basicamente através de dois mecanismos: a toxina pode se ligar no exterior da cavidade central do poro condutor de íons e inibir o fluxo dos íons (Miller, 1995); ou a toxina se liga em alguma região do canal provocando mudanças conformacionais que alteram os mecanismos de abertura, de fechamento ou de inativação desse canal (Wang e Strichartz, 1983). A estrutura obtida por raio-X do canal de  $K_v1.2$  de mamíferos (Figura 3) ilustra os dois locais dos canais de  $K_v$  que são alvos de toxinas (Long *et al.*, 2005).

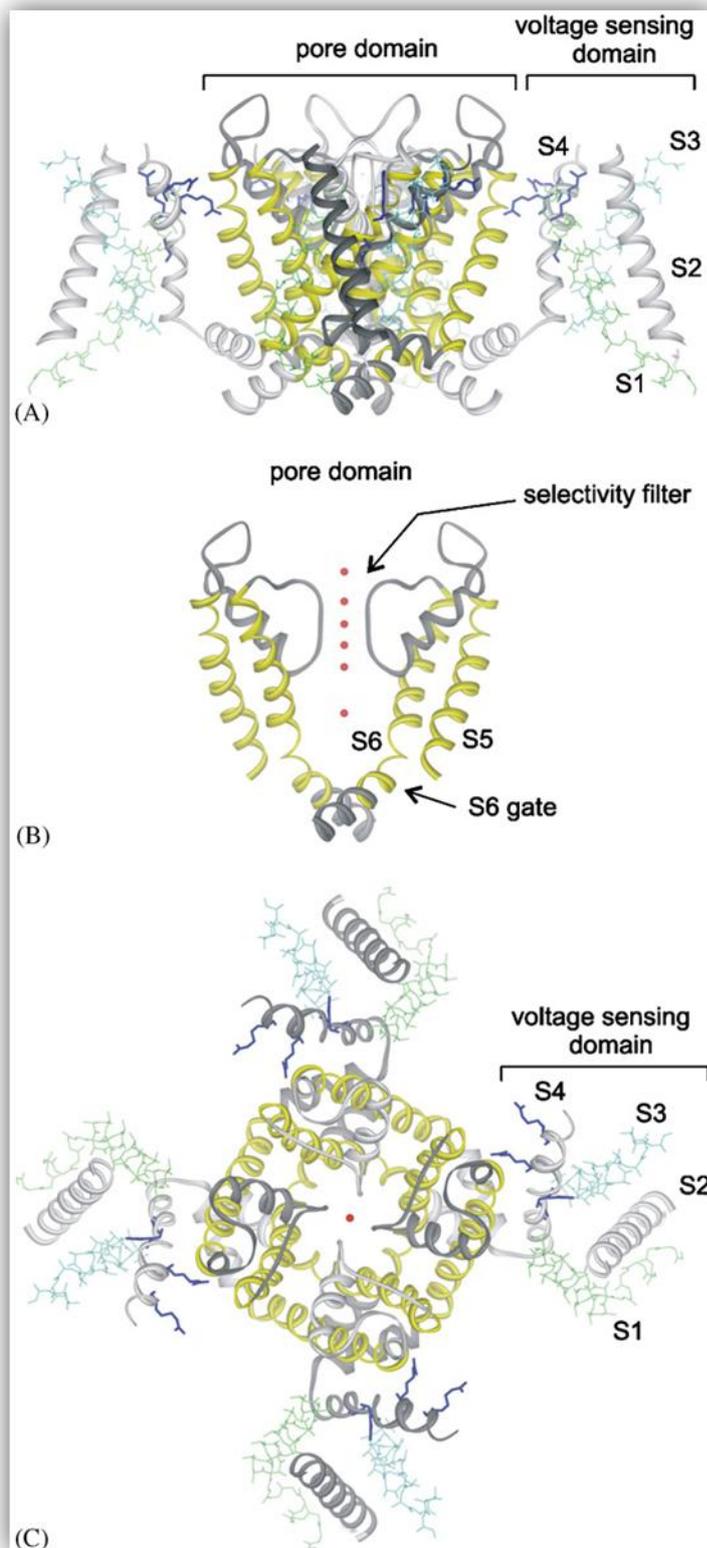


Figura 3: Estrutura obtida por raio-X do canal de  $K_v1.2$ . (A) Vista lateral da estrutura tetramérica do canal de  $K_v1.2$  orientada de forma que a região extracelular da membrana está posicionada no topo. (B) Visão lateral sem as subunidades frontais e traseiras e sem os quatro domínios sensores de voltagem, removidos para melhor visualização do poro e da passagem dos íons. As esferas

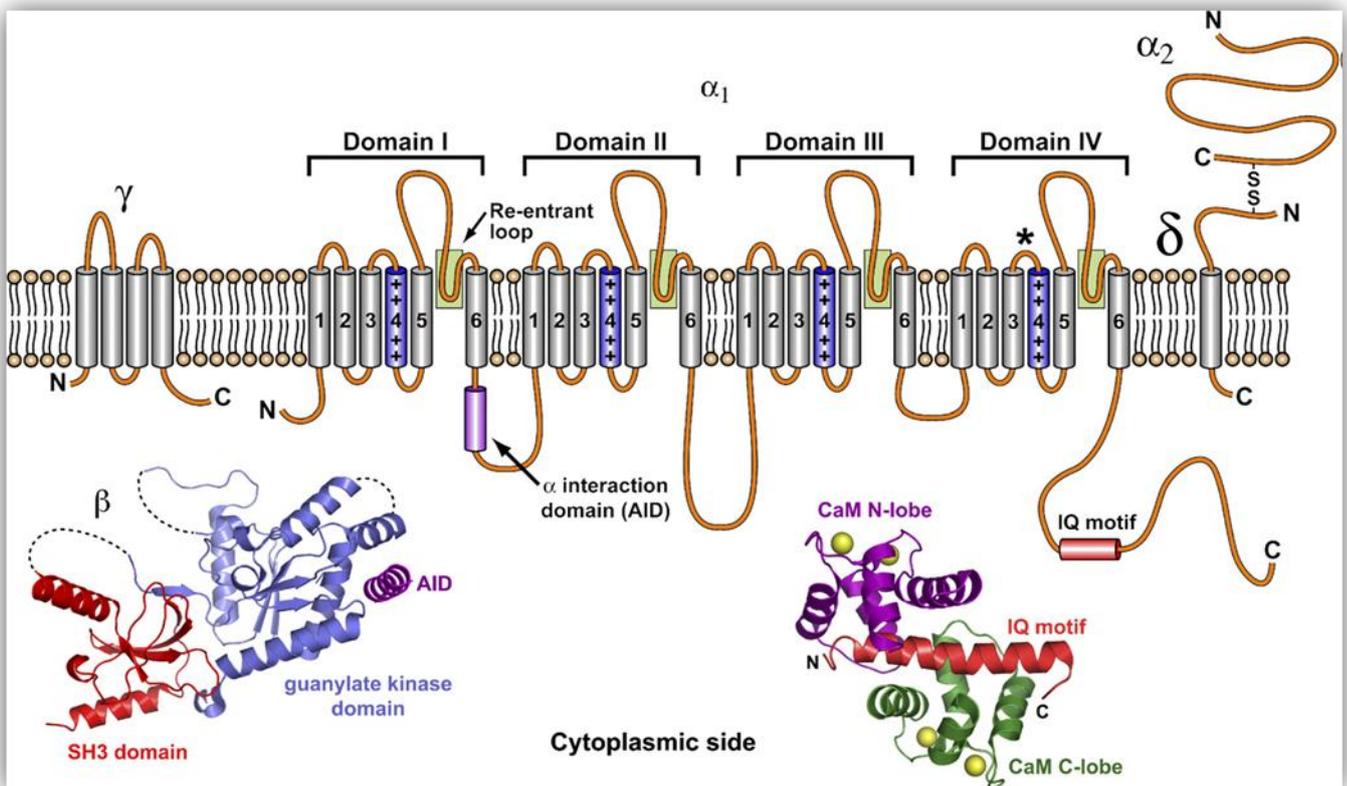
vermelhas são íons potássio ligados ao poro, marcando o local da via de passagem dos íons. (C) Vista da estrutura do canal Kv1.2 na região exterior da membrana. Os dois locais alvos de toxinas estão identificadas por setas. Fonte: Long et al., 2005.

### 1.3.5 Ação em canais de cálcio voltagem-sensível

Os canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) formam poros na membrana que se abrem em resposta à sua despolarização, permitindo o influxo de íons cálcio do meio externo. Esses canais participam de diversos processos intracelulares, incluindo contração muscular, liberação de hormônios e de neurotransmissores, neurotransmissão, regulação de atividades enzimáticas e da expressão de genes. Eles são divididos em duas grandes superfamílias baseados na ativação dependente de voltagem: os canais ativados por baixa voltagem (LVA) são ativados por pequenas despolarizações na membrana e apresentam rápida inativação dependente de voltagem; os canais ativados por alta voltagem (HVA) são ativados apenas por grandes despolarizações e inativados mais lentamente (King 2007). Dentro dessas superfamílias existem cinco canais de cálcio descritos em vertebrados, onde os canais de baixa voltagem compreendem os canais do tipo-T, e os canais de alta voltagem compreendem os canais do tipo-L, N, P/Q e R (Wheeler *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1993; Llinas *et al.*, 1989). Os canais do tipo-T possuem atividade modulatória do tipo marcapasso em células cardíacas e neuronais, enquanto que os canais de cálcio ativados por despolarizações mais intensas estão essencialmente ligados à liberação de neurotransmissores (Tsien *et al.*, 1991). Os canais do tipo-L, encontrados em células cardíacas, são alvo das dihidropiridinas usadas no tratamento de doenças cardiovasculares tais como a hipertensão. Os canais do tipo-P, tipo-N, tipo-Q e tipo-R estão relacionados ao sistema nervoso central e periférico (Escoubas *et al.*, 2000b).

A estrutura quaternária dos canais de  $Ca_v$  HVA é mais complexa que a dos canais de  $Na_v$  e que a dos canais de  $K_v$ , sendo constituída por tipicamente 4-5 subunidades: (i) uma subunidade formadora de poro  $\alpha_1$  de ~170-250 kDa; (ii) uma subunidade extracelular  $\alpha_2$ ; (iii) uma subunidade transmembrana  $\delta$  que é covalentemente ligada a  $\alpha_2$  via ponte dissulfeto, formando o complexo  $\alpha_2$ - $\delta$ , de ~170 kDa; uma subunidade intracelular  $\beta$  de 50-78 kDa; em alguns casos uma subunidade

transmembrana  $\gamma$  de 25-36 kDa também está presente. Já os canais de  $\text{Ca}_v$  LVA parecem ser constituídos por apenas uma subunidade formadora de poro  $\alpha_1$ , com pequenas evidências de regulação por subunidades adicionais. As subunidades  $\alpha_2$ - $\delta$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  dos canais HVA modulam propriedades da subunidade  $\alpha_1$ , tais como a cinética de ativação/inativação e a ativação dependente de voltagem. A subunidade  $\beta$  auxilia no tráfego de  $\alpha_1$  para a membrana plasmática. Os canais de cálcio dependentes de voltagem têm papel fundamental na neurofisiologia de insetos e sabe-se que a maior parte dos venenos de aranhas possui peptídeos que interferem nas funções desses canais (King 2007) (Figura 4).



**Figura 4:** Estrutura molecular das subunidades dos canais de  $\text{Ca}_v$  encontrados nas membranas celulares. Os canais de  $\text{Ca}_v$  HVA são geralmente formados por uma única cópia de cada subunidade ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ - $\delta$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ), enquanto que os canais de  $\text{Ca}_v$  LVA consistem de uma única subunidade formadora de poro  $\alpha_1$ . A subunidade  $\alpha_1$  é formada por quatro domínios homólogos (I-IV) que se dispõem de forma circular formando o poro, onde as hélices S5 e S6 e as espirais (verde claro) formam as paredes do poro. A hélice transmembrana S4 (azul) é carregada positivamente e atua como sensor de voltagem, permitindo a abertura e fechamento do canal em resposta a mudanças no potencial de membrana. As espirais extracelulares S3-S4 do domínio IV, que representam pelo menos parte do local de ligação da toxina  $\omega$ -Aga-IVA, são identificadas por asterisco. A subunidade intracelular  $\beta$  é formada por um domínio SH3 N-terminal (vermelho) e por um domínio guanilato quinase C-terminal (azul). O domínio guanilato quinase se liga ao domínio

de interação (AID; magenta) localizado nos domínios de ligação citoplasmáticos I e II de  $\alpha 1$ , e essa interação modula a taxa de inativação do canal. A calmodulina (CaM) interage com os canais  $Ca_v1$  e  $Ca_v2$  através de um motivo conservado (o motivo IQ) localizado na região citoplasmática C-terminal de  $\alpha 1$ . Os lobos N- e C-terminais da CaM (magenta e verde respectivamente) se ligam ao domínio IQ (vermelho) em diferentes locais e com diferentes afinidades, tornando essa interação sensível tanto para os níveis globais de cálcio quanto para a concentração do cálcio presente na vizinhança do poro do canal  $Ca_v$ . Os íons cálcio ligantes à CaM e ao complexo CaM-IQ são indicados por esferas amarelas. A interação Cam-IQ tem um papel fundamental na auto-regulação da atividade do canal de  $Ca_v$  via inativação dependente de cálcio e possivelmente facilitação dependente de cálcio. As subunidades  $\alpha 2$  e  $\delta$  se originam de uma única cadeia polipeptídica que é clivada pós-tradução para resultar em duas cadeias ligadas covalentemente via pontes dissulfeto. Fonte: King, 2007.

Diversos peptídeos tóxicos com ação nos  $Ca_v$  já foram encontrados em venenos de aranhas e dentre eles podem ser citadas as toxinas presentes no veneno da aranha *Hololena curta* (Lundy et al., 1993), as toxinas PhTx do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (Araujo et al., 1993; Cassola et al., 1996; Guatimosim et al., 1997), as  $\omega$ -atracotoxinas da aranha *Hadronyche sp.* (Fletcher et al., 1997) e a  $\omega$ -grammotoxina do veneno da aranha *Grammostola spatulata* (McDonough et al., 1997; Piser et al., 1994). Sabe-se que a toxina II isolada do veneno da aranha *Plectreurys tristis* bloqueia correntes pré-sinápticas de canais  $Ca_v$  em terminais nervosos de *Drosophila* (Branton et al., 1987; Leung et al., 1989).

Das toxinas de aranha estudadas até o momento, o veneno da aranha americana *Agelenopsis aperta* é o mais bem caracterizado em nível molecular. Ele possui um grande arranjo de toxinas peptídicas que atuam em canais de  $Ca_v$  ( $\omega$ -agatoxinas) e canais de  $Na_v$  ( $\mu$ -agatoxinas), assim como acilpoliaminas de baixo peso molecular ( $\alpha$ -agatoxinas) que antagonizam receptores de glutamato de forma não competitiva (Adams, 2004). As  $\omega$ -agatoxinas são ativas tanto para canais de  $Ca_v$  de vertebrados quanto para os de invertebrados (Mintz et al., 1992).

SF1 é um membro de uma família de peptídeos inseticidas homólogos, isolados do veneno da aranha *Segestria florentina*, altamente seletivos (agonistas/antagonistas) a diferentes canais de  $Ca_v$ . Essas toxinas matam as larvas do tabaco *Heliothis virescens* com valores de  $LD_{50}$  na faixa de 1000-2000 pmol/g, mas não possuem efeitos negativos quando injetadas via intravenosa em camundongos (Lipkin et al., 2002).

Os peptídeos  $\omega$ -ACTX-1 são toxinas de 36-37 resíduos e foram primeiramente isolados dos venenos das aranhas australianas dos gêneros *Atrax* e *Hadronyche*

(Fletcher et al., 1997; Wang et al., 1999; Chong et al., 2006). Essas toxinas atuam em canais de  $Ca_v$  e são muito tóxicas para vários tipos de insetos (Tedford et al., 2004a; Tedford et al., 2004b; Khan et al., 2006) e carrapatos (Mukherjee et al., 2006), porém são inofensivas para camundongos recém-nascidos e não possuem efeito em preparações músculo-nervosas de vertebrados (Fletcher et al., 1997; Chong et al., 2006).

O peptídeo recombinante LTx2 obtido em nosso laboratório bloqueou canais de cálcio tipo-L e inibiu a recarga de  $Ca^{2+}$  a partir de estoques intracelulares, eliminando as oscilações de cálcio livre promovido pelo receptor InsP3 (Dutra *et al.*, 2008).

Além de ser uma ferramenta importante para caracterização dos canais de  $Ca_v$  de insetos, as toxinas de aranha que modulam esses canais podem auxiliar no desenvolvimento de novos métodos para controle de pestes (Bloomquist, 2003), pois ainda que apenas uma minoria dos insetos e outros artrópodes sejam classificados como pestes, eles destroem nada menos que 20% do suprimento alimentício do planeta (Oerke, 1994) e transmitem uma grande variedade de doenças a humanos e animais (Tedford et al., 2004b).

### **1.3.6 Importância na área de saúde pública**

Algumas aranhas possuem importância médica devido ao número de acidentes causados por picadas em humanos. Dentre essas aranhas destacam-se as pertencentes aos gêneros *Phoneutria* (aranha armadeira), *Latrodectus* (viúva-negra), *Loxosceles* (aranha marrom) e *Atrax* (aranha teia de funil), com casos de óbitos documentados (Escoubas *et al.*, 2000b).

As aranhas do gênero *Phoneutria* são extremamente agressivas e quando se sentem ameaçadas armam imediatamente o bote, apoiando-se nas patas traseiras, levantando as patas dianteiras e os palpos, abrindo as quelíceras e deixando à mostra os ferrões. Quatro espécies de aranhas *Phoneutria* (*Phoneutria nigriventer*, *P. fera*, *P. keyserlingi*, e *P. reidy*) já foram reportadas no Brasil. Estas espécies podem ser encontradas em todas as regiões brasileiras exceto na região Nordeste. São animais de hábitos errantes e noturnos, que podem medir até 15 cm de envergadura. A maioria dos acidentes dentro de residências e em suas proximidades acontecem à noite, período em

que essas aranhas saem para caçar (Bucarechi *et al.*, 2000; Ministério da Saúde do Brasil, 2001; Lucas, 1988). A ação do veneno é neurotóxica e cardiotoxica. A ação neurotóxica ocorre no sistema nervoso central, mais precisamente nos canais de sódio (Cartillo & Patiño, 2002).

Os acidentes causados pelas aranhas do gênero *Loxosceles* são muito perigosos devido à ação dermonecrotica de seu veneno. Sua picada causa lesões cutâneas que se propagam ao redor da ferida, onde as manifestações clínicas mais comuns são insuficiência renal, coagulação intravascular disseminada e hemólise intravascular (da Silva *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2006; Wasserman *et al.*, 1983). A evolução do quadro de envenenamento para os demais sistemas é menos comum do que as manifestações cutâneas, mas podem acarretar complicações letais (Felicori *et al.*, 2006).

As aranhas do gênero *Latrodectus* são encontradas em todo o mundo. No Brasil há incidência das espécies *Latrodectus curacaviensis*, *L. gemeticus* e *L. Mactans*, principalmente nas regiões litorâneas do nordeste e do sudeste (Ministério da Saúde do Brasil, 2001; Lucas, 1988). A picada desta aranha é causada somente pelas fêmeas, sendo geralmente indolor; porém os sintomas são graves e dolorosos. A ação do veneno, altamente neurotóxico, provoca dores abdominais e em membros inferiores, náuseas, espasmos musculares, sudorese, elevação da pressão do fluido cérebro-espinhal e paralisia respiratória (Ministério da Saúde do Brasil, 2001; Rash *et al.*, 2002; Lucas, 1988; Ruppert *et al.*, 2005; Timms *et al.*, 1986). O tratamento de acidentes com viúvas-negras é feito com soro e anti-veneno (Heard *et al.*, 1999; Isbister *et al.*, 2003; Peterson, 2006; Timms *et al.*, 1986; Vetter *et al.*, 2008).

Embora não existam relatos de mortes de humanos decorrentes de picadas de aranhas caranguejeiras (Escoubas *et al.*, 2004; Schmidt, 1989), Isbister e colaboradores, em 2003, demonstraram a ação do veneno da tarântula *Stromatopelma* sp em cães e em humanos, que levou ao óbito de sete animais e causou disritmia cardíaca nos humanos (Isbister *et al.*, 2003). O veneno das tarântulas parece afetar invertebrados e vertebrados com diferente intensidade, provavelmente relacionado aos hábitos alimentares naturais destas espécies (Escoubas *et al.*, 2004).

#### 1.4 Estudos com o veneno da aranha *Lasiadora sp*

Os estudos desenvolvidos com o veneno da aranha *Lasiadora sp* mostraram resultados promissores, mas ainda há muito para ser explorado. Experimentos realizados com o veneno bruto dessa aranha mostraram que o mesmo age em canais iônicos de invertebrados e de pequenos vertebrados (Kalapothakis *et al.*, 2003; Kushmerick *et al.*, 2001).

Através de técnicas de visualização de  $Ca^{2+}$  e de *patch clamp* em células GH3, utilizando como ferramenta a Tetodrotoxina (TTX), que é um antagonista específico capaz de bloquear canais de  $Na^+$  sensíveis à sua ação, Kushmerick e colaboradores mostraram que o veneno da *Lasiadora sp* aboliu as oscilações de  $Ca^{2+}$  normalmente presentes em nível basal nestas células e reduziu o nível de  $Ca^{2+}$  intracelular. Já na ausência da TTX, o mesmo veneno causou um aumento lento nos níveis do  $Ca^{2+}$  intracelular, o que sugere que outras moléculas presentes no veneno participem do bloqueio de canais de cálcio tipo-L (Kushmerick *et al.*, 2001).

O veneno dessa aranha também é capaz de retardar a cinética de despolarização dos canais de  $Na^+$  e promover o surgimento de uma corrente que permanece mesmo após a despolarização do canal, tornando incompleta a sua inativação. Experimentos realizados em coração isolado de rato mostraram que o veneno da *Lasiadora sp* causou um aumento na liberação de acetilcolina na extremidade dos nervos parassimpáticos por ativar canais de  $Na^+$  resistentes à Tetodrotoxina TTX. Uma dose de 100 $\mu$ g do veneno causou bradicardia, distúrbios rítmicos e parada cardíaca transitória. Com esse resultado foi sugerido que o veneno dessa aranha provavelmente age sobre canais de  $Na^+$  resistentes à TTX, pois, mesmo na presença de 200 nM da TTX os efeitos do veneno da *Lasiadora sp* não foram suprimidos (Kalapothakis *et al.*, 2003).

O fracionamento do veneno bruto dessa aranha através de cromatografia de filtração molecular (Sephadex G-50 Fine - Pharmacia) resultou em três frações que foram denominadas P1, P2 e P3. Essas frações foram submetidas a testes para determinar sua atividade em vertebrados e em invertebrados. Os resultados dos testes sugerem que todas as três frações possuem atividade tóxica em mamíferos, porém apenas as frações P2 e P3 apresentam ação tóxica contra organismos invertebrados,

sendo que a fração P3 apresentou maior efetividade nas condições testadas (de Deus, 2003).

Com o objetivo de identificar e caracterizar os peptídeos tóxicos presentes no veneno da aranha *Lasiadora* sp foi construída uma biblioteca de cDNA a partir do mRNA extraído das glândulas de veneno dessa aranha. A varredura da biblioteca foi feita pela técnica de ELISA (Engvall et al., 1971), utilizando antisoro policlonal anti-veneno total. Quatro toxinas que compõem o veneno foram caracterizadas por sequenciamento e nomeadas LTx1, LTx2, LTx3 e LTx5 (Vieira, 2005). A biblioteca também foi analisada com anticorpos anti fração P3 (de Moura, 2004). Nesta varredura foram identificados 7 clones que apresentavam a sequência codificante para a toxina LTx1. A similaridade entre a LTx1 com diversas toxinas de aranhas já descritas e com ação inseticida comprovada, tais como as toxinas HWTX-II da aranha *Selenocosmia huwena* (Shu et al., 1999), a toxina ESTX da aranha *Eurypelma californicum* (Savel-Niemann, 1989; Kaiser et al., 1994) e a toxina TXP1 da aranha *Brachypelma smithii* (Kaiser et al., 1994), sugere uma possível ação da LTx1 em invertebrados. Nesta mesma varredura também foram identificados 4 clones codificantes para a toxina LTx4 (de Moura, 2004). Após análise da sequência da LTx4, percebeu-se que a mesma apresenta similaridade com toxinas de ação comprovada em organismos vertebrados, como as toxinas Magi 1 e Magi 4 (Corzo et al., 2003b) isoladas da glândula de veneno da aranha *Macrothele gigas*, com a conotoxina Vx-VIb isolada do molusco marinho *Conus vexillum*, e com a neurotoxina Tx3-2 da aranha *Phoneutria nigriventer* (Cordeiro et al., 1993), sugerindo assim uma possível ação da LTx4 em vertebrados. Entretanto, em 2008, Corzo e colaboradores mostraram que a toxina Bs1 (da aranha *Brachypelma smithii*) não apresentou atividade sobre diversos canais de Nav típicos de mamíferos. Porém, em concentração de 2 mM, afetou o canal iônico específico de insetos Para/tipE, onde se observou uma pequena mudança nas correntes de sódio, o que justifica a atividade letal de Bs1 em testes in vivo realizados com grilos. Receptores homólogos aos encontrados no canal Para/tipE são observados em outros insetos tais como baratas, moscas domésticas, grilos e larvas do tabaco. Nesse mesmo trabalho foi mostrado que a toxina Bs1 possui 61% de identidade com a toxina LTx4 (Corzo et al., 2008).

Em nosso laboratório a sequência codificante para a toxina LTx2 foi sub-clonada no vetor de expressão pET11a (Novagen). O peptídeo foi expresso em *E. coli*

BL21(DE3) e purificado por cromatografia líquida de fase reversa de alta performance (HPLC) (Dutra, 2006). Experimentos eletrofisiológicos, em células musculares BC3H1, mostraram que a LTx2 recombinante bloqueia canais de cálcio tipo-L e inibe a recarga de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir dos estoques intracelulares, eliminando as oscilações de cálcio livre promovido pelo receptor InsP3. Devido a alta similaridade da LTx2 com as toxinas LTx1 e LTx3, acredita-se que essas três toxinas possuam mecanismos de ação semelhantes (Dutra *et al.*, 2008). Como as toxinas LTx4 e LTx5 possuem sequências bem distintas, tanto quando comparadas com a LTx1, LTx2 e LTx3, quanto entre si, é muito provável que elas atuem em diferentes canais iônicos e/ou que tenham diferentes mecanismos de ação.

A disponibilidade de material biológico é um fator limitante para as pesquisas que objetivam a caracterização dos componentes encontrados em venenos. Esse fator limitante pode ser superado pelo uso da tecnologia do DNA recombinante, onde a expressão heteróloga de proteínas em *E. coli* permite produção em larga escala, o que facilita o estudo de genes, seja de interesse farmacológico, seja de interesse comercial, ou de interesse terapêutico (Huang *et al.*, 2008). Neste sentido, neste trabalho, optamos por tentar a expressão heteróloga de um dos componentes do veneno da aranha caranguejeira *Lasiadora* sp, mais especificamente o peptídeo maduro LTx4, com a intenção de caracterizá-lo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Subclonar a sequência codificante para a LTx4 em um vetor bacteriano, expressar o peptídeo recombinante e detectá-lo através de testes imunológicos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Amplificar, a partir do clone isolado da biblioteca de cDNA, a sequência codificante para o peptídeo LTx4;
- Proceder a ligação no vetor pET21b ou pET16b;
- Transformar células de *Escherichia coli* TOP10F' com o produto de ligação;
- Verificar a inserção do fragmento por PCR, cortes com endonucleases de restrição e sequenciamento;
- Induzir a expressão do peptídeo recombinante em *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS;
- Identificar o peptídeo por imunoblotting;
- Verificar se o peptídeo recombinante está sendo expresso na fração solúvel ou em forma de corpos de inclusão;
- Realizar ensaios de purificação do peptídeo usando de uma resina de afinidade.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Microorganismos

A cepa de *Escherichia coli* TOP10F' - Genótipo: F', mcr A, D (mrr-hadRMS – mcrBC) Ø 80DlacZ DM15, Dlacx74, deoR, recD1, araD139,D, 7697, galIU, galK, l-rs1p,end D1,nupG – foi usada em processos de transformação com produtos de ligação, para amplificação do DNA plasmidial *in vivo* e seqüenciamento.

A indução da expressão foi realizada na cepa de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. Genótipo:  $F' ompT hsdS_B (r_B m_B) gal dcm$  (DE3) pLysSRARE (Cam<sup>r</sup>).

#### 3.2 Meios de cultura

##### 3.2.1 Composição do meio LB (Luria-Bertani)

1% de triptona (p/v), 0.5% de extrato de levedura (p/v), 1% de NaCl (p/v), pH ajustado para 7.5 com NaOH. Para meio sólido foi adicionado 1.5% de ágar (p/v).

##### 3.2.2 Composição do meio LB-XIA

Preparado com adição de 20 µg/mL de X-GAL, 1mM de IPTG e 100µg/mL de ampicilina ao meio LB.

##### 3.2.3 SOC

Composto por 2% de triptona (p/v), 0,5% de extrato de levedura (p/v), 0,05% de NaCl (p/v), 1mL de KCl 250mM (em 100mL de meio). O pH foi ajustado em 7,0 e o meio esterelizado em autoclave. Após resfriamento foram adicionados 500µL de MgCl<sub>2</sub> 2M e 2mL de glicose 1M estéril (em 100mL de meio).

### **3.2.4 Meio Circlegrow (MP Biomedicals, LLC)**

Preparado na concentração de 40g/L e pH 7.5.

### **3.3 Reagentes e soluções**

- IPTG: Dissolvido em água deionizada estéril na concentração 100mM no momento do uso.
- PMSF: Dissolvido em isopropanol na concentração final de 100 mM e estocado a -20°C.
- Ampicilina: Dissolvida em água deionizada estéril na concentração final de 10 mg/mL e estocada a - 20°C.
- Estreptomicina: Dissolvida em água deionizada estéril na concentração de 20 mg/mL e estocada a -20°C.
- Tetraciclina: Dissolvida em etanol na concentração de 15 mg/mL e estocada a - 20°C.
- GET (Glicose/EDTA/Tris): Composto por Tris-HCl 25 mM pH 8,0; glicose 50 mM e EDTA 10 mM.
- Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>): Preparado na concentração de 0,1 M, autoclavado e estocado a -20°C.

#### **3.3.1 Soluções para gel de agarose**

- TAE (Tampão Tris-acetato): Solução estoque 10X: 48,8 g de Tris, 20 mL de EDTA 0,5 M. pH ajustado para 8,0 com ácido acético glacial e volume final completado para 1 litro.
- Tampão de amostra: 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 30% de glicerol.
- Brometo de etídio (10mg/mL): Diluído 20X em tampão TAE1X na hora do uso.

### **3.3.2 Soluções para extração de DNA plasmidial**

- STET: 8% p/v de sacarose, 0,1% v/v de Triton X-100, 50mM de EDTA, 50mM de Tris-HCl. Ajustar o pH para 8,0.
- Lisozima: Diluída em água deionizada para uma concentração de 50 mg/mL.
- CTAB: Diluído em água deionizada para uma concentração de 5% p/v.
- NaCl: preparado em concentração de 1,2 M e autoclavado.
- Etanol: 100% e 70% (mantidos a -20°C).

### **3.3.3 Soluções para SDS-Tricina-PAGE**

- Tampão do Anodo: Constituído por Tris-base 2 M, pH 8,9.
- Tampão do Catodo: Constituído por Tris-base 1 M, SDS 1% (p/v), pH 8,5.
- Tampão do Gel: Constituído por Tris-base 3 M, SDS 0,3% (p/v), pH 8,45.
- Persulfato de amônio (PSA): Dissolvido em água deionizada na concentração de 10% (p/v).
- Tampão da amostra (com agente redutor – 2X concentrado): 1ml de solução C, 0,8 mL de glicerol, 1,6mL de SDS 10%, 0,2mL de azul de bromofenol 0,2%, 0,4mL de  $\beta$ -mercaptoetanol.

### **3.3.4 Solução para coloração de SDS-PAGE com prata**

- Fixação: 50% de metanol; 12% de ácido acético glacial; 38% de água destilada;
- Pré-Tratamento: 0,04 g de Tioissulfato de sódio em 100 mL de água destilada;

- Impregnação: 0,1 g de nitrato de prata; 75 µL de formaldeído 37%; 100 mL de água destilada;
- Revelação: 6 g de carbonato de sódio; 50 µL de formaldeído 37%; 2 mL da solução de tiosulfato 0,04%; 100 mL de água destilada.

### **3.3.5 Soluções para Western blot e Dot blot**

- PBS: Solução estoque 10X: Composto por 80 g de NaCl, 2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 11 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g de KCl em 1 litro de água destilada. Autoclavar e armazenar a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Solução de Bloqueio: 5% de leite em pó desnatado em solução de PBS 1X - Tween 0,05%;
- Solução Reveladora: 6 mg de diaminobenzidina em 6mL de PBS 1X; 3mg de 4-cloro-1-naftol em 1mL de metanol e 5mL de PBS 1X; 10µL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%.
- Tampão de transferência (somente para Western blot): 25 mM de Tris; 192 mM glicina; 10% de metanol v/v; pH 8.3.

### **3.4 Vetores de clonagem e expressão**

Para a execução dos experimentos de clonagem e de expressão da proteína recombinante foram realizadas tentativas de clonagem nos sistemas bacterianos pET21b (Novagen) e pET16b (Novagen).

#### **3.4.1 Obtenção dos plasmídeos pET21b e pET16b**

Células de *E. coli* da linhagem TOP10F' foram tornadas competentes pelo método químico do CaCl<sub>2</sub> e os DNAs plasmidiais pET21b e pET16b foram inseridos por choque térmico. Após transformação, as células foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (100µg/mL). As colônias resultantes foram coletadas com auxílio de palito de dente estéril e então inoculadas em 3mL de meio LB caldo, contendo 100µg/mL de ampicilina, e cultivadas por 16 horas a 37°C. . Após crescimento, 1,5 mL da cultura foram coletados em tubos para microcentrifuga e o DNA plasmidial foi obtido pelo método de miniprep (descrito em 3.9).

#### **3.4.2 Sub clonagem da sequência codificante para a LTx4 nos vetores de expressão pET21b e pET16b**

Os DNAs plasmidiais obtidos por miniprep foram digeridos com enzimas de restrição para a obtenção extremidades coesivas que, posteriormente, seriam ligadas aos produtos de PCR cortados com as mesmas enzimas.

Um clone da biblioteca de cDNA da aranha *Lasiadora* sp, contendo a sequência codificante para a toxina LTx4 (de Moura, 2004), foi usado como molde para a amplificação da região correspondente à toxina madura. Além disso, como mais uma alternativa de clonagem, desenhou-se uma sequência da toxina contendo códons mais frequentes em *E. coli*, com o propósito de cloná-la no plasmídeo pET16b.

### 3.4.3 Digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição

As reações de digestão foram conduzidas nas seguintes condições para o plasmídeo pET21b:

- 14  $\mu\text{L}$  do DNA plasmidial
- 4,0  $\mu\text{L}$  de tampão TANGO 10X (Fermentas)
- 1  $\mu\text{L}$  de *BamHI* ou 1  $\mu\text{L}$  de *NdeI*
- 1  $\mu\text{L}$  de *XhoI*

A mistura foi incubada a 37°C por 16 horas.

Para a digestão do pET16b a reação foi a seguinte:

- 17  $\mu\text{L}$  do DNA plasmidial
- 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão específico (Unique) para *BamHI* 10X (Fermentas)
- 1  $\mu\text{L}$  de *BamHI*

A mistura foi incubada por 16 horas a 37°C. O DNA cortado foi purificado e então digerido pela segunda enzima de acordo com a seguinte reação:

- 17  $\mu\text{L}$  do DNA plasmidial previamente digerido por *BamHI*
- 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão O 10X (Fermentas)
- 1  $\mu\text{L}$  de *NdeI*

A mistura foi incubada a 37°C por 16 horas.

### 3.4.4 Defosforilação dos plasmídeos digeridos

Após a digestão todos os DNAs plasmidiais foram submetidos à defosforilação pela adição de 1  $\mu\text{L}$  de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) e 5  $\mu\text{L}$  do tampão da SAP 10X. Adicionou-se água deionizada para um volume final de 50  $\mu\text{L}$  e a reação foi mantida a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, a 65°C por 15 minutos. O material foi então purificado.

### 3.5 Amplificação da sequência da LTx4 madura

Iniciadores foram desenhados para permitirem a amplificação do peptídeo maduro e para adicionar sequências adaptadoras a endonucleases de restrição. Para o plasmídeo pET21b foram desenhados iniciadores contendo sítios para *Bam*HI (iniciador direto), *Nde*I (iniciador direto) e *Xho*I (iniciador reverso). Já para o plasmídeo pET16b os iniciadores foram desenhados com sítios para *Nde*I (iniciador direto) e *Bam*HI (iniciador reverso). As sequências dos iniciadores são mostradas abaixo:

Iniciadores para pET21b	Sequências
Direto ( <i>Bam</i> HI)	5' - CGG <u>GAT CCT</u> GTG GAG GGG TAG AT - 3'
Reverso ( <i>Xho</i> I)	5' - CCG <u>CTC GAG</u> ACG TTC CCT TTT TCT - 3'
Direto ( <i>Nde</i> I)	5' - CGG <u>CAT ATG</u> TGT GGA GGG GTA GAT - 3'

Iniciadores para pET16b	Sequências
Reverso ( <i>Bam</i> HI)	5' - CGG <u>GGA TCC</u> TCA ACG TTC CCT TTT TCT - 3'
Direto ( <i>Nde</i> I)	5' - CGG <u>CAT ATG</u> TGT GGA GGG GTA GAT - 3'

A região sublinhada corresponde aos sítios de restrição adicionados aos iniciadores.

O clone contendo a sequência da LTx4 foi usado para a amplificação de sequência de interesse. A mistura de reação foi preparada da seguinte forma:

- 1,0 µL da colônia ou do DNA plasmidial
- 2,5 µL de dNTP's (2,5 mM)
- 2,5 µL de tampão *Taq* 10X
- 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 2,0 µL do iniciador direto (40 pmoles/µL)

- 2,0 µL do iniciador reverso (40 pmoles/µL)
- 0,75 µL de *Taq* DNA polimerase
- 13,5 µL de água Milli-Q estéril

Procedeu-se a reação em termociclador, conforme o ciclo descrito abaixo:

1. 94°C por 5 minutos
2. 94°C por 1 minuto
3. 54°C por 1 minuto
4. 72°C por 1 minuto
5. Etapa 2 a 4 (29 vezes)
6. 72°C por 5 minutos
7. Redução da temperatura a 4°C

Os produtos de PCR foram mantidos a -20°C até a sua purificação.

### 3.5.1 Digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição

Após purificação dos produtos de PCR procedeu-se a digestão dos mesmos com enzimas de restrição. O produto amplificado para ser ligado no plasmídeo pET21b foi digerido sob as seguintes condições:

- 14 µL do produto de PCR amplificado com iniciadores específicos para clonagem em pET21b
- 4,0 µL de tampão TANGO 10X (Fermentas)
- 1 µL de *Bam*HI ou 1µL de *Nde*I, de acordo com o iniciador direto utilizado na amplificação
- 1 µL de *Xho*I

A mistura de reação foi incubada a 37°C por 16 horas e depois purificada.

Já os produtos de PCR que seriam ligados em pET16b foram cortados nas condições descritas abaixo:

- 14 µL do produto de PCR amplificado com iniciadores específicos para clonagem em pET16b
- 4,0 µL de tampão TANGO 10X (Fermentas)
- 1 µL de *Bam*HI
- 1 µL de *Nde*I

Essa mistura reativa também foi mantida a 37°C por 16 horas e o produto da digestão foi purificado, posteriormente.

### 3.5.2 Construção da sequência da LTx4 com códons mais frequentes para *E.coli* e anelamento das fitas direta e reversa

Uma sequência da LTx4, construída com base nos códons mais frequentes para *E. coli*, foi comprada da empresa Alpha DNA (5584A Sherbrooke St. W, Montreal, Quebec H4A 1W3, Canadá). Foram sintetizadas duas fitas, complementares entre si, e contendo adaptadores para as enzimas de restrição *Nde*I e *Bam*HI, com o objetivo de ligar o gene sintético no plasmídeo pET16b. As sequências das fitas sintetizadas foram as seguintes:

- Fita direta: 5' – TATG TGC GGT GGT GTT GAT GCG CCG TGC GAT AAA GAC CGT CCG GAC TGT TGT TCT TAC GCG GAA TGT CTG CGT CCG TCT GGT TAC GGT TGG TGG CAC GGT ACC TAC TAC TGC TAC CGT AAA CGT GAA CGT TAA G – 3'

- Fita reversa: 5' – GATCC TTA ACG TTC ACG TTT ACG GTA GCA GTA GTA GGT ACC GTG CCA CCA ACC GTA ACC AGA CGG ACG CAG ACA TTC CGC GTA AGA ACA ACA GTC CGG ACG GTC TTT ATC GCA CGG CGC ATC AAC ACC ACC GCA CA – 3'

As sequências correspondentes aos sítios de restrição encontram-se sublinhadas.

As fitas foram dissolvidas em água deionizada estéril para concentração de 100 pmol. Foram utilizados 5 µL de cada fita para o anelamento, de acordo com o seguinte ciclo: 95°C por 3 minutos, queda de temperatura de 0,2°C por segundo até atingir 50°C

e finalmente 50°C por 4 minutos. Esse material foi utilizado em mistura de ligação com o plasmídeo pET16b digerido com *NdeI* e *BamHI*.

### 3.5.3 Purificação dos DNAs

Os diversos DNAs, tais como os produtos de PCR, de digestão e de defosforilação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4% a 100 volts por 1 hora. O gel foi mantido por 20 minutos em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0) contendo o corante brometo de etídio. As bandas obtidas foram removidas do gel com auxílio de um estilete e transferidas para tubos de microcentrífugas. Adicionou-se de 300 µL de solução TAE 1X contendo 1M de NaCl e os tubos foram mantidos em bloco térmico à 70°C, até a solubilização completa do gel. As amostras foram agitadas com auxílio de um agitador de tubos, mantidas por mais 5 minutos no bloco térmico e novamente agitadas. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, adicionou-se 400 µL de PCI (fenol/clorofórmio/isoamílico 25:24:1), as amostras foram agitadas por 1 minuto e após 5 minutos foram agitadas novamente. Terminada essa etapa os tubos foram centrifugados a 15.000 g por 10 minutos e as camadas aquosas resultantes transferidas para novos tubos, aos quais foram adicionados dois volumes de etanol 100%. Os tubos foram mantidos a -80°C, por 30 minutos, e foram novamente centrifugados a 15.000 g por 10 minutos. Descartou-se os sobrenadantes e os precipitados (DNA) foram lavados com 800 µL de etanol 70%. Após nova centrifugação a 15.000 g por 10 minutos, os sobrenadantes foram desprezados e os DNAs foram secos em bloco térmico, a 65°C. Os DNAs foram suspensos em 20 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril.

Posteriormente, como alternativa à purificação por fenol-clorofórmio, uma adaptação metodologia de mini-prep do método CTAB foi usada com o intuito de se purificar produtos de PCR, de digestão e de defosforilação obtidos. Uma pequena alíquota desses produtos (3µL) foi aplicada em gel de agarose 1,4% para verificação da eficiência dos processos. Depois da verificação adicionou-se ao material remanescente

nos tubos o tampão STET para volume final de 200 $\mu$ L. A partir dessa etapa todo o procedimento foi realizado conforme descrito no protocolo de mini-prep do método CTAB (descrito em 3.9).

#### **3.5.4 Reação de ligação**

Para a obtenção das moléculas recombinantes os DNAs purificados (produtos de digestão de PCR e de vetores) foram incubados com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). A ligação foi conduzida conforme protocolo:

- 5  $\mu$ L do DNA plasmidial digerido, defosforilado e purificado
- 10  $\mu$ L do produto de PCR digerido e purificado ou 10  $\mu$ L da sequência anelada
- 4  $\mu$ L do tampão da ligase 5X
- 1  $\mu$ L de T4 DNA ligase

As misturas de ligação foram incubadas por 16 horas a 16°C. Os produtos de reação foram então introduzidos em células de *E. coli* TOP10F'.

#### **3.5.5 Verificação da presença de inserto nos clones obtidos**

As colônias obtidas nas placas após transformação das células com os produtos de ligação foram coletadas e cultivadas em 3 mL de meio circlegrow com os antibióticos adequados. Após a extração do DNA plasmidial o mesmo foi submetido à PCR e à digestão com endonucleases de restrição e, posteriormente, esses produtos foram analisados em gel de agarose 1,4%.

### **3.6 Preparo de células competentes de *E. coli***

A obtenção de bactérias *E. coli* competentes foi realizada através do método de cloreto de cálcio. Células de *E. coli* cultivadas em meio sólido foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo os antibióticos adequados e crescidas por 16 horas à 37°C, sob agitação constante a 200 RPM. Para cultivo de células da linhagem TOP10F' foram adicionados ao meio de cultivo os antibióticos estreptomicina (20 µg/mL) e tetraciclina (15 µg/mL); para as células da linhagem Rosetta (DE3) foi utilizado o antibiótico cloranfenicol (30 µg/mL). O volume de 1 mL do pré inóculo foi utilizado para inocular em 100 mL de meio LB. A cultura foi incubada nas mesmas condições de crescimento descritas anteriormente até atingir um valor de absorbância a 600 nm entre 0.6 e 0.8. Atingida a D.O, as culturas foram submetidas à centrifugação a 1.000 g por 10 minutos, resuspensas em 40 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M gelado e mantidas no gelo por 1 hora. Após esta incubação, as células foram novamente centrifugadas e resuspensas em 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. Alíquotas de 100µL foram estocadas em tubos de microcentrífuga na presença de 30% de glicerol estéril, à -80°C.

### **3.7 Transformação de bactérias**

As células competentes foram mantidas em banho gelado por 30 minutos na presença do DNA de interesse e depois submetidas a choque térmico a 42°C por 2 minutos. Decorrido esse tempo os tubos foram transferidos novamente para o banho gelado, onde permaneceram por mais 2 minutos. Para minimizar o estresse celular foi adicionado 1 mL de LB sem antibiótico em cada um dos tubos, que foram mantidos a 37°C por 45 minutos sob agitação constante. Após incubação as células foram centrifugadas a 3.000 g por 3 minutos, resuspensas em 100 µL de LB e plaqueadas com auxílio de pérolas de vidro em meio LB-ágar contendo os antibióticos adequados. As placas foram mantidas a 37°C por 16 horas.

### **3.8 Eletroforese em gel de agarose**

A integridade e/ou a visualização dos DNAs amplificados ou purificados ao longo deste trabalho foram monitorados através de eletroforese em gel de agarose 1,4% por 90 minutos a 100 volts, em tampão TAE 1X. O gel foi corado com brometo de etídio (solução estoque 10mg/mL) diluído 20 vezes em tampão TAE 1X e então visualizado com auxílio de um transiluminador U.V. a 312 nm (New Brunswick Scientific).

### **3.9 Extração de DNA plasmidial de bactéria**

Para extração em pequena escala do DNA plasmidial de bactérias foi utilizado o método CTAB. Colônias de *E. coli* TOP10F' contendo o plasmídeo de interesse, foram inoculadas em 3 mL de circlegrow contendo o antibiótico adequado e cultivadas a 37°C, sob agitação constante de 200 RPM. Após crescimento, as culturas foram transferidas para tubos de microcentrífuga e as células foram coletadas a 15.000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 200 µL de STET (8% p/v de sacarose, 0.1% v/v de Triton-X100, 50 mM de EDTA, 50 mM de Tris-HCl pH 8.0). Foram adicionados 10 µL de lisozima (50 mg/mL) à mistura, a suspensão foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, a 95°C por 1 minuto. A suspensão foi centrifugada a 15.000 g, por 10 minutos, e o resíduo celular foi removido com auxílio de palito estéril. Ao sobrenadante foi adicionado 8 µL de CTAB (5% p/v de cetil trimetil brometo de amônio). Os tubos foram levemente agitados e depois centrifugados a 15.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 300 µL de NaCl 1,2 M. Os tubos foram rapidamente agitados e o DNA plasmidial foi precipitado com 800 µL de etanol 100% gelado, a -80°C, por 30 minutos. O DNA foi obtido por centrifugação a 15.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com 800 µL de etanol 70% (v/v). O DNA foi seco em bloco térmico, a 65°C. Posteriormente o DNA foi suspenso em 20 µL de H<sub>2</sub>O deionizada estéril.

### **3.10 Sequenciamento do DNA**

O seqüenciamento foi realizado com o intuito de se verificar o frame de leitura e a integridade da sequência dos clones que se mostraram positivos nas reações de digestão e PCR.

#### **3.10.1 Mini prep para sequenciamento**

Os clones recombinantes foram cultivados em 1 mL de meio circlegrow, suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, por 16 horas, em placa de 96 poços. Após o crescimento as culturas foram centrifugadas a 1.000 g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e as células lavadas com 240 µL de GET gelado. Após nova centrifugação, nas condições descritas anteriormente, foram adicionados 80 µL de GET, 2 µL de RNase (10 mg/mL) e a mistura agitada vigorosamente por 2 minutos. Terminado esse procedimento, foram adicionados 80 µL de uma solução 0,2 N NaOH/SDS 1% (1 mL de NaOH 4 M, 2 mL de SDS 10% e água deionizada q.s.p 20 mL). O conteúdo dos poços foi misturado 30 vezes, por inversão, e procedeu-se nova incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. A placa foi centrifugada rapidamente para remover qualquer solução do adesivo e adicionou-se 80 µL de acetato de potássio 3M; a mistura foi novamente homogeneizada por inversão da placa. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as suspensões foram centrifugadas a 1.000 g por 30 segundos e incubadas em estufa a 80°C por 20 minutos. Após resfriamento em gelo, a placa foi centrifugada a 1.000 g por 10 minutos. Um volume de 80 µL do sobrenadante foi transferido para um poço de uma placa de filtro Millipore. Esta placa foi acoplada a uma placa de fundo em U e o conjunto foi centrifugado por 6 minutos a 1.000 g. A placa Millipore foi descartada e adicionou-se ao filtrado 80 µL de isopropanol. A placa foi selada com adesivo e misturada cuidadosamente 30 vezes, por inversão. Após nova centrifugação a 1.000 g por 45 minutos, a 20°C, o adesivo foi retirado e o sobrenadante descartado, por inversão da placa. O DNA foi lavado usando 180 µL de etanol 70%, gelado, e a placa centrifugada por 10 minutos a 1.000 g. Descartado o sobrenadante, o

DNA foi seco à temperatura ambiente, por 1 hora. O DNA foi dissolvido em 40 µL de H<sub>2</sub>O deionizada estéril. A placa contendo o DNA foi novamente selada com adesivo, e mantida a 4°C até o momento do uso.

### 3.10.2 PCR para reação de sequenciamento

O DNA plasmidial obtido através do protocolo acima foi submetido ao sequenciamento de acordo com o método descrito por Sanger *et al.* (1977), utilizando o Kit de Sequenciamento DYEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis System (Amersham Biosciences). Os iniciadores utilizados separadamente em cada reação de sequenciamento estão descritos abaixo:

Iniciadores	Sequências
Direto	5' – TAATACGACTCACTATAGG – 3'
Reverso	5' – GCGGGATATCCGGATATAGTT – 3'

A reação de amplificação foi preparada como descrito:

- 4,0 µL de Mix (Kit do sequenciamento)
- 1,0 µL do iniciador (5 pmoles/µL)
- 3,0 µL de DNA plasmidial
- 2,0 µL de H<sub>2</sub>O deionizada

Procedeu-se as reações em termociclador conforme o ciclo:

1. Rápida elevação da temperatura a 95°C
2. 95°C por 25 segundos
3. 50°C por 20 segundos
4. 60°C por 1 minuto
5. Etapas 2 a 4 (30 vezes)
6. Redução da temperatura a 4°C

### 3.10.3 Precipitação da reação de sequenciamento

Após a reação de PCR, adicionou-se ao produto da reação 1  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 7,5 M e 20  $\mu\text{L}$  de etanol 100%. A mistura foi homogeneizada e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz. Após incubação, a mistura foi centrifugada a 1.000 g por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o produto da PCR foi lavado com 100  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. A suspensão foi submetida à nova centrifugação a 1.000 g por 10 minutos, o sobrenadante descartado, e o DNA resuspenso em 10  $\mu\text{L}$  de *loading buffer* (Amersham Biosciences) e mantido a 4°C na ausência de luz até o momento da injeção no sequenciador.

O material a ser sequenciado foi injetado no sequenciador MegaBACE™ 1000 DNA Analysis System e a eletroforese foi desenvolvida por 1 hora e meia a 80mV. Após término da eletroforese capilar, as sequências foram analisadas pelo programa Mega Bace Sequence Analyzer e os dados fornecidos pelo programa Mega Bace Score Card.

### 3.11 Expressão da proteína recombinante

Uma colônia isolada de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, transformada com a construção pET21b-LTx4, foi inoculada em 3 mL de meio SOC contendo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cloranfenicol e incubada a 37°C por 16 horas, sob agitação. 200  $\mu\text{L}$  desse pré-inóculo foi utilizado para inocular outros 4 mL de SOC contendo os mesmos antibióticos citados acima. A cultura foi mantida a 37°C, sob agitação, até atingir uma D.O.<sub>600nm</sub> de 0,5 (aproximadamente 2 horas). Após este tempo, o pré-inóculo foi vertido em 100 mL de meio SOC (sem antibiótico) e cultivado a 37°C, sob agitação, até atingir o valor de D.O.<sub>600nm</sub> entre 0,6 a 0,8. Nesta D.O. coletou-se 15 mL da cultura (controle não induzido) e adicionou-se 1mM de IPTG à cultura. Amostras de 15 mL da cultura foram coletadas a cada 1 hora, até atingir o tempo de 4 horas de indução.

### 3.12 Extração de proteínas totais

As amostras coletadas foram centrifugadas a 1000g por 12 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com 15 mL de água deionizada estéril, suspensas em 1 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 0,1% Triton X-100; 0,25 mg/ml de lisozima, e 1 mM de PMSF) e mantidas por 20 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação, as células foram lisadas por ultra-som (Branson Sonifier 250; Duty cycle Constant; output 3) em 4 ciclos de 1 minuto, e com o mesmo intervalo no banho de gelo.

As dosagens das proteínas presentes no extrato total, das proteínas encontradas na fração solúvel e das proteínas da fração insolúvel foram realizadas pelo método descrito por Lowry (Lowry *et al.*, 1951), utilizando albumina bovina como padrão.

### 3.13 Separação das frações protéicas e solubilização da fração insolúvel

Para separar a fração solúvel da fração insolúvel o extrato total foi centrifugado a 20.000g por 20 minutos. O material solúvel (presente no sobrenadante) foi coletado e o material insolúvel (encontrado no *pellet*) foi solubilizado por tratamento com tampão desnaturante.

A solubilização das proteínas presentes na forma de corpos de inclusão foi feita através da adição de 1 mL de tampão desnaturante (6M de hidrocloreto de guanidina; 50 mM de Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 0,1% Triton X-100, 10% de glicerol e 10 mM de imidazol) ao *pellet*, e incubação a -20°C, por 20 horas. As proteínas solubilizadas foram separadas do restante do material insolúvel por centrifugação a 20.000g por 20 minutos a 4°C.

Após a desnaturação dos corpos de inclusão as proteínas foram renaturadas por diálise. Foram utilizados 3 litros de água destilada, que foi trocada três vezes ao longo de 24 horas. A solução foi mantida sob agitação contínua a 8°C durante todo o processo de renaturação. O material dialisado foi concentrado (*Speed Vac*) e ressuspenso em 500µL de tampão de lise (sem lisozima e sem PMSF).

### **3.14 SDS-Tricina-PAGE**

A eficácia do processo de indução foi verificada através da eletroforese em gel de acrilamida em condições desnaturantes (Schagger *et al.*, 1987). Foi utilizado um gel de três fases. As concentrações para o gel separador foram 16,5% T (acrilamida) e 3% C (bis-acrilamida); para o gel espaçador 10% T e 3% C; e para o gel empilhador 4% T e 3% C, sendo o gel montado nessa mesma ordem. As amostras foram tratadas com tampão da amostra contendo o agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, fervidas por 10 minutos e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi conduzida a 30 V até a migração do corante pelo gel espaçador e, posteriormente, foi mantida corrente contínua de 50 mA até a total migração do corante pelo gel separador.

### **3.15 Coloração de gel de poliacrilamida por nitrato de prata**

Terminada a corrida eletroforética o gel foi fixado em 50 mL de solução fixadora (50% de metanol e 12% de ácido acético) por, no mínimo, 1 hora. Após lavagem, três vezes com H<sub>2</sub>O destilada por 20 minutos, o gel foi sensibilizado com 50 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,04% (p/v) por 1 minuto. Procedeu-se novas lavagens, três vezes com H<sub>2</sub>O destilada, por 20 minutos. O gel foi então banhado por 20 minutos com 50 mL de solução de impregnação, contendo 0,1% de nitrato de prata e 0,0075% de formaldeído. Após impregnação, realizou-se uma rápida lavagem e a revelação foi procedida com o uso de 50 mL de solução contendo 6% (p/v) de carbonato de sódio, 0,01% de formaldeído e 1 mL da solução de tiosulfato de sódio 0,04%. A reação de revelação foi conduzida até que fosse possível uma boa visualização das bandas e foi interrompida com solução contendo 50% de metanol e 12% de ácido acético.

### 3.16 Western Blot

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, poros de 0,45  $\mu\text{m}$ ). Após desenvolvimento da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, poros de 0,45  $\mu\text{m}$ ). A transferência foi conduzida a 15 V, 150 mA, por 1 hora e meia, em sistema semi seco DRY 10 (Biosystems) usando-se como tampão de transferência uma solução contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM, 10% de metanol v/v, SDS 0.1% p/v, pH 8.3. Após transferência a membrana foi bloqueada, incubada com anticorpos e revelada, de acordo com a mesma metodologia usada em 3.17.

### 3.17 Dot Blot

Com o intuito de identificar em qual fração (solúvel ou insolúvel) a proteína recombinante estaria sendo expressa, uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, poros de 0,45  $\mu\text{m}$ ) foi sensibilizada por sucção a vácuo, em sistema Bio-Dot™ Apparatus (Biorad), com os extratos protéicos dos diferentes tempos de indução das diferentes frações. A membrana foi então bloqueada com solução de bloqueio PBS-T 0.05% ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05 M, NaCl 0.15 M, 0.05% de Tween-20, pH 7.4 contendo 5% de leite em pó desnatado), por 16 horas, sob agitação. Decorrido o tempo de bloqueio a membrana foi lavada com PBS-T 0.05%, por 20 minutos, e incubada com anticorpo primário anti His-Tag (Novagen) diluído 1:2.000 em solução de bloqueio, por 3 horas, sob agitação constante. Após incubação com o anticorpo primário, a membrana foi novamente lavada com PBS-T 0.05% por 20 minutos e incubada por 2 horas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Zymed/Invitrogen), diluído 1:2.000 em solução de bloqueio. Após nova lavagem, a reação foi revelada utilizando as soluções de revelação (6 mg de diaminobenzidina diluída em 6 mL de PBS, 3 mg de 4-cloronaftol diluído em 1 mL de metanol e adicionado 5 mL de PBS). As duas soluções foram misturadas e adicionou-se à mistura

10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (p/v). Esta mistura final foi usada para banhar a membrana até a sua revelação.

### **3.18 Purificação da proteína recombinante utilizando resina de Cobalto**

Como a proteína recombinante possui uma cauda de poli-histidina, na tentativa de purificá-la foi utilizada a resina de afinidade HIS-Select™ Cobalt Affinity Gel (Sigma). Inicialmente a resina foi lavada com 2 volumes de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada e equilibrada com 4 volumes de tampão de equilíbrio (50 mM de fosfato de sódio, 0.3 M de NaCl, pH 8.0, 10mM de imidazol). Depois de equilibrada a resina foi incubada com o extrato protéico total contendo a proteína recombinante, respeitando a capacidade da resina de 15 mg/mL de proteína contendo o his-tag. Foi utilizado extrato protéico proveniente da amostra de 4 horas de indução com 1 mM de IPTG. Após incubação, a resina foi lavada cinco vezes com 2 volumes de tampão de lavagem (50 mM de fosfato de sódio, 0.3 M de NaCl, pH 8.0, 10mM de imidazol). Para eluir a proteína alvo foi utilizado 1 volume de tampão de eluição (50 mM de fosfato de sódio, 0.3 M de NaCl, pH 8.0) contendo concentrações crescente de imidazol (50 mM, 100 mM, 200 mM e 400 mM). Todas as frações (lavagens e eluições) foram coletadas para análise posterior em SDS-Tricina-PAGE.

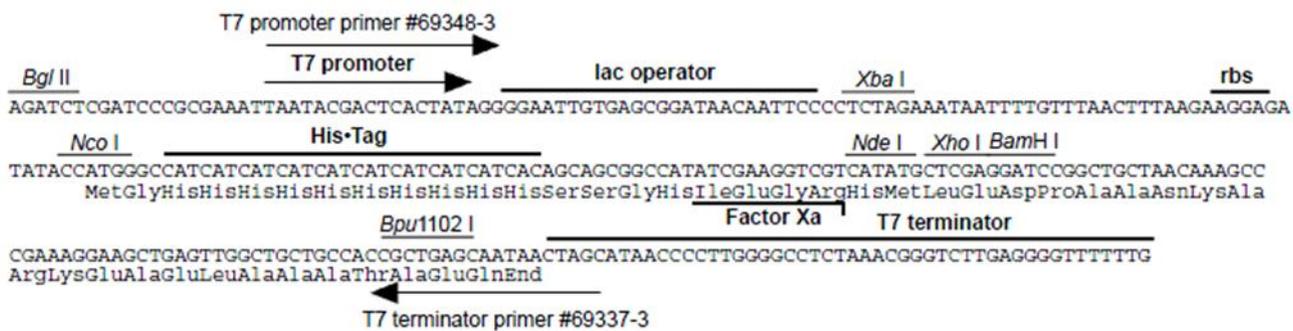
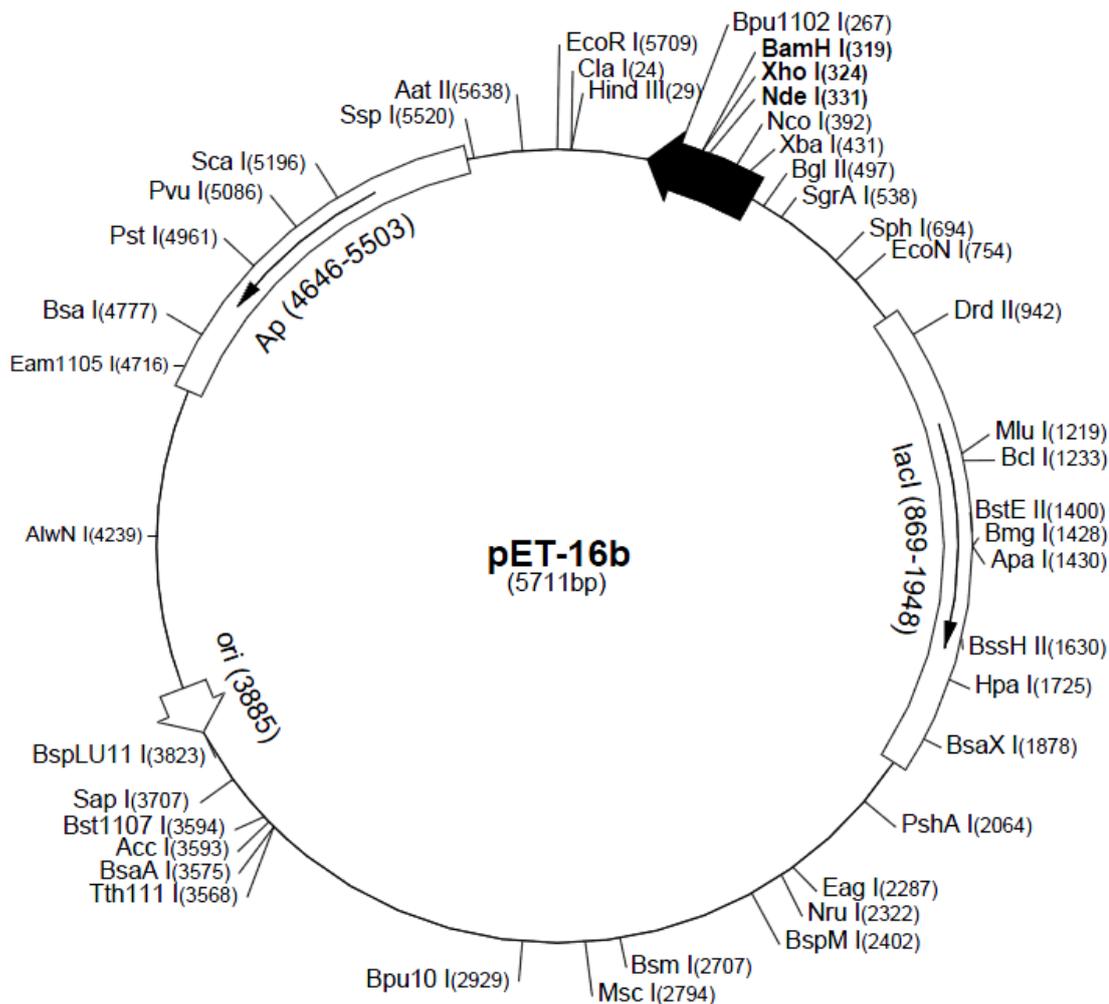
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Clonagem da sequência codificante para o peptídeo LTx4 maduro

#### 4.1.1 Tentativa de clonagem em sistema pET16b

Uma das estratégias de clonagem adotadas nesse trabalho foi a tentativa de ligar a sequência codificante para o peptídeo LTx4 no plasmídeo pET16b (Figura 5). Seria interessante expressar o peptídeo LTx4 nesse plasmídeo pois o mesmo possui um promotor forte (T7 promoter), possibilitando a super expressão da proteína de interesse com a adição de IPTG ao meio de cultura e porque ele apresenta uma cauda de 10 histidinas na região N-terminal, o que poderia facilitar a purificação do peptídeo recombinante. Além disso, esse plasmídeo possui um sítio para clivagem com fator Xa, o que permitiria a obtenção do peptídeo recombinante sem a cauda de histidina, tornando o material expresso mais fiel à molécula naturalmente expressa.

Foram realizadas duas estratégias para ligar a sequência codificante para o peptídeo LTx4 nesse vetor. A primeira tentativa consistiu de amplificar a sequência codificante para o peptídeo LTx4 (a partir de um clone da biblioteca de cDNA) com iniciadores que contêm sequências adaptadoras para as enzimas *NdeI* e *BamHI*, já que o vetor também foi cortado com essas enzimas. Não obtivemos sucesso nesse processo, já que todos os clones obtidos não continham inserto. Em uma segunda estratégia, tentamos ligar o oligonucleotídeo sintético codificante para LTx4, sintetizado com códons preferenciais para *E. coli*, nesse mesmo vetor. Entretanto, essa sequência se degradou e não foi possível fazer muitas tentativas (Figura6).



**pET-16b cloning/expression region**

Figura 5: Mapa circular do vetor pET16b (5711pb) e sua região de clonagem/expressão (disponível em [www.novagen.com](http://www.novagen.com)).

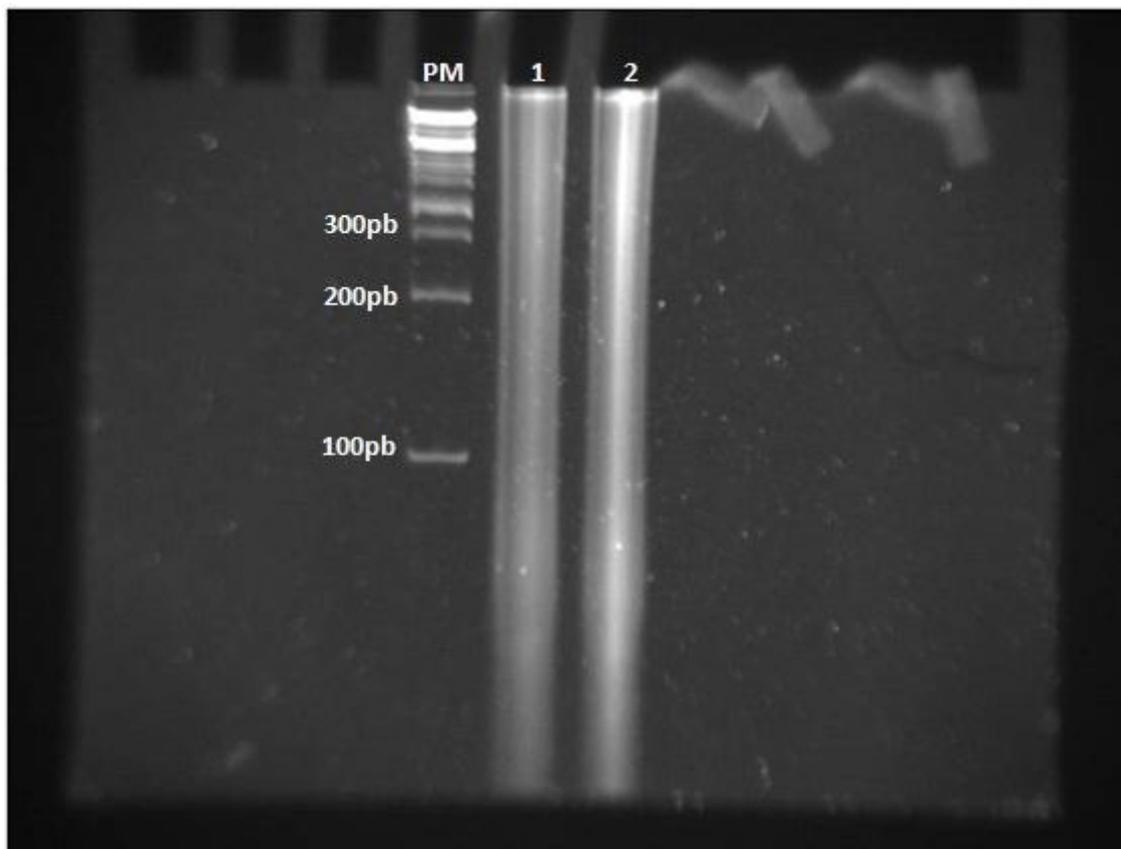


Figura 6: Gel de poliacrilamida 8%. PM: Padrão de pb 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 e 2: Sequências aneladas (5'3' e 3'5') do oligonucleotídeo sintético codificante para LTx4. O esperado era a presença de uma banda única de aproximadamente 130pb, porém observa-se que o material encontra-se degradado.

#### 4.1.2 Clonagem da seqüência codificante para o peptídeo LTx4 no vetor pET21b nos sítios de *BamHI* e *XhoI*

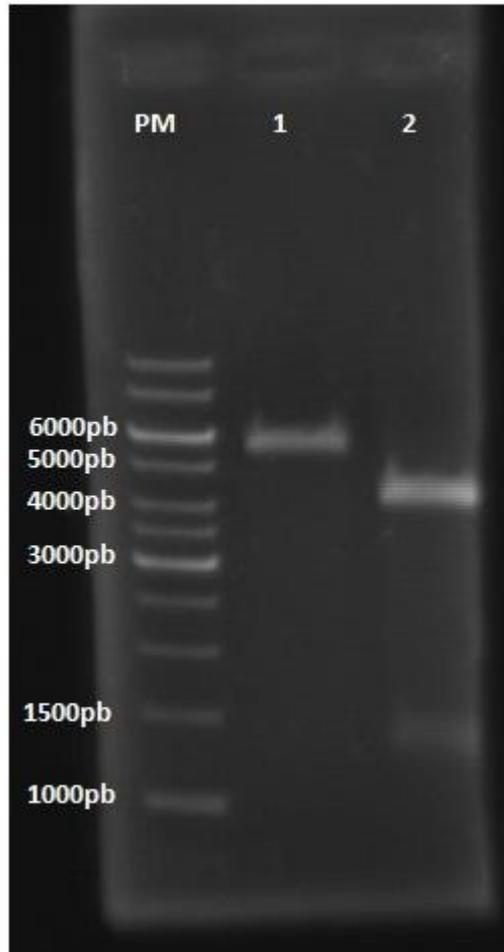
Como não obtivemos sucesso com a clonagem em sistema pET16b foram realizadas tentativas de clonar seqüência codificante para a LTx4 em sistema pET21b.

Neste vetor, a expressão também é controlada pelo T7 Promoter. Porém, em pET21b, a cauda é constituída de seis histidinas e encontra-se na porção C-terminal, não existindo possibilidade de clivá-la posteriormente a obtenção do peptídeo recombinante. A primeira tentativa de clonagem da LTx4 no vetor pET21b foi realizada entre os sítios

*Bam*HI e *Xho*I desse plasmídeo. O DNA codificante para o peptídeo LTx4 maduro, presente no vetor pBK-CMV (clone original) foi amplificado com iniciadores contendo seqüências adaptadoras para as enzimas de restrição citadas acima, digerido, purificado e então ligado no vetor pET21b (Figura 8). Nessa tentativa obtivemos um único clone que se mostrou positivo, isto é, o corte do DNA extraído deste clone liberou um fragmento na digestão com as enzimas de restrição. A reação de digestão foi realizada com a utilização das enzimas *Eco*RI e *Eco*RV. Havendo a presença de inserto o sítio da enzima *Eco*RI não estaria mais presente no vetor, originando apenas uma banda de 5448pb. Sem o inserto o vetor é cortado pelas duas enzimas, resultando em duas bandas (4120pb e 1322pb) (Figura 7). O PCR de colônia, usando iniciadores F e R para a seqüência codificante, também mostrou um produto de PCR de aproximadamente 130 pb (não mostrado). Posteriormente, o DNA plasmidial deste clone foi seqüenciado.

Simultaneamente ao seqüenciamento foram realizadas tentativas de indução do peptídeo recombinante, usando de *E. coli* Rosetta, porém não observamos a presença do peptídeo em SDS-PAGE e nem o detectamos em experimentos de Western e Dot blot.

Após o seqüenciamento, foi observado um problema na integridade da seqüência, provavelmente decorrente do processo de digestão. A inserção não se deu na janela correta de leitura e, conseqüentemente, o produto não foi expresso.

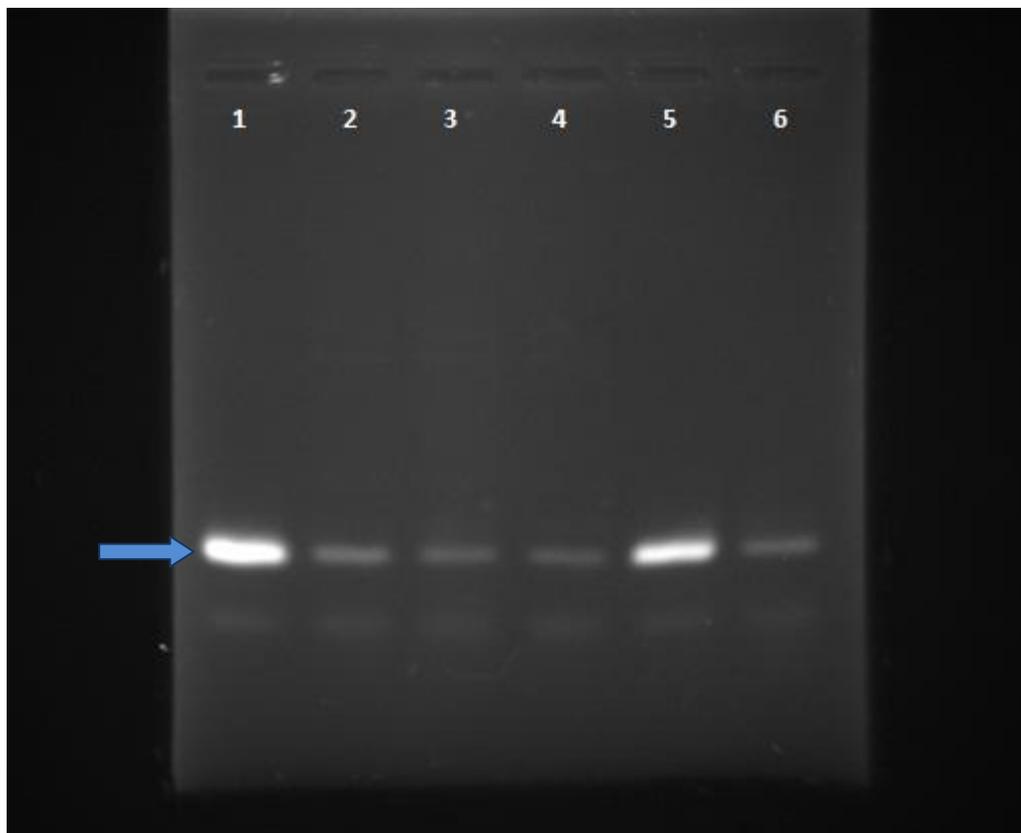


**Figura 7:** Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, visualizado em transiluminador e fotografado. PM: Padrão de pb GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). Canaleta 1: DNA plasmidial da construção pET21b+LTx4 (BamHI/XhoI) cortado com as enzimas EcoRI e EcoRV (5448pb). Canaleta 2: vetor pET21b sem inserto cortado com as mesmas enzimas, originando duas bandas (4120pb e 1322pb).

#### **4.1.3 Clonagem da seqüência codificante para LTx4 no vetor pET21b nos sítios de *NdeI* e *XhoI***

Como não obtivemos resultado satisfatório na clonagem anterior, um novo iniciador direto foi desenhado, desta vez contendo sítio adaptador para a enzima *NdeI*, colocando o gene clonado logo após o códon de iniciação (ATG), eliminando a seqüência do T7•Tag e assim diminuindo a presença de aminoácidos extras na

sequência da proteína recombinante. O DNA codificante para o peptídeo LTx4 foi amplificado por PCR, a partir do clone da biblioteca de cDNA, usando-se de iniciadores contendo sítios para *NdeI* e *XhoI*. Ambos, vetor pET21b e o produto da PCR, foram digeridos com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. Os DNAs foram purificados, ligados pela enzima T4 ligase e as colônias obtidas após transformação de *E. coli* foram testadas através de PCR de colônia (Figura 7), digestão do DNA plasmidial (não mostrado) e através de seqüenciamento conforme protocolos descritos em Materiais e Métodos. Após seqüenciamento, verificamos que a essa clonagem foi efetuada com sucesso.



**Figura 7:** Gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídio, visualizado em transiluminador e fotografado. Produtos de PCR dos clones obtidos com o produto de ligação pET21b+LTx4, indicados pela seta azul. Os DNAs plasmidiais dos clones que mostraram melhores ampliações (Canaletas 1 e 5) foram sequenciados.

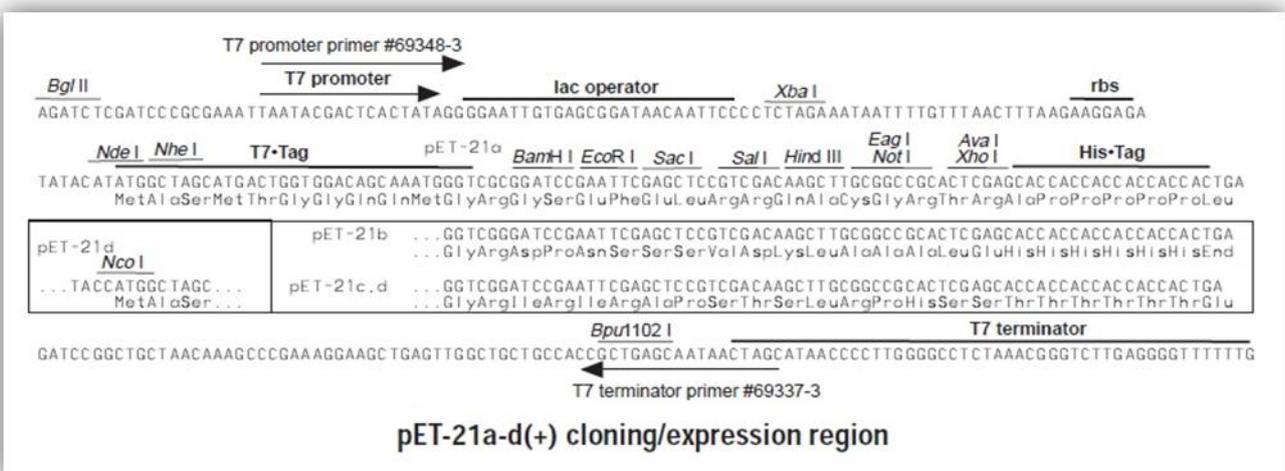
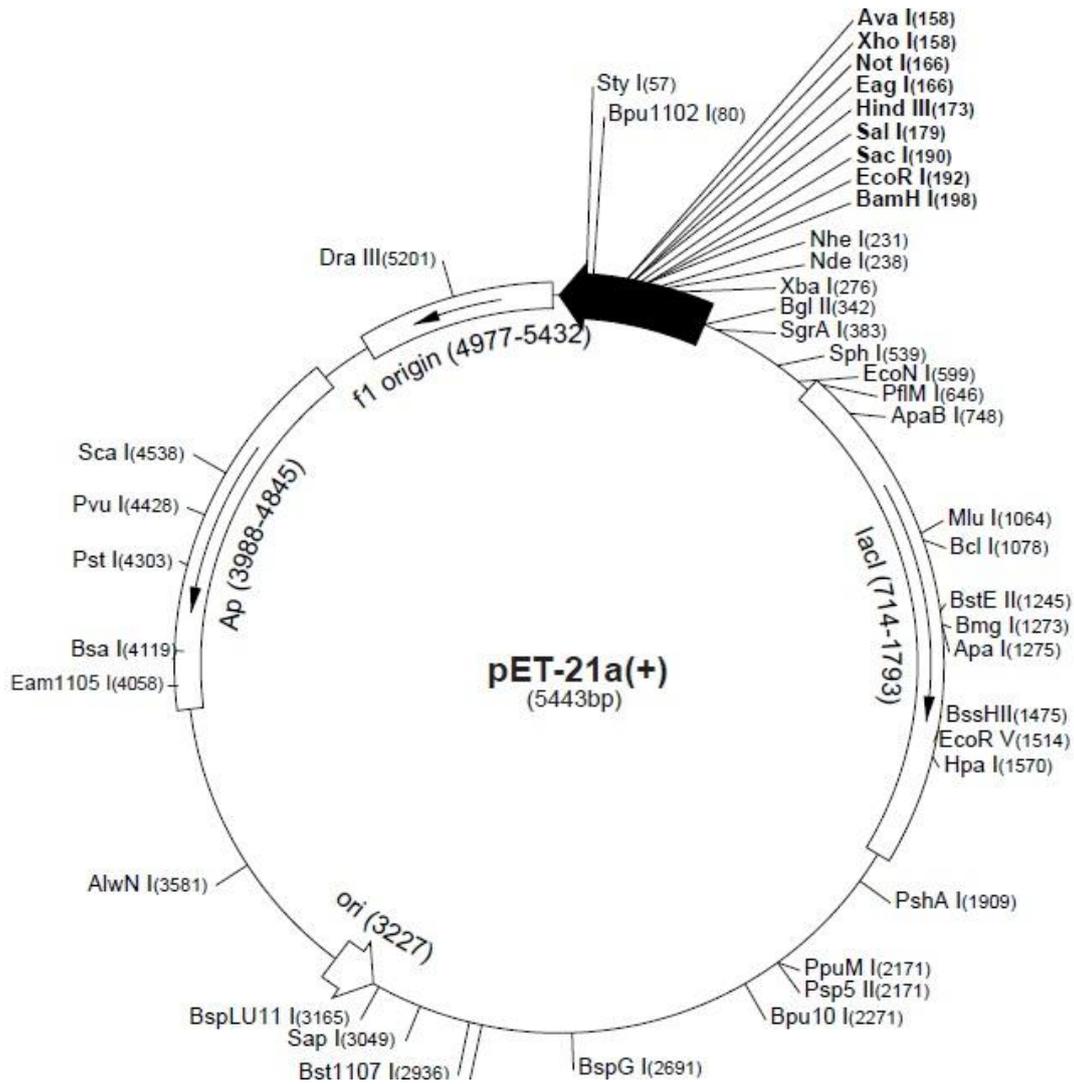


Figura 8: Mapa do vetor pET21a, que se difere do vetor utilizado nesse trabalho (pET21b) por ter 1 pb a mais após o sítio para BamHI.

#### 4.1.4 Sequenciamento do DNA

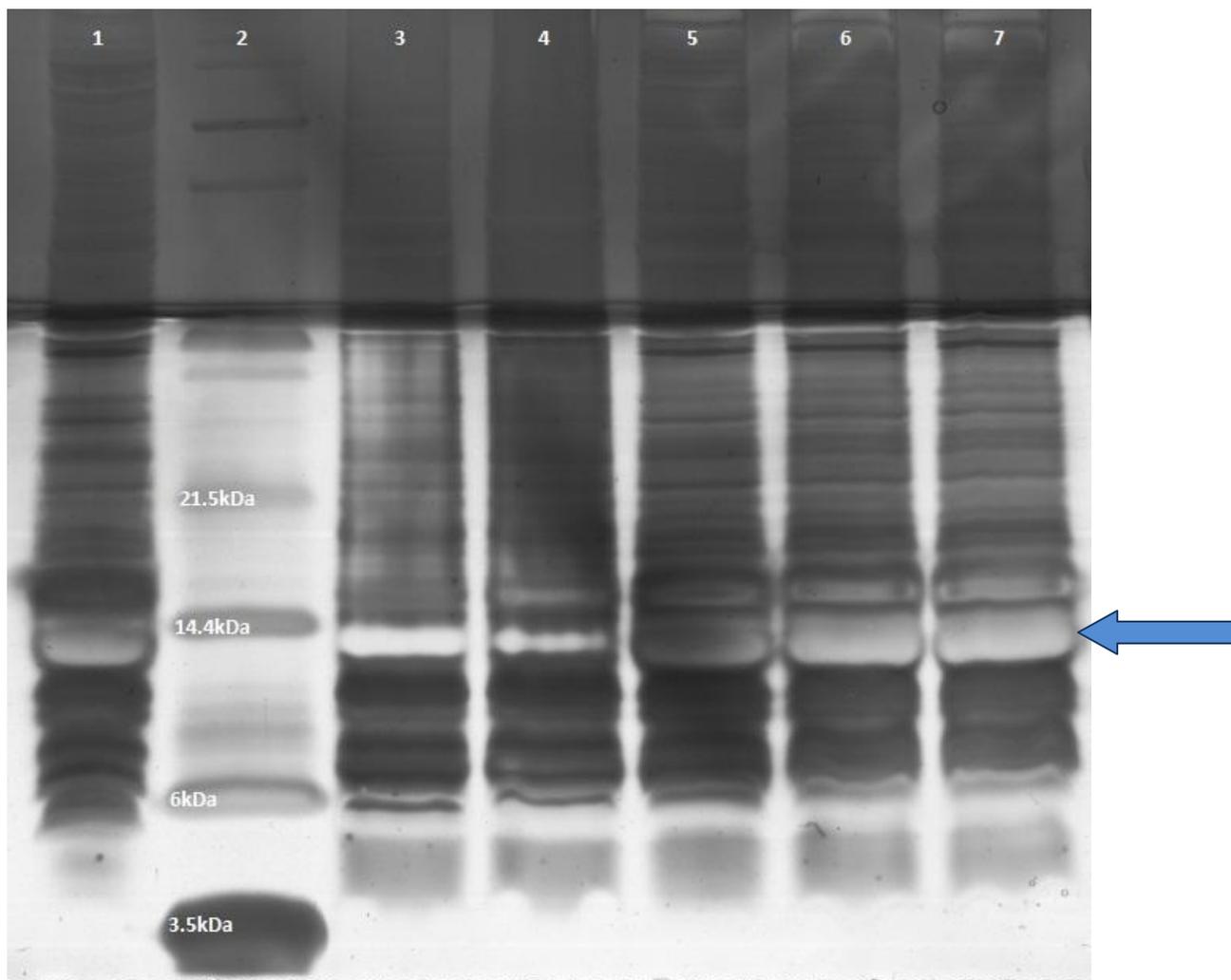
Os DNAs plasmidiais dos clones que se mostraram positivos nos testes de digestão com as enzimas *EcoRI* e *EcoRV* e que apresentaram um produto de amplificação de aproximadamente 130 pb na PCR foram sequenciados pelo método de Sanger e colaboradores (Sanger *et al.*, 1977).

No sequenciamento, verificou-se a integridade da sequência clonada (presença dos códons de iniciação e de terminação, *frame* de leitura, presença da cauda de histinina, sequência codificante completa para o peptídeo LTx4 maduro).

Obtivemos um único clone contendo um DNA plasmidial pET21b-LTx4, inserido corretamente e contendo toda a sequência prevista. Esse clone foi utilizado nos experimentos de expressão e detecção (cromatograma – Anexo1).

#### 4.2 Perfil de expressão da LTx4 recombinante

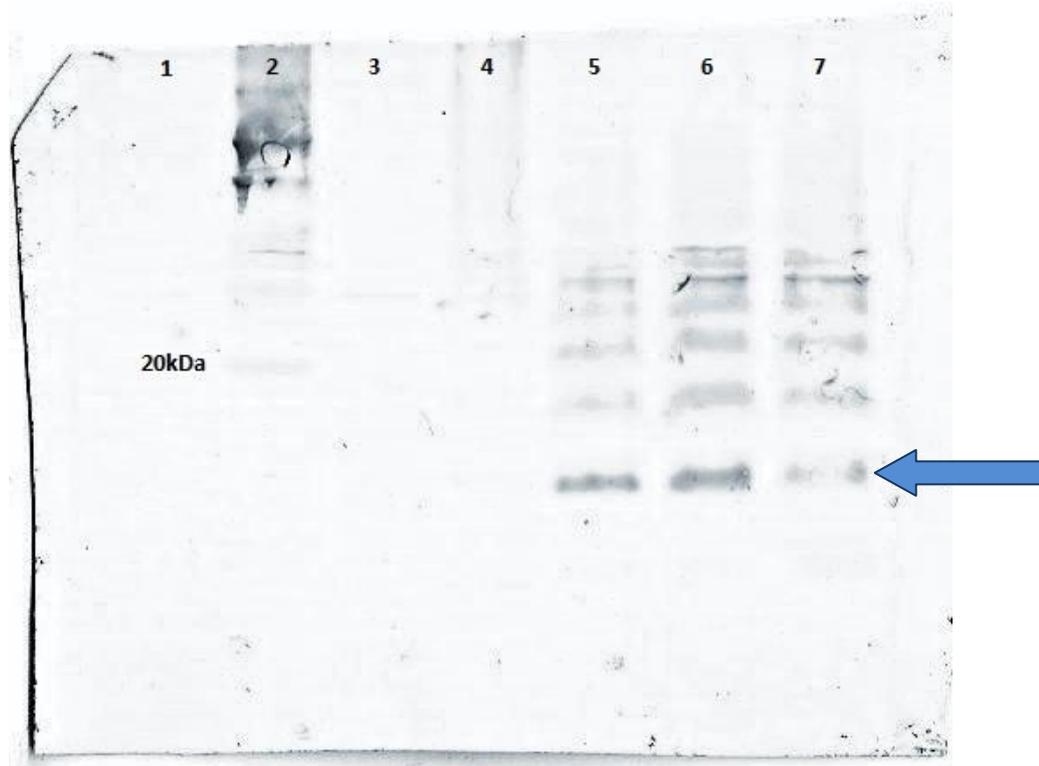
O perfil de expressão do peptídeo LTx4 recombinante foi visualizado por separação eletroforética em gel trifásico SDS-Tricina-PAGE nas seguintes concentrações respectivamente: gel separador com 16,5% T (acrilamida) e 3% C (bis acrilamida), o gel espaçador com 10% T e 3% C e o gel empilhador com 4% T e 3% C. É possível observar aumento significativo na expressão de uma banda de aproximadamente 14kDa, a partir de 2 horas de indução (Figura 9).



**Figura 9:** SDS-Tricina-PAGE dos extratos totais obtidos nos diferentes tempos de indução com 1mM de IPTG. 20 µg de proteínas foram aplicados em cada canaleta e o gel foi corado com prata. Canaleta 1: Controle da expressão heteróloga; células *E. coli* Rosetta transformadas com o plasmídeo pET21b vazio, induzido com IPTG. Canaleta 2: Padrão de massa molecular; foi utilizado 5 µL do padrão Mark12™ Unstained Standard (Invitrogen). Canaletas 3 a 7: Tempos crescentes de indução, de 0 hora a 4 horas, respectivamente. A seta azul indica a possível localização do peptídeo recombinante (massa molecular aparente de aproximadamente 14 kDa).

### 4.3 Western Blot

A técnica de Western blot foi desenvolvida com o intuito de identificar a presença do peptídeo recombinante nos extratos celulares coletados. Foram aplicados, em um gel SDS-Tricina-PAGE, 20  $\mu$ g de proteínas do extrato total, correspondente aos tempos de 0 a 4 horas de indução, além de um controle negativo (indução em *E. coli* Rosetta transformada com pET21b sem inserto). Como controle positivo utilizamos 5  $\mu$ L de Benchmark™ His-tagged Protein Standard (Invitrogen). As proteínas presentes no gel foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose que foi revelada conforme descrito em 3.17. Não há revelação no controle negativo nem nos tempos de 0 e de 1 hora de indução. Proteínas de aproximadamente 14kDa podem ser observadas a partir de 2 horas de indução (seta azul); também observam-se revelações inespecíficas (Figura 10).

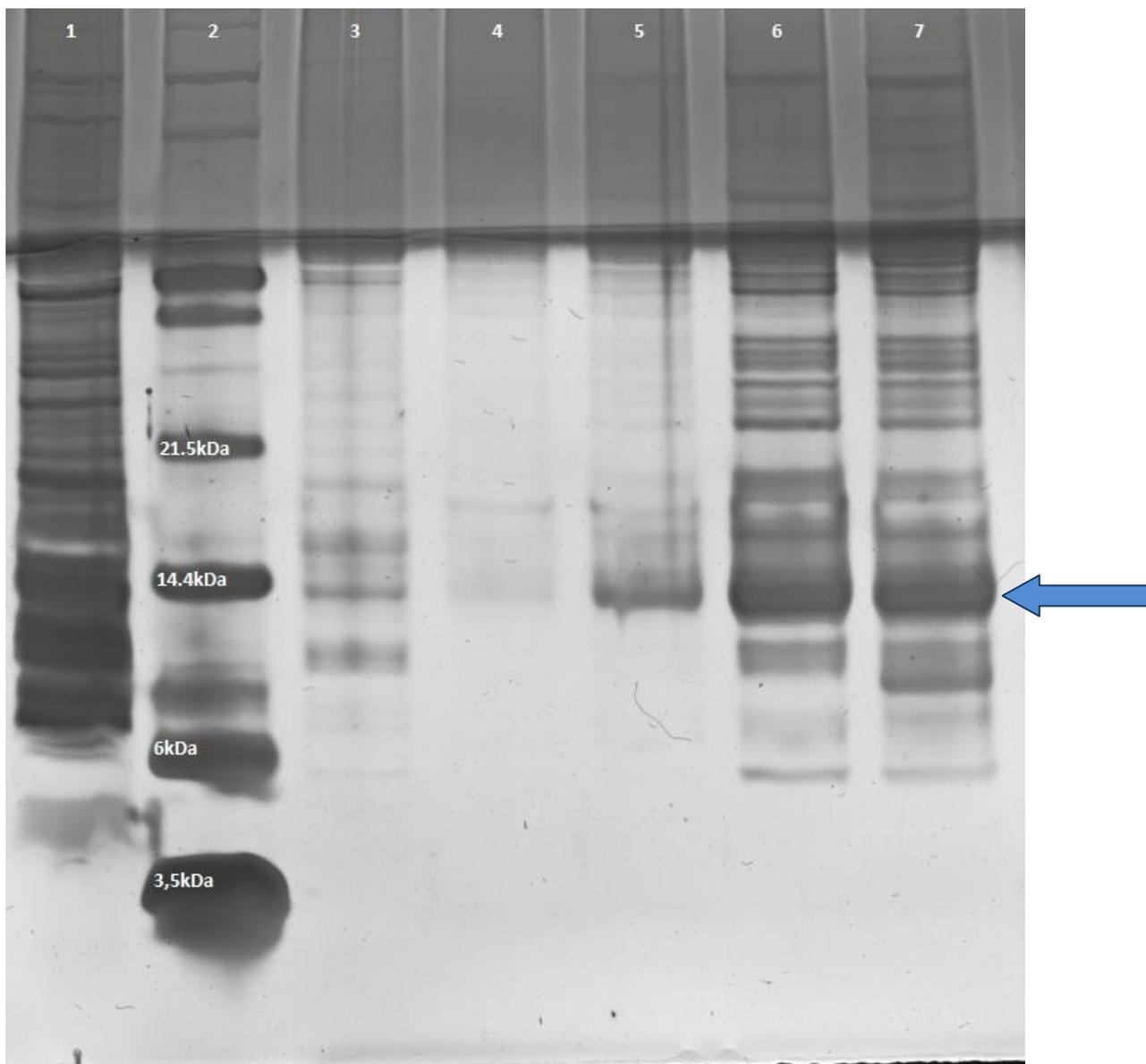


**Figura 10: Western Blotting de réplica do gel mostrado na figura 9. Após separação por eletroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e a reação foi visualizada diretamente na membrana. Canaleta 1: Controle da expressão heteróloga; células *E. coli* Rosetta transformadas com o plasmídeo pET21b vazio, induzido com IPTG. Canaleta 2:**

controle positivo; 5  $\mu$ L do padrão Benchmark<sup>TM</sup> His-tagged Protein Standard (Invitrogen). Canaletas 3 a 7: Tempos crescentes de indução, de 0 hora a 4 horas, respectivamente. A seta azul indica a localização do peptídeo recombinante (massa molecular aparente de aproximadamente 14 kDa).

#### **4.4 Tentativa de purificação da LTx4 recombinante usando resina de afinidade**

Na tentativa de purificar o peptídeo recombinante, contendo a cauda de histidina, 40 microgramas de proteínas do extrato total de 3 horas de indução foi incubado com a resina de afinidade HIS-Select<sup>TM</sup> Cobalt Affinity Gel (Sigma). Uma banda de aproximadamente 14 kDa, que corresponde à banda encontrada no perfil de indução do peptídeo LTx4 (observado em SDS-Tricina-PAGE e em Western Blotting), é eluída a partir da concentração de 100mM de imidazol. Porém, a presença de proteínas contaminantes demonstra a necessidade de uma otimização desse processo de purificação (Figura 11).



**Figura11:** SDS-Tricina-PAGE do extrato total proveniente do processo de indução utilizando a resina de afinidade HIS-Select™ Cobalt Affinity Gel (Sigma). A resina foi equilibrada com tampão contendo 50 mM de fosfato de sódio, 0.3 M de NaCl, pH 8.0 e 10mM de imidazol. Foi aplicado 40 µg de proteínas presentes no extrato total do tempo de 3 horas de indução, que foi incubado com 25µL de resina. A resina foi previamente lavada 5 vezes com o tampão de equilíbrio. Canaleta 1: Extrato não ligado. Canaleta 2: Padrão de massa molecular. Canaleta 3: primeira lavagem (tampão com 10mM Imidazol). Canaleta 4: Lavagem com 50mM de imidazol. Canaleta 5 a 7: concentrações crescentes de imidazol; respectivamente 100mM, 200mM e 400mM de imidazol. A partir da concentração 100mM de imidazol é possível observar a eluição de uma proteína de aproximadamente 14 kDa (seta azul), correspondente à banda encontrada no perfil de indução do peptídeo LTx4.

#### 4.5 Dot Blot

O Dot Blot foi realizado com o objetivo de determinar se a LTx4 estava sendo expressa na forma solúvel e/ou na forma de corpos de inclusão. Os extratos protéicos (20 µg) dos diferentes tempos de indução de ambas as frações foram aplicados diretamente em membrana de nitrocelulose, através de sucção à vácuo, com auxílio do sistema Bio-Dot™ Apparatus. Posteriormente a membrana foi bloqueada, incubada com os anticorpos primário e secundário e então revelada. É possível observar revelação da reação no controle positivo (1 µL de Benchmark™ His-tagged Protein Standard - Invitrogen), no extrato total de 3 horas de indução da LTx4 e na fração dos corpos de inclusão (a partir de 1 hora de indução da LTx4). Não observa-se revelação no controle negativo (extrato protéico total da indução de *E. coli* Rosetta transformada com pET21b vazio) e nem nos tempos de indução da LTx4 na fração solúvel. Esses resultados mostram que o peptídeo LTx4 foi expresso somente na forma de corpos de inclusão (Figura 12).



**Figura 12: Dot Blotting** - A membrana de nitrocelulose foi sensibilizada com extratos protéicos (solúvel e insolúvel) dos diferentes tempos de indução, por sucção a vácuo, em um sistema Bio-Dot™ Apparatus (Biorad). Foram aplicados 20 µg de proteína em cada ponto. A1: controle positivo; 1 µL de Benchmark™ His-tagged Protein Standard (Invitrogen). A2: controle negativo; extrato protéico total da indução de *E. coli* Rosetta transformada com pET21b vazio. A3: extrato protéico total da indução do peptídeo LTx4 por 3 horas. B1 a B5: extrato protéico da fração solúvel de tempos crescentes de indução - 0 a 4 horas de indução, respectivamente. Não há revelação. C1 a C5: extrato protéico da fração insolúvel de tempos crescentes de indução - 0 a 4 horas de indução, respectivamente. Pode-se observar a detecção imunológica a partir de 1 hora de indução na fração insolúvel, indicando que o peptídeo LTx4 recombinante está sendo expresso exclusivamente na forma de corpos de inclusão.

## 5. DISCUSSÃO

Muitos pesquisadores têm se dedicado a elucidar a composição dos venenos de aranha em busca de componentes que possam ser utilizados como ferramentas moleculares, como fármacos e como bioinseticidas. Diversas toxinas encontradas em venenos de aranhas já foram isoladas e caracterizadas, porém, a disponibilidade de material biológico é um fator limitante para essas pesquisas. A utilização das técnicas de biologia molecular pode superar essas limitações. As bibliotecas de cDNA permitem o isolamento e obtenção de grandes quantidades de material, necessários para estudos mais aprofundados sobre a estrutura e mecanismo de ação das toxinas. Além disso, mesmo compostos encontrados apenas em pequenas quantidades no veneno podem ser superexpressos em sistemas heterólogos (Diniz et al. 1993, Kalapothakis et al. 1998, Escoubas et al. 2000, Kalapothakis et al. 2002, Cardoso et al. 2003, de Deus et al. 2003). Dentre os hospedeiros disponíveis para a expressão de proteínas a bactéria *E. coli* é ainda o microorganismo mais utilizado por ser um dos organismos mais estudados e devido à sua velocidade de multiplicação e simplicidade do material genético (Middelberg, 2002).

O desenvolvimento de resistência das pragas aos pesticidas, aliado a um maior conhecimento sobre os impactos que esses produtos químicos trazem à saúde e ao meio ambiente, tem estimulado a busca de compostos bioinseticidas. O estudo de toxinas presentes em venenos de animais para utilização como bioinseticidas é muito promissor e vem apresentando crescimento contínuo (Gershburg et al., 1998; Regev et al., 2003; Moran et al., 2009). A alta toxicidade e principalmente, a seletividade dos peptídeos tóxicos presentes no veneno de diversos organismos tais como aranhas (Rash et al., 2002), escorpiões (Gurevitz et al., 2007), cobras (Gomes et al., 2005) e caracóis (Terlau et al., 2004) torna cada vez mais atrativo o uso de toxinas para controle biológico de pragas. Todavia, atualmente os bioinseticidas constituem apenas de 3% dos pesticidas disponíveis para comercialização (Whetstone et al., 2007).

Alguns trabalhos publicados na literatura científica mostram a ação do veneno total da aranha *Lasiadora* sp em organismos vertebrados e invertebrados. Esses resultados são promissores, porém, ainda há muito para conhecer e explorar no veneno

dessa aranha. (de Deus, 2003; Kalapothakis *et al.*, 2003; Kushmerick *et al.*, 2001). A varredura da biblioteca de cDNA aranha *Lasiadora* sp permitiu a identificação de quatro peptídeos tóxicos presentes no veneno, que foram nomeados LTx1, LTx2, LTx3 e LTx5 (Vieira, 2005). Em outra varredura foram identificados 4 clones codificantes para o peptídeo LTx4 (de Moura, 2004), objeto de estudo deste trabalho. O peptídeo precursor LTx4 é composto por um peptídeo sinal com 22 aminoácidos, um peptídeo intermediário com 35 aminoácidos e pela toxina madura contendo 42 aminoácidos, com uma massa molecular teórica de 4924,49 kDa (de Moura, 2004). O peptídeo sinal é responsável pela exportação da molécula e orientação dentro da célula (Boyd e Beckwith 1990). A função dos peptídeos intermediários ainda não foi bem esclarecida, mas Oliveira *et. al.* (1990 e 1991) e Price-Carter e cols. (1996) sugerem que esteja relacionado com o enovelamento da toxina, e que os mesmos são alvos de enzimas envolvidas em modificações pós-traducionais (Price-Carter e cols, 1996).

Trabalhando com espectrometria de massa MALDI-TOF, Escoubas e Rash, caracterizaram o perfil molecular de peptídeos presentes no veneno de 55 tarântulas e encontraram duas formas de distribuição de massa molecular: peptídeos pertencentes à classe central, de massa molecular entre 3000-5500 Da e peptídeos pertencentes à classe secundária, de massa molecular entre 6500-7000 Da (Escoubas *et al.*, 2004). De acordo com o perfil de massa molecular descrito por Escoubas e Rash, a LTx4 pertence à classe central de peptídeos encontrados no veneno de tarântulas, onde é encontrada a maioria dos peptídeos de tarântulas identificados até o momento, formados por estrutura primária interligada por três pontes dissulfeto e composta de 31 a 41 aminoácidos. Além disso, a maior parte desses peptídeos está estruturalmente de acordo com o motivo ICK (*inhibitory cysteine knot*), adotado por vários polipeptídeos inibitórios de canais iônicos encontrados em *Conus* e aranhas, que compartilham sequências primárias e funções biológicas características (Liang, 2002). A aplicabilidade desses peptídeos já foi reportada em vários estudos de engenharia de proteínas e no desenvolvimento de drogas (Chiche, 2003).

Neste trabalho, a sequência codificante para o peptídeo maduro LTx4 foi amplificado por PCR e inserido no vetor pET21b (Novagen). Esse vetor foi escolhido por ter sua região promotora sobre o controle do T7 promoter, que é um promotor forte

induzível pela presença de IPTG (1mM), permitindo assim uma super expressão do gene de interesse. Além disso, o gene da LTx4 foi clonado em fusão com uma cauda de poli histidina (His<sub>6</sub>) na porção C-terminal para facilitar a detecção e purificação do peptídeo recombinante. A eficiência da clonagem foi confirmada por PCR de colônias e cortes do DNA plasmidial com endonucleases de restrição. Após confirmarmos a clonagem, realizamos o sequenciamento do DNA plasmidial para verificar a integridade da sequência clonada (presença dos códons de iniciação e de terminação, *frame* de leitura, presença da cauda de histinina, sequência codificante completa para o peptídeo LTx4 maduro).

A expressão da LTx4 foi realizada em sistema bacteriano utilizando células de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. Essa cepa bacteriana, derivada da BL21, foi construída com o objetivo de propiciar um aumento da expressão de proteínas eucarióticas que contêm códons raros para *E. coli*. A suplementação de tRNAs para os códons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA é fornecida pelo plasmídeo pRARE (confere resistência a cloranfenicol), que também é responsável por expressar a lisozima T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase. A inibição da T7 RNA polimerase é importante em sistema pET pois suprime possíveis expressões basais, estabilizando assim os plasmídeos recombinantes que codificam proteínas prejudiciais ao crescimento celular e à sua viabilidade.

A análise da sequência de aminoácidos do peptídeo recombinante expresso no sistema pET21b foi feita com a utilização das ferramentas *Translate Tool* e *Compute pI/Mw tool*, disponíveis em [www.expasy.org](http://www.expasy.org). A LTx4 recombinante é formada por 51 resíduos de aminoácidos, os quais conferem à toxina uma massa molecular teórica de 6,12kDa e um pI teórico de 7,03 (Figura 13).



  
 Swiss Institute of Bioinformatics

You are here: ExPASy CH > Tools > Primary structure analysis > Compute pI/Mw

### Compute pI/Mw

User-provided sequence:

10
20
30
40
50
  
 MCGGVDAPCD KDRPDCCSYA ECLRPSGYGW WHGTYCYRK RERLEHHHHH H

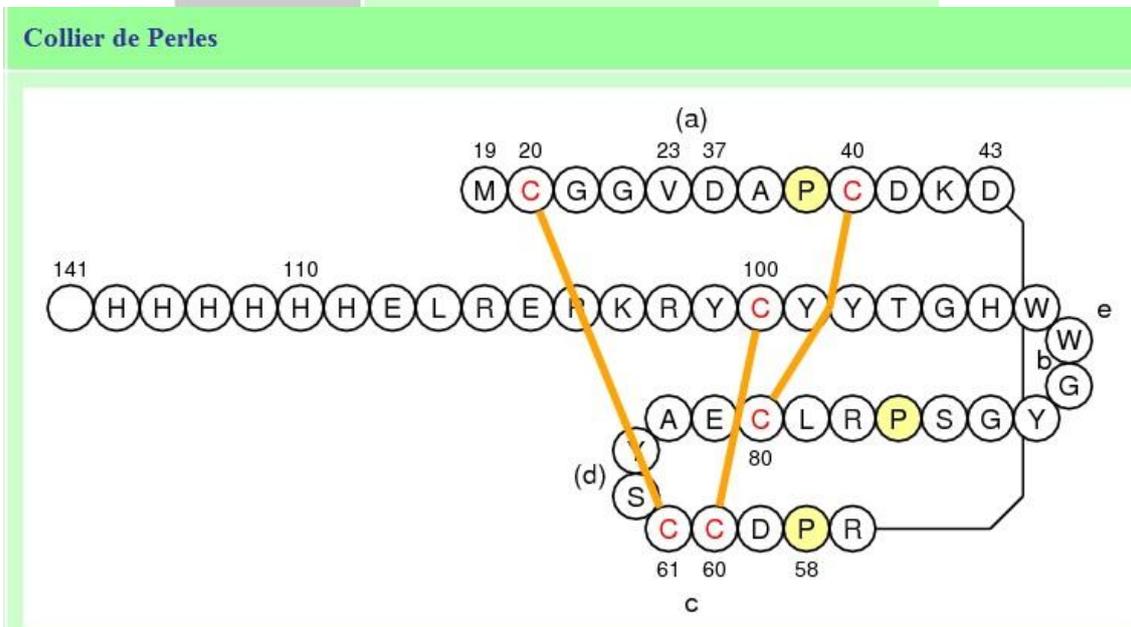
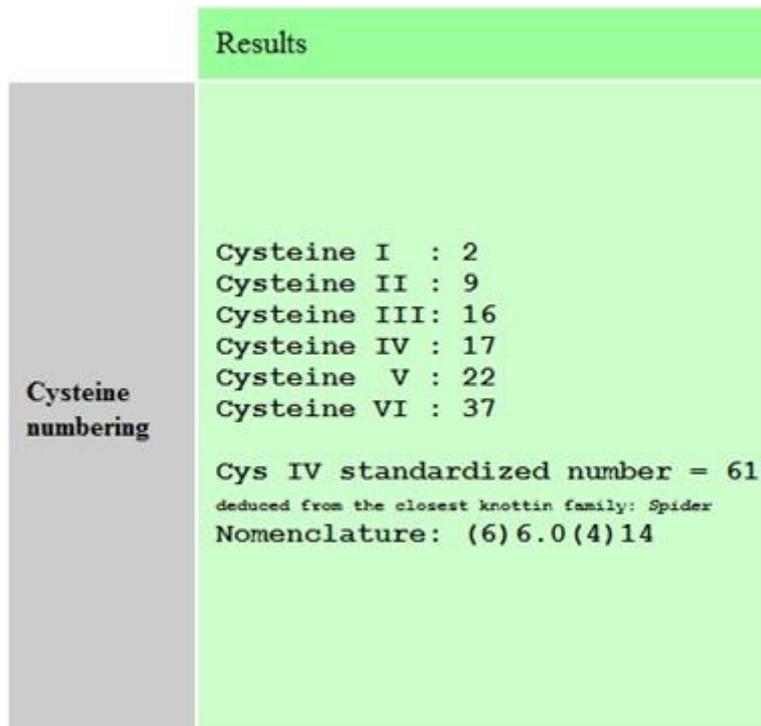
---

Molecular weight (average): 6120.80

**Theoretical pI: 7.03**

**Figura 13: Análise da sequência dos aminoácidos do peptídeo LTx4 recombinante pela ferramenta *Compute pI/Mw* (www.expasy.org). O resultado sugere um peptídeo com massa molecular de 6,12kDa e um pI teórico de 7,03.**

A estrutura primária do peptídeo recombinante foi analisada com a ferramenta disponível em [http://knottin.cbs.cnrs.fr/Tools\\_1D.php](http://knottin.cbs.cnrs.fr/Tools_1D.php), que sugere a conformação mostrada na figura 14, onde podemos observar a posição das cisteínas e suas ligações intra-cadeia em concordância com o padrão – CX6CX6CCX4CX14C – (onde X representa qualquer resíduo de aminoácido). Tomando como base o trabalho realizado por Corzo em 2008, o padrão adotado pela LTx4 está de acordo com o esperado para um motivo ICK (– CX3-7CX3-6CX0-5CX1-4CX 3-13C–), comumente conservado em peptídeos encontrados em toxinas animais (Figura 15). A maioria das toxinas peptídicas de aranhas possuem, assim como a LTx4, várias pontes dissulfeto, que formam o motivo estrutural ICK, responsável por conferir uma conformação globular característica à molécula. A conformação mais comum desse motivo consiste numa tripla fita antiparalela de folhas  $\beta$  estabilizadas por um “nó de cisteína”. Em geral, as sequências maduras dos peptídeos de aranha têm evoluído ao longo do tempo, porém, o padrão das sequências de cisteínas permanece praticamente inalterado (Rolland, 2010).



**Figura 14:** Análise da estrutura primária da LTx4 recombinante pela ferramenta disponível em [http://knottin.cbs.cnrs.fr/Tools\\_1D.php](http://knottin.cbs.cnrs.fr/Tools_1D.php). A figura mostra o padrão de ligação das cisteínas intra-cadeia.

Table 1 – Amino acid sequence of Bs1 (A) and alignment to similar spider toxins (B)				
<b>A</b>				
Peptide	Sequence	Mass <sup>a</sup>		
		Exp.	Theo.	
Bs1	<sup>1</sup> CIGESVPCDKDDPRCCREYECLKPTGYGWYASYCYRKKS* :-----Edman----->	4916.57	4917.58 <sup>a</sup>	
<b>B</b>				
Peptide	Sequence	Identity(%) <sup>b</sup>	Accs <sup>c</sup>	
Bs1	-CIGESVPCDKDDPRCCRE--YECLKPTGYGWYASYCYRKKS*-	100	EU196048	
HwTxVI	NCIGEQVPCDENDPRCCSG--LVVLKKT LHGIWIKSSYCYKCK--	56	P68420	
LTX4	-CGGVDAPCDKDRPDCCSY--AECLRPSGYGWWHGTYCYRKRE	61	EF219061	
Magi1	-CMGYDIHCTDRLP--CCFG--LECVKTSGY-WWYKTYCRRKS*-	44	P83557	
Magi2	-CMGYDIECNENLP--CCKHRKLECVETSGY-WWYKRKYCRPIK*-	39	P83558	
Tox6	-CMGYDIECNERLH--CCAD--LECVKTSGR-WWYKTYCRRKS*-	39	Q75WH1	

**Figura 15: Alinhamento da sequência de aminoácidos da LTx4 com outras toxinas de aranha. As cisteínas estão identificadas em cinza. A LTx4 apresentou 61% de identidade com a toxina Bs1 da aranha *Brachypelma smithi*. Fonte: Corzo, 2008.**

A expressão da proteína recombinante foi realizada pela adição de 1mM de IPTG à cultura em D.O<sub>600</sub> no valor de 0,6 ~ 0,8. Desta cultura foram coletadas amostras em diferentes tempos de indução. Os resultados dos diferentes tempos de indução obtidos através do perfil eletroforético em SDS-Tricina-PAGE mostraram uma crescente expressão na região de aproximadamente 14 kDa, correspondendo a uma massa molecular acima da calculada pelo programa *Compute pI/Mw tool*. Dados da literatura informam que as massas moleculares calculadas com base na sequência da proteína ou determinadas por espectrometria de massa nem sempre estão de acordo com as massas estimadas em SDS-PAGE. Em alguns casos a mobilidade de proteínas em SDS-PAGE é dependente de outros fatores além da massa molecular, já que o SDS pode não ser capaz de neutralizar todas as variáveis de formas e de cargas de uma proteína (Flynn, 1998). É bem provável que alguns tratamentos antes da aplicação da amostra em gel, como por exemplo a redução do peptídeo com o agente redutor DTT, juntamente com a alquilação através do uso de iodoacetamida, possam auxiliar na visualização da banda de interesse em uma massa molecular mais próxima de 6 kDa.

A técnica de SDS-PAGE proposta por Schagger e colaboradores, que utiliza tampão contendo tris e tricina, foi utilizada pois possibilitaria uma melhor visualização

de proteínas abaixo de 30 kDa (Schagger *et al.*, 1987). Nossos resultados confirmam que esta técnica se mostra eficiente para visualização das proteínas de baixa massa molecular.

A expressão do peptídeo recombinante foi detectada também pelas técnicas de Western blot e Dot blot, utilizado um anticorpo específico para caudas de histidina. Extratos livres de células de diferentes tempos de indução foram utilizados no experimento de Western blot, onde é possível observar a presença de um peptídeo de massa aproximada de 14 kDa a partir do tempo de 2 horas de indução, corroborando o resultado observado na eletroforese em SDS-PAGE. O experimento de Dot blot foi realizado com o objetivo de verificar em que frações o peptídeo LTx4 recombinante estava sendo expresso: na forma de corpos de inclusão e/ou na fração solúvel. Os resultados encontrados mostraram que o peptídeo recombinante foi expresso somente na forma de corpos de inclusão, sendo detectado à partir de 1 hora de indução. Sabe-se que a ligação antígeno-anticorpo na presença do detergente iônico SDS em concentrações acima de 0.2% é inibida em até 90%, enquanto que a ação de detergentes não-iônicos não interfere nesta ligação (Dimitriadis, 1979); este achado, descrito na literatura, pode explicar os nossos resultados, que mostram o reconhecimento do peptídeo no Dot blot (condições nativas) após 1 hora de indução e no Western blot (proteínas transferidas de SDS-PAGE) somente após duas horas de indução. A detecção de outras bandas no ensaio de Western blot pode ser explicada pela possível formação de agregados do peptídeo recombinante e/ou pela detecção não específica.

A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* geralmente ocorre na forma de corpos de inclusão. Os corpos de inclusão são agregados densos de polipeptídeos, que ocorrem devido à incapacidade da célula hospedeira em produzir peptídeos solúveis e em sua conformação correta (Middelberg, 2002), já que a maquinaria das células procarióticas é incapaz de processar os altos níveis de expressão que ocorrem durante a produção de proteínas recombinantes (Qoronfleh et al, 2007). Os benefícios da expressão de proteínas na forma de corpos de inclusão são: altos níveis de expressão (podendo chegar a mais de 30% do total de proteínas celulares), proteínas mais estáveis e resistentes à proteólise, proteção da célula hospedeira a uma possível toxicidade da proteína recombinante. Além disso, por serem mais densos que os contaminantes bacterianos, são facilmente purificados do extrato total (Singh e Panda, 2005). Contudo,

essas características só serão realmente vantajosas se as proteínas de interesse puderem ser renaturadas com altos rendimentos (Qoronfleh et al, 2007).

Uma ferramenta muito utilizada para a detecção e purificação de proteínas é a expressão de proteínas recombinantes em fusão com caudas de afinidade. Determinados resíduos de aminoácidos interagem com íons metálicos imobilizados em suporte sólido (Porath, 1992). A cauda de poli histidina (His<sub>6</sub>) está entre as caudas de afinidade mais utilizadas na expressão de proteínas recombinantes (Debeljak *et al.*, 2006; Lichty *et al.*, 2005). A utilização de caudas de histidina nas extremidades N-terminal e C-terminal com o objetivo de facilitar a purificação de proteínas de interesse expressas em diferentes sistemas como, bactérias (Liu *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2005), leveduras (Wetterholm *et al.*, 2008; Lanfermeijer *et al.*, 1998), células de mamíferos (Janknecht *et al.*, 1992) e células de insetos (Andersen, 2004) vem sendo empregada com sucesso.

Uma alíquota do extrato total, do tempo de 3 horas de indução, foi incubada em tubo de 1,5 mL com 25 µL de resina carregada com íons cobalto (Co<sup>2+</sup>) e as eluições foram feitas em tampão com concentrações crescentes de imidazol. Nesse ensaio, foi possível observar a eluição em quantidades crescentes de uma fração de aproximadamente 14 kDa, após a adição de tampão em concentrações de 100mM, 200mM e 400mM de imidazol. Porém, a presença de proteínas indesejáveis torna necessária a otimização do processo de purificação. Relatos da literatura mostram que, apesar de ser bem abrangente, a purificação de proteínas com cauda de His<sub>6</sub> apresenta limitações, especialmente a ligação não específica de proteínas ricas em resíduos de cisteína e histidina (Westra *et al.*, 2001). A incubação da resina de afinidade com apenas as proteínas da fração insolúvel (corpos de inclusão) pode diminuir a presença de ligantes cotaminantes, trazendo melhores resultados ao processo de purificação.

## 6. CONCLUSÕES

Diante das evidências experimentais obtidas neste trabalho, concluímos que:

- A estratégia adotada possibilitou a clonagem da sequência codificante para o peptídeo LTx4 maduro no vetor de expressão pET21b;
- A expressão do peptídeo LTx4 recombinante foi mais eficiente nos tempos de 3 e 4 horas após adição do indutor;
- O peptídeo recombinante foi detectado tanto nos ensaios de Western blot como nos ensaios de Dot blot;
- Nas condições de trabalho utilizadas o peptídeo recombinante foi expresso somente na forma de corpos de inclusão;
- Os ensaios de purificação necessitam ser otimizados para a realização de futuros testes de atividade do peptídeo LTx4 recombinante.

## **7. PERSPECTIVAS**

- Otimizar e/ou testar novos métodos para a purificação do peptídeo LTx4 recombinante, tais como colunas de afinidade metálica, colunas com anticorpos anti His; introdução de técnicas de exclusão;
- Realizar testes farmacológicos e eletrofisiológicos;
- Estudar a ação do peptídeo recombinante em modelos vivos (insetos e mamíferos) para verificar uma possível atividade inseticida;
- Produzir anticorpos específicos que poderão ser utilizados em processos de purificação, no desenvolvimento de soros ou na varredura de outras bibliotecas.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M.E., 2004. Agatoxins: ion channel specific toxins from the American funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Toxicon* 43, 509-525.
- ANDERSEN, S. S. Expression and purification of recombinant vesicular glutamate transporter VGLUT1 using PC12 cells and High Five insect cells. **Biol.Proced.Online.**, v. 6, p. 105-112, 2004.
- ARAUJO, D. A.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.;BEIRAO, P. S. Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. **Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.**, v. 347, n. 2, p. 205-208, 1993.
- ATKINSON R. K. & WRIGHT L. G. (1992a). The involvement of collagenase in the necroses induced by the bites of some spiders. *Comp. Biochem. Physiol.* 102(1): 125-128.
- ATKINSON R. K. & WRIGHT L. G. (1992b) The modes of action of spider toxins on insects and mammals. *Biochem. Physiol.* 102c, No. 3, pp., 339-342.
- BELEBONI, R.O., PIZZO, A.B., FONTANA, A.C.K., CAROLINO,R.O.G., COUTINHO-NETTO, J., SANTOS,W.F. (2004). Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *European Journal of Pharmacology.* 493, 1 – 17.
- BLAGBROUGH, I.S., MOYA , E., TAYLOR, S., 1994. Polyamines and polyamine amides from wasps and spiders. *Biochem. Soc. Trans.* 22,888–893
- BLOOMQUIST, J. R. Mode of action of atracotoxin at central and peripheral synapses of insects. **Invert.Neurosci.**, v. 5, n. 1, p. 45-50, 2003.
- BRAUD, S.; BON, C.;WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 851-859, 2000.

- BRANTON, W.D., KOLTON, L., JAN, Y.N., YAN, L.Y., 1987. Neurotoxins from Plectreurys spider venom are potent presynaptic blockers in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 7, 4195-4200.
- BROWN, M. R.; SHEUMACK, D. D.; TYLER, M. I.;HOWDEN, M. E. Amino acid sequence of versutoxin, a lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax versutus*. **Biochem.J.**, v. 250, n. 2, p. 401-405, 1988.
- BUCARETCHI, F.; US REINALDO, C. R.; HYSLOP, S.; MADUREIRA, P. R.; DE CAPITANI, E. M.;VIEIRA, R. J. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. **Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo**, v. 42, n. 1, p. 17-21, 2000.
- CABBINESS, S. G.; GEHRKE, C. W.; KUO, K. C.; CHAN, T. K.; HALL, J. E.; HUDIBURG, S. A. et al. Polyamines in some tarantula venoms. **Toxicon**, v. 18, n. 5-6, p. 681-683, 1980.
- CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.;GUTIERREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Lett.**, 2009.
- CARRUTHERS, A.; CARRUTHERS, J. Botulinum toxin type A. *Am.Acad.Dermatol.*, v. 53, n. 2, p. 284-290, 2005.
- CASSOLA, A. C. ; AFECHÉ, S. C. Use of neurotoxins to study Ca<sup>2+</sup> channel functions. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 29, n. 12, p. 1759-1763, 1996.
- CARTILLO, J.C.Q; PATIÑO, R.O. Envenenamiento aracnídico em las Américas – Revista MEDUNAB. Vol. 5, número 13 - Mayo de 2002.
- CAVALIERI, M.; D'URSO, D.; LASSA, A.; PIERDOMINICI, E.; ROBELLO, M.;GRASSO, A. Characterization and some properties of the venom gland extract of a theridiid spider (*Steatoda paykulliana*) frequently mistaken for black widow spider (*Latrodectus tredecimguttatus*). **Toxicon**, v. 25, n. 9, p. 965-974, 1987.
- CHAN, T. K.; GEREN, C. R.; HOWELL, D. E.;ODELL, G. V. Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. **Toxicon**, v. 13, n. 1, p. 61-66, 1975.

- CHICHE, L.; GELLY J. C.; GRACY J.; KAAS Q.; LE-NGUYEN D.; HEITZ A. The KNOTTIN website and database: a new information system dedicated to the knottin scaffold. D156-D159 Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32.
- CHONG, Y., HAYES, J.L., WEN, S., SOLLOD, B.L., HAINS, P.G., HODGSON, W.C., BROADY, K.W., KING, G.F., NICHOLSON, G.M., 2006, unpublished data.
- CORDEIRO, M. N.; DE FIGUEIREDO, S. G.; VALENTIM, A. C.; DINIZ, C. R.; VON, E., V; GILROY, J. et al. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **Toxicon**, v. 31, n. 1, p. 35-42, 1993.
- CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; VALENTIM, A. C.; VON, E., V; GILROY, J.; RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **FEBS Lett.**, v. 310, n. 2, p. 153-156, 1992.
- CORZO G., GARCÍA E. D., CLEMENT H., PEIGNEUR S., ODELL G., TYGAT J., POSSANI L. D., ALAGÓN A. An insecticidal peptide from the therapsid *Brachypelma smithi* spider venom reveals common molecular features among spider species from different genera. **Peptides**, v. 29, p. 1901 - 1908, 2008.
- CORZO, G. ; ESCOUBAS, P. Pharmacologically active spider peptide toxins. **Cell Mol.Life Sci.**, v. 60, n. 11, p. 2409-2426, 2003.
- CORZO, G.; ESCOUBAS, P.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M.; KRISTENSEN, C. P.; NAKAJIMA, T. Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). **Eur.J.Biochem.**, v. 267, n. 18, p. 5783-5795, 2000.
- CORZO, G.; GILLES, N.; SATAKE, H.; VILLEGAS, E.; DAI, L.; NAKAJIMA, T. et al. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. **FEBS Lett.**, v. 547, n. 1-3, p. 43-50, 2003.
- CULL-CANDY, S. G.; NEAL, H.; USHERWOOD, P. N. Action of black widow spider venom on an aminergic synapse. **Nature**, v. 241, n. 5388, p. 353-354, 1973.

- DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693-709, 2004.
- DE CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; ARAUJO, S. C.; GABRIEL DE, M. Y.; MANGILI, O. C.; CRUZ, I. et al. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 273-280, 2004.
- DE DEUS, A. D. T. **Caracterização do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp.** 2003. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Farmacologia Bioquímica Molecular - Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.
- DE FIGUEIREDO, S. G.; DE LIMA, M. E.; NASCIMENTO, C. M.; DINIZ, C. R.; PATTEN, D.; HALLIWELL, R. F. et al. Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurones. **Toxicon**, v. 39, n. 2-3, p. 309-317, 2001.
- DE LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; PIMENTA, A. M.; SANTOS, D. M.; BORGES, M. H.; CORDEIRO, M. N. et al. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. **Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol.**, v. 146, n. 1-2, p. 264-279, 2007.
- DE LIMA, M. E.; STANKIEWICZ, M.; HAMON, A.; DE FIGUEIREDO, S. G.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R. et al. The toxin Tx4(6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na(+) current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3. **J.Insect Physiol**, v. 48, n. 1, p. 53-61, 2002.
- DE MOURA, M. B. **Varredura de uma biblioteca de cDNA de *Lasiadora* sp. utilizando-se de anticorpos contra a fração P3 do veneno e caracterização de toxinas.** 2004. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB - Universidade Federal de Ouro Preto, 2004.
- DEBELJAK, N.; FELDMAN, L.; DAVIS, K. L.; KOMEL, R.; SYTKOWSKI, A. J. Variability in the immunodetection of His-tagged recombinant proteins. **Anal.Biochem.**, v. 359, n. 2, p. 216-223, 2006.
- DIMITRIADIS, G. J. Effect of detergents on antibody-antigen interaction. **Anal.Biochem.**, v. 98, n. 2, p. 445-451, 1979.

- DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol.Rev.**, v. 51, n. 1, p. 7-61, 1999.
- DIOCHOT, S.; DRICI, M. D.; MOINIER, D.; FINK, M.; LAZDUNSKI, M. Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis. **Br.J.Pharmacol.**, v. 126, n. 1, p. 251-263, 1999.
- DOWN, R.E., FITCHES, E.C., WILES, D.P., CORTI, P., BELL, H.A., GATEHOUSE, J.A., EDWARDS, J.P., 2006. Insecticidal spider venom toxin fused to snowdrop lectin is toxic to the peachpotato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Pest Manag. Sci.* 62, 77-85.
- DU PLESSIS, L. H.; ELGAR, D.; DU PLESSIS, J. L. Southern African scorpion toxins: an overview. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 1-9, 2008.
- DUTRA, A. A. **Clonagem e Expressão do cDNA codificante para a toxina do veneno de *Lasiodora* sp, LTx2, em vetor de expressão pET11a.** 2006. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB - Universidade Federal de Ouro Preto, 2006.
- DUTRA, A. A.; SOUSA, L. O.; RESENDE, R. R.; BRANDAO, R. L.; KALAPOTHAKIS, E.; CASTRO, I. M. Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiodora* sp. effecting on calcium channels. **Peptides**, v. 29, n. 9, p. 1505-1513, 2008.
- ENGVALL, E. ; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry.**, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.
- ESCOUBAS, P.; DE, W., Jr.; LECOQ, A.; DIOCHOT, S.; WALDMANN, R.; CHAMPIGNY, G. et al. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na<sup>+</sup> channels. **J.Biol.Chem.**, v. 275, n. 33, p. 25116-25121, 2000a.
- ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 893-907, 2000b.

- ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S., CELERIER, M.L., NAKAJIMA, T., LAZDUNSKI, M., 2002. Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Mol. Pharmacol.* 62, 48–57.
- ESCOUBAS, P.; RASH, L. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. **Toxicon**, v. 43, n. 5, p. 555-574, 2004.
- EULENBURG, V.; GOMEZA, J. Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Res. Rev.* (2010), doi:10.1016/j.brainresrev. 2010.01.003.
- FELICORI, L.; ARAUJO, S. C.; DE AVILA, R. A.; SANCHEZ, E. F.; GRANIER, C.; KALAPOTHAKIS, E. et al. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 509-519, 2006.
- FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583-2593, 1970.
- FIGUEIREDO, S. G.; GARCIA, M. E.; VALENTIM, A. C.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **Toxicon**, v. 33, n. 1, p. 83-93, 1995.
- FITCHES, E., EDWARDS, M.G., MEE, C., GRISHIN, E., GATEHOUSE, A.M., EDWARDS, J.P., GATEHOUSE, J.A., 2004. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *J. Insect Physiol.* 50, 61-71.
- FLETCHER, J. I.; SMITH, R.; O'DONOGHUE, S. I.; NILGES, M.; CONNOR, M.; HOWDEN, M. E. et al. The structure of a novel insecticidal neurotoxin,  $\omega$ -atracotoxin-HV1, from the venom of an Australian funnel web spider. *Nat.Struct.Biol.*, v. 4, n. 7, p. 559-566, 1997.
- FLYNN, E. Estimating protein molecular weights using SDS-PAGE. *Focus* (1998) Volume 20, number 1, p 24-25.

- GERSHBURG, E.; STOCKHOLM, D.; FROY, O.; RASHI, S.; GUREVITZ, M.;CHEJANOVSKY, N. Baculovirus-mediated expression of a scorpion depressant toxin improves the insecticidal efficacy achieved with excitatory toxins. **FEBS Lett.**, v. 422, n. 2, p. 132-136, 1998.
- GOMES, V. M.; CARVALHO, A. O.; DA, C. M.; KELLER, M. N.; BLOCH, C., Jr.; DEOLINDO, P. et al. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 45, n. 7, p. 817-827, 2005.
- GORDON, D.; KARBAT, I.; ILAN, N.; COHEN, L.; KAHN, R.; GILLES, N. et al. The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 452-472, 2007.
- GRAY, W. R.; OLIVERA, B. M.;CRUZ, L. J. Peptide toxins from venomous *Conus* snails. **Annu.Rev.Biochem.**, v. 57, p. 665-700, 1988.
- GREENAMYRE, J. T. ; PORTER, R. H. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. **Neurology**, v. 44, n. 11 Suppl 8, p. S7-13, 1994.
- GRISHIN, E. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. **Eur.J.Biochem.**, v. 264, n. 2, p. 276-280, 1999.
- GUATIMOSIM, C.; ROMANO-SILVA, M. A.; CRUZ, J. S.; BEIRAO, P. S.; KALAPOTHAKIS, E.; MORAES-SANTOS, T. et al. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. **Br.J.Pharmacol.**, v. 122, n. 3, p. 591-597, 1997.
- GUREVITZ, M.; KARBAT, I.; COHEN, L.; ILAN, N.; KAHN, R.; TURKOV, M. et al. The insecticidal potential of scorpion beta-toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 473-489, 2007.
- GWEE, M. C.; NIRTHANAN, S.; KHOO, H. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R. M.;CHEAH, L. S. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clin.Exp.Pharmacol.Physiol**, v. 29, n. 9, p. 795-801, 2002.
- HAN, T. S.; TEICHERT, R. W.; OLIVERA, B. M.;BULAJ, G. *Conus* venoms - a rich source of peptide-based therapeutics. **Curr.Pharm.Des**, v. 14, n. 24, p. 2462-2479, 2008.

- HARVEY, A. L. Presynaptic effects of toxins. **Int.Rev.Neurobiol.**, v. 32, p. 201-239, 1990.
- HEARD, K.; O'MALLEY, G. F.; DART, R. C. Antivenom therapy in the Americas. **Drugs**, v. 58, n. 1, p. 5-15, 1999.
- HENKEL, A. W. ; SANKARANARAYANAN, S. Mechanisms of alpha-latrotoxin action. **Cell Tissue Res.**, v. 296, n. 2, p. 229-233, 1999.
- HEROLD, E.E., YALSH, T.L. (1992). Anesthesia and muscle relaxation with with intrathecal injections of AR636 and AG489, two acylpolyamines spider toxins, in rat. *Anesthesiology*. Sep; 77(3) 507 – 12.
- HUANG, B.; GUO, J.; YI, B.; YU, X.; SUN, L.; CHEN, W. Heterologous production of secondary metabolites as pharmaceuticals in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol.Lett.**, v. 30, n. 7, p. 1121-1137, 2008.
- ISBISTER, G. K. ; HIRST, D. Injuries from spider spines, not spider bites. **Vet.Hum.Toxicol.**, v. 44, n. 6, p. 339-342, 2002.
- ISBISTER, G. K.; SEYMOUR, J. E.; GRAY, M. R.; RAVEN, R. J. Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. **Toxicon**, v. 41, n. 4, p. 519-524, 2003.
- JANKNECHT, R. ; NORDHEIM, A. Affinity purification of histidine-tagged proteins transiently produced in HeLa cells. **Gene**, v. 121, n. 2, p. 321-324, 1992.
- KAISER, I. I.; GRIFFIN, P. R.; AIRD, S. D.; HUDIBURG, S.; SHABANOWITZ, J.; FRANCIS, B. et al. Primary structures of two proteins from the venom of the Mexican red knee tarantula (*Brachypelma smithii*). **Toxicon**, v. 32, n. 9, p. 1083-1093, 1994.
- KALAPOTHAKIS, E.; KUSHMERICK, C.; GUSMAO, D. R.; FAVARON, G. O.; FERREIRA, A. J.; GOMEZ, M. V. et al. Effects of the venom of a Mygalomorph spider (*Lasiadora* sp.) on the isolated rat heart. **Toxicon**, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2003.
- KENNEDY, R.T.; LI, Q.; PERRY, M. Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters. *Analytica Chimica Acta* 653, 1–22, 2009.

- KHAN, S.A., ZAFAR, Y., BRIDDON, R.W., MALIK, K.A., MUKHTAR, Z., 2006. Spider venom toxin protects plants from insect attack. *Transgenic Res.* 15, 349-357.
- KING, G. F. The wonderful world of spiders: preface to the special *Toxicon* issue on spider venoms. **Toxicon**, v. 43, n. 5, p. 471-475, 2004.
- KING, G. F. Review: Modulation of insect Ca<sub>v</sub> channels by peptidic spider toxins. *Toxicon* 49 (2007) 513–530.
- KOBAYASHI, K., FISCHER, J.B., KNAPO, A.G., MARGOLIN, L., DALY, D., REDDY, N.L., ROACH, B., McCORMICK, K., MEINWALD, J., GOLDIN, S.M., 1992. A novel polyamine calcium channel antagonist isolated from venom of the spider *Dolomedes okefinokensis*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 18,10
- KUSHMERICK, C.; MESQUITA DE, C. F.; DE, M. M.; MASSENSINI, A. R.; ROMANO-SILVA, M. A.; GOMEZ, M. V. et al. Effects of a *Lasiadora* spider venom on Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> channels. **Toxicon**, v. 39, n. 7, p. 991-1002, 2001.
- KWON, S. Y.; CHOI, Y. J.; KANG, T. H.; LEE, K. H.; CHA, S. S.; KIM, G. H. et al. Highly efficient protein expression and purification using bacterial hemoglobin fusion vector. **Plasmid**, v. 53, n. 3, p. 274-282, 2005.
- LANFERMEIJER, F. C.; VENEMA, K.; PALMGREN, M. G. Purification of a histidine-tagged plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase expressed in yeast. **Protein Expr.Purif.**, v. 12, n. 1, p. 29-37, 1998.
- LEE, J.K., JOHN, S.A., WEISS, J.N. (1999). Novel gating mechanism of polyamine block in the strong inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.1 *J. Gen. Physiol.* 113, 555 – 564.
- LEUNG, H.T., BRANTON, W.D., PHILLIPS, H.S., JAN, L., BYERLY, L., 1989. Spider toxins block calcium currents in *Drosophila*. *Neuron* 3, 767-772.
- LIANG, S. P; SHU Q., LU S. Y., GU X.C. The structure of spider toxin huwentoxin-II with unique disulfide linkage: Evidence for structural evolution. *Protein Science* (2002), 11:245–252.

- LIANG, S. An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [=Ornithoctonus huwena (Wang)]. **Toxicon**, v. 43, n. 5, p. 575-585, 2004.
- LICHTY, J. J.; MALECKI, J. L.; AGNEW, H. D.; MICHELSON-HOROWITZ, D. J.; TAN, S. Comparison of affinity tags for protein purification. **Protein Expr.Purif.**, v. 41, n. 1, p. 98-105, 2005.
- LIPKIN, A.; KOZLOV, S.; NOSYREVA, E.; BLAKE, A.; WINDASS, J. D.; GRISHIN, E. Novel insecticidal toxins from the venom of the spider *Segestria florentina*. **Toxicon**, v. 40, n. 2, p. 125-130, 2002.
- LIU, H. ; NAISMITH, J. H. A simple and efficient expression and purification system using two newly constructed vectors. **Protein Expr.Purif.**, v. 63, n. 2, p. 102-111, 2009.
- LLINAS, R.; SUGIMORI, M.; LIN, J. W.; CHERKSEY, 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.U.S.A.**, v. 86, n. 5, p. 1689-1693, 1989.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J.Biol.Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon**, v. 26, n. 9, p. 759-772, 1988.
- LUCAS, S. M.; DA SILVA JUNIOR, P. I.; BERTANI, R.; CARDOSO, J. L. Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of Sao Paulo, Brazil. **Toxicon**, v. 32, n. 10, p. 1211-1215, 1994.
- LUNDY, P. M. ; FREW, R. Evidence of mammalian Ca<sup>2+</sup> channel inhibitors in venom of the spider *Plectreurys tristis*. **Toxicon**, v. 31, n. 10, p. 1249-1256, 1993.
- MAEDA, S.; VOLRATH, S. L.; HANZLIK, T. N.; HARPER, S. A.; MAJIMA, K.; MADDUX, D. W. et al. Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus. **Virology**, v. 184, n. 2, p. 777-780, 1991.

- MAGGIO, F. ; KING, G. F. Role of the structurally disordered N- and C-terminal residues in the Janus-faced atracotoxins. **Toxicon**, v. 40, n. 9, p. 1355-1361, 2002.
- MARKLAND, F. S., Jr. Snake venoms. **Drugs**, v. 54 Suppl 3, p. 1-10, 1997.
- MARTIN-MOUTOT, N.; MANSUELLE, P.; ALCARAZ, G.; DOS SANTOS, R. G.; CORDEIRO, M. N.; DE LIMA, M. E. et al. *Phoneutria nigriventer* toxin 1: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with micro conotoxin binding sites. **Mol.Pharmacol.**, v. 69, n. 6, p. 1931-1937, 2006.
- MCCORMICK, L.D., KOBAYASHI, K., GOLDIN, S.M., REDDY, N.L., MEINWALD, J. (1993). Characterization and synthesis of a new calcium antagonist from the venom of a sishing spider. *Tetrahedron*. 49, 11155 – 11168.
- MCCORMICK, K.D., MEINWALD, J., 1993. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. *J. Chem. Ecol.* 19, 2411–2451.
- MCCUTCHEN, B. F.; CHOUDARY, P. V.; CRENSHAW, R.; MADDOX, D.; KAMITA, S. G.; PALEKAR, N. et al. Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: potential for pest control. **Biotechnology (N.Y.)**, v. 9, n. 9, p. 848-852, 1991.
- MCDONOUGH, S. I.; LAMPE, R. A.; KEITH, R. A.; BEAN, B. P. Voltage-dependent inhibition of N- and P-type calcium channels by the peptide toxin omega-grammotoxin-SIA. **Mol.Pharmacol.**, v. 52, n. 6, p. 1095-1104, 1997.
- MCINTOSH, M.; CRUZ, L. J.; HUNKAPILLER, M. W.; GRAY, W. R.; OLIVERA, B. M. Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 218, n. 1, p. 329-334, 1982.
- MEBS, D. Toxicity in animals. Trends in evolution? **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 87-96, 2001.
- MENEZ, A.; STOCKLIN, R.; MEBS, D. 'Venomics' or : The venomous systems genome project. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 255-259, 2006.
- MILESCU, M.; VOBECKY, J.; ROH, S. H.; KIM, S. H.; JUNG, H. J.; KIM, J. I. et al. Tarantula toxins interact with voltage sensors within lipid membranes. **J.Gen.Physiol**, v. 130, n. 5, p. 497-511, 2007.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual de Tratamento e Diagnóstico de Acidentes com Animais Peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. ISBN 85-7346-014-8.
- MINTZ, I.M., VENEMA, V.J., SWIDEREK, K.M., LEE, T.D., BEAN, B.P., ADAMS, M.E., 1992. P-type calcium channels blocked by the spider toxin  $\alpha$ -Aga-IVA. *Nature* 355, 827-829.
- MORAN, Y.; GORDON, D.; GUREVITZ, M. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels - molecular and evolutionary features. **Toxicon**, 2009.
- MUKHERJEE, A.K., SOLLOD, B.L., WIKEL, S.K., KING, G.F., 2006. Orally active acaricidal peptide toxins from spider venom. *Toxicon* 47, 182-187.
- MULLER, G. J. Scorpionism in South Africa. A report of 42 serious scorpion envenomations. **S.Afr.Med.J.**, v. 83, n. 6, p. 405-411, 1993.
- NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; NAKAI, M.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y. et al. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 92, n. 12, p. 5605-5609, 1995.
- NAKASHIMA, K.; OGAWA, T.; ODA, N.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; KIHARA, H. et al. Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A2 isozymes. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 90, n. 13, p. 5964-5968, 1993.
- NICHOLSON, G. M. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon* 49 (2007) 490–512.
- NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; CHIJIWA, T.; NAKASHIMA, K.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y. et al. Structures of genes encoding phospholipase A2 inhibitors from the serum of *Trimeresurus flavoviridis* snake. **Gene**, v. 191, n. 1, p. 31-37, 1997.
- NORTON, R.S. & PALLAGHY, P.K. (1998). The cystine-knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon*, 36, 1573 – 1583.
- OERKE, E.-C., 1994. ESTIMATED CROP LOSSES DUE TO PATHOGENS, ANIMAL PESTS AND WEEDS. IN: OERKE, E.-C., DEHNE, H.-W.,

- SCHONBECK, F., WEBER, A. (Eds.), Crop Production and Crop Protection– Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. Elsevier, Amsterdam, pp. 72-78.
- OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y. et al. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A2 isozymes for acquisition of diverse physiological functions. **Toxicon**, v. 34, n. 11-12, p. 1229-1236, 1996.
- OGAWA, T.; ODA, N.; NAKASHIMA, K.; SASAKI, H.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y. et al. Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A2 isozymes. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 89, n. 18, p. 8557-8561, 1992.
- OLSEN, C.A., WITT, M., JOROSZEWSKI, J.W., FRANZYK, H. (2004). Solid-phase synthesis of rigid Acylpolyamines using temporary N-4,4'-Dimethoxytrityl protection in the presence of Trytil linkers. *Journal of Organic Chemistry*. 69, 6149 – 6152.
- PETERSON, M. E. Brown spider envenomation. **Clin.Tech.Small Anim Pract.**, v. 21, n. 4, p. 191-193, 2006.
- PHAM TRUNG, N., FITCHES, E., GATEHOUSE, J.A., 2006. A fusion protein containing a lepidopteran-specific toxin from the South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects. *BMC Biotechnol.* 6, 18.
- PINTO, J. E.; ROTHLIN, R. P.; DAGROSA, E. E. Noradrenaline release by *Latrodectus mactans* venom in guinea-pig atria. **Toxicon**, v. 12, n. 4, p. 385-393, 1974.
- PISER, T. M.; LAMPE, R. A.; KEITH, R. A.; THAYER, S. A. omega-Grammotoxin blocks action-potential-induced Ca<sup>2+</sup> influx and whole-cell Ca<sup>2+</sup> current in rat dorsal-root ganglion neurons. **Pflugers Arch.**, v. 426, n. 3-4, p. 214-220, 1994.
- PLATNICK, N.I., 1993. *Advances in Spider Taxonomy, 1988-1991*. The New York Entomological Society, New York.
- PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Protein Expr.Purif.**, v. 3, n. 4, p. 263-281, 1992.

RAITERI L.; RAITERI M.; BONANNO G. Coexistence and function of different neurotransmitter transporters in the plasma membrane of CNS neurons. *Progress in Neurobiology* 68 (2002) 287–309.

RAJENDRA, W.; HACKETT, K. J.; BUCKLEY, E.;HAMMOCK, B. D. Functional expression of lepidopteran-selective neurotoxin in baculovirus: potential for effective pest management. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1760, n. 2, p. 158-163, 2006.

RASH, L. D. ; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, v. 40, n. 3, p. 225-254, 2002.

REGEV, A.; RIVKIN, H.; INCEOGLU, B.; GERSHBURG, E.; HAMMOCK, B. D.; GUREVITZ, M. et al. Further enhancement of baculovirus insecticidal efficacy with scorpion toxins that interact cooperatively. **FEBS Lett.**, v. 537, n. 1-3, p. 106-110, 2003.

ROCHA E SILVA; BERALDO, W. T.;ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am.J.Physiol**, v. 156, n. 2, p. 261-273, 1949.

ROMANO-SILVA, M.A., RIBEIRO, A.M., RIBEIRO-SANTOS, R., GOMEZ, M.V., DINIZ, C.R., CORDEIRO, M.N., BRAMMER, M.J.(1993). Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for calcium entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTx2 and potassium depolarization. *Biochem. J.* 269, 313 – 319.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. Roca. 7ª Edição. São Paulo:2005. ISBN 85-7241-571-8.

SANGER, F.; NICKLEN, S.;COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANGUINETTI, M. C.; JOHNSON, J. H.; HAMMERLAND, L. G.; KELBAUGH, P. R.; VOLKMANN, R. A.; SACCOMANO, N. A. et al. Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. **Mol.Pharmacol.**, v. 51, n. 3, p. 491-498, 1997.

- SAUCIER, J. R. Arachnid envenomation. **Emerg.Med.Clin.North Am.**, v. 22, n. 2, p. 405-22, ix, 2004.
- SAVEL-NIEMANN, A. Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multicomponent system. **Biol.Chem.Hoppe Seyler**, v. 370, n. 5, p. 485-498, 1989.
- SCHAGGER, H. ; VON, J. G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal.Biochem.**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.
- SCHANBACHER, F. L.; LEE, C. K.; HALL, J. E.; WILSON, I. B.; HOWELL, D. E.;ODELL, G. V. Composition and properties of tarantula *Dugesiella hentzi* (Girard) venom. **Toxicon**, v. 11, n. 1, p. 21-29, 1973a.
- SCHANBACHER, F. L.; LEE, C. K.; WILSON, I. B.; HOWELL, D. E.;ODELL, G. V. Purification and characterization of tarantula, *Dugesiella hentzi* (Girard) venom hyaluronidase. **Comp Biochem.Physiol B**, v. 44, n. 2, p. 389-396, 1973b.
- SCHMIDT, G. Efficacy of bites from Asiatic and African tarantulas. **Trop.Med.Parasitol.**, v. 40, n. 2, p. 114-1989.
- SEIDEL, H. M.; POMPLIANO, D. L.;KNOWLES, J. R. Phosphonate biosynthesis: molecular cloning of the gene for phosphoenolpyruvate mutase from *Tetrahymena pyriformis* and overexpression of the gene product in *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 31, n. 9, p. 2598-2608, 1992.
- SHEUMACK, D. D.; CLAASSENS, R.; WHITELEY, N. M.;HOWDEN, M. E. Complete amino acid sequence of a new type of lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax robustus*. **FEBS Lett.**, v. 181, n. 1, p. 154-156, 1985.
- SHIEH, C. C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J. P.;GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacol.Rev.**, v. 52, n. 4, p. 557-594, 2000.
- SHU, Q. ; LIANG, S. P. Purification and characterization of huwentoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. **J.Pept.Res.**, v. 53, n. 5, p. 486-491, 1999.

- SINGH, B.R, Intimate detail of the most poisonous poison, *Nat.Struct.Biol.*7(2000)617–619.
- SKINNER, W. S.; ADAMS, M. E.; QUISTAD, G. B.; KATAOKA, H.; CESARIN, B. J.; ENDERLIN, F. E. et al. Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. **J.Biol.Chem.**, v. 264, n. 4, p. 2150-2155, 1989.
- STAPLETON, A.; BLANKENSHIP, D. T.; ACKERMANN, B. L.; CHEN, T. M.; GORDER, G. W.; MANLEY, G. D. et al. Curtatoxins. Neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from the funnel-web spider *Hololena curta*. **J.Biol.Chem.**, v. 265, n. 4, p. 2054-2059, 1990.
- STEWART, L. M.; HIRST, M.; LOPEZ, F. M.; MERRYWEATHER, A. T.; CAYLEY, P. J.; POSSEE, R. D. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. **Nature**, v. 352, n. 6330, p. 85-88, 1991.
- Stromgaard, K., Andersen, K., Krogsgaard-Larsen, P., Jaroszewski, J.W., 2001. Recent advances in the medicinal chemistry of polyamine toxins. *MiniRev. Med. Chem.* 1,317–338.
- SUN, Q. M.; CHEN, L. L.; CAO, L.; FANG, L.; CHEN, C.; HUA, Z. C. An improved strategy for high-level production of human vasostatin120-180. **Biotechnol.Prog.**, v. 21, n. 4, p. 1048-1052, 2005.
- SWANSON, D. L. ; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clin.Dermatol.**, v. 24, n. 3, p. 213-221, 2006.
- SWARTZ, K. J. ; MACKINNON, R. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. **Neuron**, v. 15, n. 4, p. 941-949, 1995.
- TEDFORD, H. W.; SOLLOD, B. L.; MAGGIO, F.; KING, G. F. Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. *Toxicon*, v. 43, n. 5, p. 601-618, 2004.
- TERLAU, H. ; OLIVERA, B. M. Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. **Physiol Rev.**, v. 84, n. 1, p. 41-68, 2004.

- TIMMS, P. K. ; GIBBONS, R. B. Latrodectism--effects of the black widow spider bite. **West J.Med.**, v. 144, n. 3, p. 315-317, 1986.
- TSIEN, R. W.; ELLINOR, P. T.;HORNE, W. A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. **Trends Pharmacol.Sci.**, v. 12, n. 9, p. 349-354, 1991.
- TYTGAT, J.; DEBONT, T.; ROSTOLL, K.; MULLER, G. J.; VERDONCK, F.; DAENENS, P. et al. Purification and partial characterization of a 'short' insectotoxin-like peptide from the venom of the scorpion *Parabuthus schlechteri*. **FEBS Lett.**, v. 441, n. 3, p. 387-391, 1998.
- TZENG, M. C. ; SIEKEVITZ, P. The effect of the purified major protein factor (alpha-latrotoxin) of black widow spider venom on the release of acetylcholine and norepinephrine from mouse cerebral cortex slices. **Brain Res.**, v. 139, n. 1, p. 190-196, 1978.
- USHERWOOD, P. N.; DUCE, I. R.;BODEN, P. Slowly-reversible block of glutamate receptor-channels by venoms of the spiders, *Argiope trifasciata* and *Araneus gemma*. **J.Physiol (Paris)**, v. 79, n. 4, p. 241-245, 1984.
- USMANOV, P. B.; KALIKULOV, D.; SHADYEVA, N. G.; NENILIN, A. B.;TASHMUKHAMEDOV, B. A. Postsynaptic blocking of glutamatergic and cholinergic synapses as a common property of Araneidae spider venoms. **Toxicon**, v. 23, n. 3, p. 528-531, 1985.
- VETTER, R. S. ; ISBISTER, G. K. Medical aspects of spider bites. **Annu.Rev.Entomol.**, v. 53, p. 409-429, 2008.
- VIEIRA, A. L. **Varredura de uma biblioteca de cDNA da aranha *Lasiadora* sp utilizando-se de antisoro policlonal anti-veneno total e clonagem das seqüências codificantes para LTx1 e LTx3 no vetor de expressão bacteriano pET-11a.** 2005. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB - Universidade Federal de Ouro Preto, 2005.
- WANG, X.-H., SMITH, R., FLETCHER, J.I., WILSON, H., WOOD, C.J., HOWDEN, M.E.H., KING, G.F., 1999. Structure-function studies of  $\omega$ -atracotoxin, a potent antagonist of insect voltage-gated calcium channels. *Eur. J. Biochem.* 264, 488-494.

- WANG, X.; CONNOR, M.; SMITH, R.; MACIEJEWSKI, M. W.; HOWDEN, M. E.; NICHOLSON, G. M. et al. Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. **Nat.Struct.Biol.**, v. 7, n. 6, p. 505-513, 2000.
- WANG, X. H.; CONNOR, M.; WILSON, D.; WILSON, H. I.; NICHOLSON, G. M.; SMITH, R. et al. Discovery and structure of a potent and highly specific blocker of insect calcium channels. **J.Biol.Chem.**, v. 276, n. 43, p. 40306-40312, 2001.
- WASSERMAN, G. S. ; ANDERSON, P. C. Loxoscelism and necrotic arachnidism. **J.Toxicol.Clin.Toxicol.**, v. 21, n. 4-5, p. 451-472, 1983.
- WEISS, R. E. ; HORN, R. Single-channel studies of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium channels in developing rat muscle reveal different open channel properties. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, v. 479, p. 152-161, 1986.
- WESTRA, D. F.; WELLING, G. W.; KOEDIJK, D. G.; SCHEFFER, A. J.; THE, T. H.;WELLING-WESTER, S. Immobilised metal-ion affinity chromatography purification of histidine-tagged recombinant proteins: a wash step with a low concentration of EDTA. **J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.**, v. 760, n. 1, p. 129-136, 2001.
- WHETSTONE, P. A. ; HAMMOCK, B. D. Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 576-596, 2007.
- ZHANG, P. F.; CHEN, P.; HU, W. J.;LIANG, S. P. Huwentoxin-V, a novel insecticidal peptide toxin from the spider *Selenocosmia huwena*, and a natural mutant of the toxin: indicates the key amino acid residues related to the biological activity. **Toxicon**, v. 42, n. 1, p. 15-20, 2003.

## 9. ANEXO 1

Cromatograma referente ao sequenciamento do clone positivo contendo a sequência codificante para o peptídeo LTx4. Em destaque está representado o códon de iniciação, a sequência do peptídeo LTx4 maduro, a cauda de histidina e o códon de parada.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)