

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia

BRENO RATES AZEVEDO

**Análise peptidômica de venenos animais**

Belo Horizonte

2011

BRENO RATES AZEVEDO

## **Análise peptidômica de venenos animais**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

**Orientador:** Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta

**Co-Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elena de Lima Perez Garcia

Belo Horizonte


2011



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE BRENO RATES AZEVEDO.**  
 Aos nove dias do mês de dezembro de 2011 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da tese de doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Análise peptidômica de venenos animais" requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão, Prof. Adriano Monteiro de Castro Pimenta após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. André Junqueira Zaharenko do Instituto Butantan, aprovado; Dr. Daniel Carvalho Pimenta do Instituto Butantan, aprovado; Dr. Evanguedes Kalapothakis da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Dawidson Assis Gomes da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 9 de dezembro de 2011.

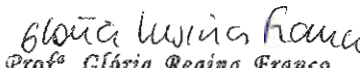
  
 Dr. André Junqueira Zaharenko - Instituto Butantan

  
 Dr. Daniel Carvalho Pimenta - Instituto Butantan

  
 Dr. Evanguedes Kalapothakis - UFMG

  
 Dr. Dawidson Assis Gomes - UFMG

  
 Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta - orientador - UFMG

  
 Prof. Glória Regina Franco  
 Subcoordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

## Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (LVTA) e no Núcleo de Estudo de Estrutura e Função de Biomoléculas, ambos situados no Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Agradeço aos meus orientadores Dr. Adriano M. C. Pimenta e Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia por me haverem guiado ao longo de minha enriquecedora trajetória na toxinologia. Registro meu enorme apreço pelos colegas do LVTA, o qual foi adquirido durante nossa longa e aprazível convivência. Dentre eles, sou especialmente grato ao Dr. Agenor Valadares, ao Sr. Carlos Líverton e à Srta. Ivanildce Ireo pelos préstimos durante a elaboração deste estudo.

Aponto a valiosíssima contribuição do Dr. Carlos Bloch, do Dr. Luciano Paulino, da Dra. Maura Prates e da Dra. Mariana Quezado, integrantes do Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da unidade de Recursos Genéticos e Biotecnologia, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sinto-me honrado por ter tido a oportunidade de desenvolver parte deste trabalho naquele laboratório, que é referência nacional em espectrometria de massa e em pesquisas sobre peptídeos biologicamente ativos, e de compartilhar experiências com esses pesquisadores vanguardistas.

Agradeço também à Dra. Ilka Biondi, do Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, pelo fornecimento da peçonha de *Acanthoscurria natalensis*; ao Dr. Bruno Lapied, do *Laboratoire de Neurophysiologie Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires*, da *Université d'Angers*, pela realização dos experimentos em neurônios DUM; ao Dr. Thiago Braga, do *Department of Biochemistry and Molecular Biology*, da *University of Southern Denmark*, pela realização dos experimentos com LTQ-Orbitrap; ao Dr. Michael Richardson e à Dra. Márcia Borges, do Centro de Pesquisa Prof. Carlos Ribeiro Diniz, da Fundação Ezequiel Dias, pela realização de sequenciamentos N-terminais; ao Sr. Hugo Leonardo, do Laboratório de Membranas Excitáveis, do ICB/UFMG e ao Sr. Eder Moraes do Laboratório de Eletrofisiologia Celular Departamento de Fisiologia e Biofísica, do ICB/UFMG, pela realização de experimentos em células de DRG.

Finalmente, é mister destacar que a elaboração deste estudo tornou-se possível graças aos recursos financeiros oriundos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; da Financiadora de Estudos e Projetos; do Ministério de Ciência e Tecnologia; da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas; e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## Resumo

O presente estudo visou à prospecção e caracterização de peptídeos biologicamente ativos em venenos de animais representantes da biodiversidade brasileira, nomeadamente, *Tityus serrulatus* (Arachnida, Scorpiones, Buthidae), *Acanthoscurria natalensis* (Arachnida, Araneae, Theraphosidae) e *Phasmahyla jandaia* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). Para tanto, empregou-se espectrometria de massa como ferramenta central. Destacam-se o seqüenciamento de novas famílias ou variantes peptídicos do veneno de *T. serrulatus* e da secreção dérmica de *P. jandaia*, o que permitiu inferências sobre a biologia desses sistemas defensivos, e a determinação da estrutura primária completa da toxina  $\mu$ -TRTX-An1a do veneno de *A. natalensis*. Ademais, demonstrou-se que a  $\mu$ -TRTX-An1a, em preparação de neurônios DUM de *Periplaneta americana*, provoca aumento na frequência de descargas espontâneas e diminuição da amplitude dos potenciais de ação.

**Palavras-chave:** *Tityus serrulatus*; *Acanthoscurria natalensis*; *Phasmahyla jandaia*; peptídeos biologicamente ativos; espectrometria de massa; seqüenciamento *de novo*.

## Abstract

The present study aimed at the prospection and characterization of biologically active peptides in venoms of animal representatives of the Brazilian biodiversity, namely *Tityus serrulatus* (Arachnida, Scorpiones, Buthidae), *Acanthoscurria natalensis* (Arachnida, Araneae, Theraphosidae) and *Phasmahyla jandaia* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). For the attainment of such goal, mass spectrometry was employed as the central tool. The sequencing of new peptidic families or variants from the venom of *T. serrulatus* and from the skin secretion of *P. jandaia*, which allowed inferences on the biology of these defensive systems, and the complete determination of the primary structure of the toxin  $\mu$ -TRTX-An1a from the venom of *A. natalensis* are highlighted. Moreover, it has been demonstrated that  $\mu$ -TRTX-An1a elicits an increase in the spontaneous discharges frequency and a diminishment in the action potential amplitude in *Periplaneta americana* DUM neuron preparation.

**Keywords:** *Tityus serrulatus*; *Acanthoscurria natalensis*; *Phasmahyla jandaia*; biologically active peptides; mass spectrometry; *de novo* sequencing.

## Lista de ilustrações

Figura 1. Representação da estrutura química básica de um peptídeo.....	14
Figura 2. Estrutura básica e estereoisomerismo em aminoácidos .....	15
Figura 3. Rotâmeros <i>trans</i> e <i>cis</i> de um dipeptídeo genérico .....	16
Figura 4. Representação da estrutura química de um peptídeo cíclico.....	18
Figura 5. Representação esquemática do sistema de nomenclatura Roepstorff-Fohlman-Biemann para os íons resultantes da quebra da cadeia de peptídeos.....	26
Figura 6. Purificação da $\mu$ -TRTX-An1a por meio de cromatografia bidimensional.....	57
Figura 7. Purificação da $\mu$ -TRTX-An1a por meio de cromatografia unidimensional.....	58
Figura 9. Efeitos da toxina $\mu$ -TRTX-An1a sobre a atividade elétrica espontânea em neurônios dorsais mediais não pareados de <i>Periplaneta americana</i> registrados em modo <i>current-clamp</i> .....	67
Figura 10. Efeitos da toxina $\mu$ -TRTX-An1a sobre a amplitude do potencial de ação em neurônios dorsais mediais não pareados de barata registrados em modo <i>current-clamp</i>	68
Figura 11. Efeitos da toxina $\mu$ -TRTX-An1a sobre correntes de influxo de $\text{Na}^+$ registradas em modo <i>voltage-clamp</i> em neurônios dorsais mediais não pareados de <i>Periplaneta americana</i> ; Comparação da relação corrente-voltagem ( <i>I-V</i> ) das correntes de $\text{Na}^+$ em neurônios dorsais mediais não pareados de <i>Periplaneta americana</i> .....	69



## Lista de tabelas

Tabela 1. Soluções utilizadas para experimentos eletrofisiológicos com neurônios DUM de <i>Periplaneta americana</i> .....	55
Tabela 2. Seqüenciamento N-terminal de $\mu$ -TRTX-An1a e $\mu$ -TRTX-An1a <sub>alq</sub> por degradação de Edman automatizada.....	59
Tabela 3. Determinação da massa monoisotópica (M) de $\mu$ -TRTX-An1a e $\mu$ -TRTX-An1a <sub>alq</sub> .....	60
Tabela 4. Interpretação do espectro MS/MS do íon $[M + 7H]^{+7}$ de $\mu$ -TRTX-An1a <sub>alq</sub> .....	61
Tabela 5. Determinação da estrutura primária completa da $\mu$ -TRTX-An1a.....	62
Tabela 6. Seqüências produzindo alinhamentos significantes com $\mu$ -TRTX-An1a. ....	63
Tabela B.1. Nomes e números de acesso no banco de dados UniProt Knowledgebase dos peptídeos seqüenciados em Rates, Ferraz <i>et al.</i> , 2008 .....	95
Tabela B.2. Alinhamento <i>Hypotensin-like peptide</i> , seqüenciado por Rates, Ferraz <i>et al.</i> , 2008, com hipotensinas seqüenciadas previamente .....	96
Tabela B.3. Alinhamento do fragmento do <i>Beta-Ktx-like propeptide</i> , seqüenciado por Rates, Ferraz <i>et al.</i> , 2008, com <i>Ponericin-L1</i> e <i>L2</i> .....	96
Tabela C.1. <i>Table 6</i> de Rates, Silva <i>et al.</i> , 2011 com formatação original .....	106
Tabela C.2. <i>Table 7</i> de Rates, Silva <i>et al.</i> , 2011 com formatação original .....	107

## Lista de abreviaturas e siglas

ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i> / Enzima conversora de angiotensina
ACEI	<i>Angiotensin-converting enzyme inhibitor</i> / Inibidor de enzima conversora de angiotensina
ACN	<i>Acetonitrile</i> / Acetonitrila
AMP	<i>Antimicrobial peptide</i> / Peptídeo antimicrobiano
ASIC	<i>Acid Sensitive Ion Channel</i> / Canal iônico sensível a ácido
BK	<i>Bradykinin</i> / Bradicinina
BPP	<i>Bradykinin potentiating peptide</i> / Peptídeo potenciador de bradicinina
BRP	<i>Bradykinin-related peptide</i> / Peptídeo relacionado a bradicinina
CAP	<i>Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP), Antigen 5 (Ag5) and Pathogenesis-Related (PR1) Proteins</i>
CD	<i>Circular dichroism</i> / Dicroísmo circular
CIEX	<i>Ion exchange chromatography</i> / Cromatografia de troca catiônica
DDH	<i>Disulfide-directed hairpin</i> / Alça direcionada por ponte dissulfeto
DRS	<i>Dermaseptin</i> / Dermaseptina
DRT	<i>Dermatoxin</i> / Dermatoxina
DTT	<i>Dithiothreitol</i> / Ditiotreitól
DUM	<i>Dorsal unpaired median neurones</i> / Neurônios dorsais não pareados medianos
ECD	<i>Electron capture dissociation</i> / Dissociação por captura de elétrons
ED	<i>Erectile dysfunction</i> / Disfunção erétil
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i> / Ácido etileno glicol tetra-acético
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i> / Óxido nítrico sintetase endotelial

EPM	Erro padrão de medida
ESI	<i>Electrospray ionization</i> / Ionização por eletronebulização
ESI-Q-TOF (-MS)	<i>Electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i> / Espectrometria de massa de quadrupolo e tempo de voo e ionização por eletronebulização
ETD	<i>Electron-transfer dissociation</i> / Dissociação por transferência de elétrons
FASP	<i>Filter-aided sample preparation</i> / Preparação de amostra assistida por filtro
FT-ICR (- MS)	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i> / Espectrometria de massa ressonância em ciclotron de íons e transformada de Fourier
HEPES	<i>4-2-hydroxyethyl-1-piperazine ethanesulfonic acid</i> / Ácido etanosulfônico 4- 2-hidroxietil piperazina-1
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> / Cromatografia líquida de alto desempenho
HPS	<i>Hyposin</i> / Hiposina
HVA	<i>High-voltage activated</i> / Ativado por alta voltagem
$I_{CaT}$ LVA	corrente transiente de $Ca^{2+}$ ativada em baixa voltagem
ICK	<i>Inhibitory Cysteine Knot</i> / Nó inibitório de cisteína
$I_{Cl,Ca}$	Corrente de $Cl^-$ sensível a $Ca^{2+}$
$I_H$	Corrente de influxo de $K^+$ ativadas por despolarização
$I_{KA}$	Corrente de $K^+$ do tipo A
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> / Óxido nítrico sintetase indutiva
IT	<i>Ion trap</i> / Armadilha de íons
LC	<i>Liquid chromatography</i> / Cromatografia líquida
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i> / Cromatografia líquida- espectrometria de massa
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> / Cromatografia líquida- espectrometria de massa <i>in tandem</i>

LIT	<i>Linear ion trap</i> / Armadilha de íons linear
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i> / Ionização e dessorção por laser assistida por matriz
MALDI-TOF (MS)	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i> / Espectrometria de massa de tempo de voo de ionização e dessorção por laser assistida por matriz
MALDI-TOF-TOF (MS)	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight time-of-flight mass spectrometry</i> / Espectrometria de massa de tempo de voo <i>in tandem</i> de ionização e dessorção por laser assistida por matriz
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> / Concentração inibitória mínima
MS	<i>Mass spectrometry</i> / Espectrometria de massa
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> / Espectrometria de massa <i>in tandem</i>
MSC	<i>Mechanosensitive Ion Channels</i> / Canais mecanossensíveis
NANC	Nonadrenergic noncolinergic / Não-adrenérgico e não-colinérgico
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> / Ressonância magnética nuclear
nNOS	<i>Neuronal nitric oxide synthase</i> / Óxido nítrico sintetase neuronal
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> / Óxido nítrico sintetase
ODLG	<i>Oxygen deprivation and low glucose</i> / Privação de oxigênio e baixa glicose
PAL	<i>Peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase</i> / Peptidilglicina alfa-hidroxilante-monoxigenase
PAM	<i>Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase</i> / Peptidilglicina alfa-amidante-monoxigenase
PDE 5	<i>Phosphodiesterase 5</i> / Fosfodiesterase 5
PHM	<i>Peptidyl-alpha-hydroxyglycine alpha-amidating lyase</i> / Peptidil-alfa-hidroxi-glicina-alfa-amidante-liase
PITC	<i>Phenyl isothiocyanate</i> / Fenilisotiocianato
PLA <sub>2</sub>	<i>Phospholipase A<sub>2</sub></i> / Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLS	<i>Phylloseptin</i> / Phylloseptina

PSD	<i>Post-source decay</i> / Decaimento pós-fonte
PTC	<i>Phenyl thiocarbamoyl</i> / Feniltiocarbamoil
PTH	<i>Phenyl thiohydantoin</i> / Feniltiohidantoína
Q	<i>Quadrupole</i> / Quadrupolo
QIT	<i>Quadrupole ion trap</i> /Quadrupolo armadilha de íons
QqQ	<i>Triple quadrupole</i> / Triplo quadrupolo
QqTOF	<i>Quadrupole-time of flight</i> / Quadrupolo-tempo de voo
RETOF	<i>Reflecton-time of flight</i> /Tempo de voo refletor
RP-HPLC	<i>Reversed phase high performance liquid chromatography</i> / Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa
RPC	<i>Reversed phase chromatography</i> / Cromatografia de fase reversa
sGC	<i>Soluble guanylyl cyclase</i> / Guanilil ciclase solúvel
STX	<i>Saxitoxin</i> / saxitoxina
TEA	<i>Trietanolamin</i> / Trietanolamina
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> / Ácido trifluoroacético
TOF-TOF	<i>Time of flight-time of flight</i> / Tempo de voo-tempo de voo
TPST	<i>Tyrosylprotein sulphotransferase</i> / Tiroxil-proteína sulfotransferase
TsHpt	<i>Tityus serrulatus hypotensin</i> / Hipotensina de <i>Tityus serrulatus</i>
TTX	<i>Tetrodotoxin</i> / Tetrodotoxina
VGCC	<i>Voltage-gated calcium channel</i> / Canal de cálcio ativado por voltagem

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>14</b>
1.1	Peptídeos: princípios estruturais e diversidade.....	14
1.2	Seqüenciamento de peptídeos .....	19
1.2.1	Método Edman .....	20
1.2.2	Espectrometria de massa <i>in tandem</i> .....	21
1.3	Venenos de origem animal .....	34
1.3.1	Investigação proteômica de venenos animais .....	40
<b>2</b>	<b>Objetivos e justificativa .....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>Seqüenciamento e estudo da atividade farmacológica da toxina <math>\mu</math>-TRTX-An1a, oriunda do veneno da aranha <i>Acanthoscurria natalensis</i> (Mygalomorphae, Theraphosidae).....</b>	<b>44</b>
3.1	Introdução.....	44
3.2	Material e métodos.....	48
3.2.1	Animais e obtenção de veneno.....	48
3.2.2	Purificação da M-TRTX-An1a .....	48
3.2.3	Redução e alquilação da M-TRTX-An1a .....	50
3.2.4	Seqüenciamento N-terminal.....	50
3.2.5	Espectrometria de massa .....	51
3.2.6	Análise de seqüência.....	52
3.2.7	Quantificação da M-TRTX-An1a .....	53
3.2.8	Ensaio eletrofisiológicos.....	53
3.3	Resultados e discussão .....	56
3.3.1	Purificação da M-TRTX-An1a .....	56
3.3.2	Determinação e análise da estrutura primária da M-TRTX-An1a .....	59
3.3.3	Ensaio eletrofisiológicos.....	67
3.4	Conclusão.....	71
<b>4</b>	<b>Conclusão global.....</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>Referências.....</b>	<b>74</b>
	<b>APÊNDICE A - From the stretcher to the pharmacy's shelf: drug leads from medically important Brazilian venomous arachnid species .....</b>	<b>84</b>
	<b>APÊNDICE B - <i>Tityus serrulatus</i> venom peptidomics: assessing venom peptide diversity ..</b>	<b>94</b>
	<b>B1. Informações complementares.....</b>	<b>95</b>
	<b>APÊNDICE C - Peptidomic dissection of the skin secretion of <i>Phasmahyla jandaia</i> (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) .....</b>	<b>105</b>
	<b>C1. Errata .....</b>	<b>106</b>

# 1 Introdução

## 1.1 Peptídeos: princípios estruturais e diversidade

Peptídeos podem ser definidos como polímeros de resíduos de aminoácidos concatenados a resíduos adjacentes por meio de uma ligação peptídica (Figura 1). Essas moléculas diferem-se das proteínas pelo número de aminoácidos que contêm; peptídeos possuem entre dois e uma centena de resíduos, ao passo que proteínas podem consistir em cadeias polipeptídicas com até vários milhares de resíduos (Nelson e Cox, 2004). No entanto, uma vez que suas extensões distribuem-se em um *continuum*, o limite para a diferenciação dessas duas classes moleculares é arbitrário (Sewald e Jakubke, 2002).

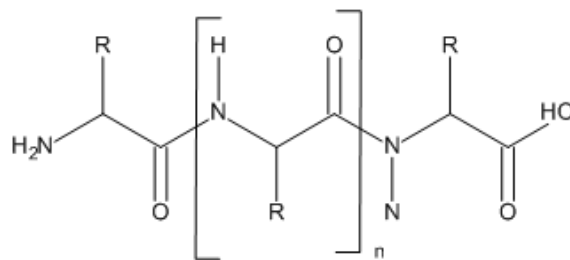
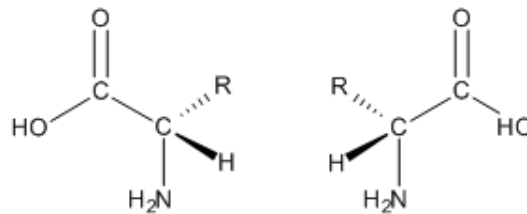


Figura 1. Representação da estrutura química básica de um peptídeo.

As cadeias peptídicas naturais, codificadas por ácidos nucleicos, são usualmente compostas por 20 aminoácidos diferentes. Os aminoácidos consistem em um grupo carboxila (-COOH), uma amina (-NH<sub>2</sub>), um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral (ou grupo R) ligados ao mesmo átomo de carbono, denominado carbono  $\alpha$  (Figura 2). As cadeias laterais, ou grupos R, que diferenciam os aminoácidos entre si, variam em estrutura, tamanho, carga elétrica e solubilidade em água (Nelson e Cox, 2004).

Com exceção da glicina, por ser covalentemente ligado a quatro elementos distintos (*i.e.*, -H, -COOH, -NH<sub>2</sub> e grupo R), o carbono  $\alpha$  constitui um centro quiral (Figura 2). No

entanto, salvo exceções resultantes de modificações pós-traducionais, os aminoácidos dos polipeptídeos naturais, mesmo em extremos opostos do espectro das formas de vida, apresentam a configuração *L* (Nelson e Cox, 2004).

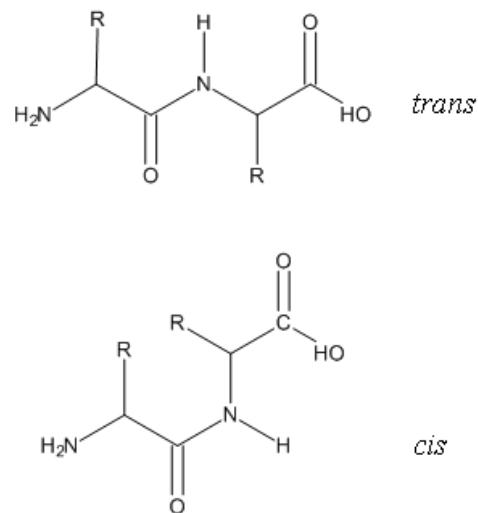


**Figura 2. Estrutura básica e estereoisomerismo em aminoácidos.** Estereoisômeros *L* e *D* de um aminoácido genérico mostrados à esquerda e à direita, respectivamente.

As ligações peptídicas são formadas pela remoção dos elementos da água (desidratação) do grupamento  $\alpha$ -carboxila de um aminoácido e do grupamento  $\alpha$ -amino de outro. O resíduo em uma das extremidades, que possui a  $\alpha$ -amina livre, é denominado de resíduo N-terminal; o resíduo da outra extremidade, que possui o grupo  $\alpha$ -carboxila livre, denomina-se resíduo C-terminal. A orientação N-terminal  $\rightarrow$  C-terminal é utilizada para representar seqüências peptídicas (Nelson e Cox, 2004).

Uma propriedade da ligação peptídica que possui importantes implicações estruturais refere-se à sua característica rígida e planar. Há um compartilhamento parcial de dois pares de elétrons entre o oxigênio da carbonila e o nitrogênio da amida. Esses elétrons em ressonância fazem com que a ligação peptídica tenha um caráter de ligação dupla e que, portanto, não haja livre rotação em seu eixo. Em princípio, a ligação peptídica poderia assumir configurações *cis* ou *trans* (Figura 3). No entanto, por motivos estéricos, a configuração *trans* é favorecida por um fator de 1000:1 sobre a *cis*. Dessa regra excetuam-se as ligações com resíduos de prolina os quais possuem uma pequena diferença de estabilidade entre seus rotâmeros (Nelson e Cox, 2004).





**Figura 3. Rotâmeros trans e cis de um dipeptídeo genérico.**

Devido à característica rígida da ligação peptídica, a conformação dos peptídeos é caracterizada pelo ângulo de torção nas ligações N-C<sub>α</sub> ( $\phi$ ), C<sub>α</sub>-C ( $\psi$ ). Interações desfavoráveis entre os átomos da cadeia principal ou das cadeias laterais resultantes de certas combinações dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$ , somadas à prevalência da configuração *trans* sobre a *cis* nas ligações peptídicas, impõem limites sobre os possíveis arranjos espaciais de uma cadeia polipeptídica. Ainda assim, existiriam inúmeras conformações teóricas possíveis. No entanto, apenas alguns arranjos predominam nas condições biológicas, por serem os mais termodinamicamente estáveis (Nelson e Cox, 2004).

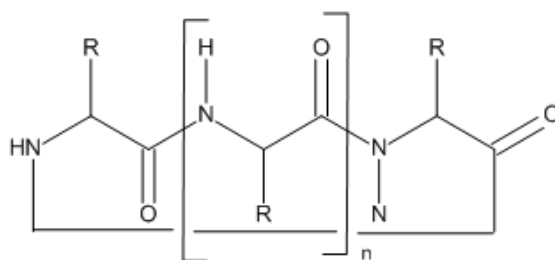
O universo de conformações estruturais de peptídeos e, principalmente, de proteínas pode ser intimidante. No entanto, à medida que um número crescente de estruturas são elucidadas, torna-se cada vez mais evidente que essas são uma manifestação de um número finito de padrões (ou motivos) conformacionais (Nelson e Cox, 2004).

Apesar disso, peptídeos de uma mesma família estrutural podem apresentar uma grande diversidade de atividades que resulta de modulações em sua seqüência de resíduos aminoácido. As toxinas de três dedos (*three-fingered toxins*) destacam-se como exemplos contundentes desse fato. Esses peptídeos cuja extensão varia de 60 a 74 resíduos possuem um núcleo estabilizado por quatro ou cinco pontes dissulfeto e apresentam voltas protuberantes que se assemelham a três dedos de uma mão, das quais seu nome deriva. Mais de 300 peptídeos com essa arquitetura molecular já foram descritos. Suas atividades farmacológicas

são diversas: os primeiros representantes dessa família de peptídeos a serem isolados, as  $\alpha$ -neurotoxinas, paralisam o músculo esquelético por meio do bloqueio de receptores nicotínicos de acetilcolina (ACh), na junção neuromuscular; diferentes representantes das chamadas toxinas muscarínicas são agonistas (MTx1 e MTx2) ou antagonistas (MTx3 e 7) de diferentes subtipos de receptores muscarínicos de ACh; as fasciculinas produzem uma inibição duradoura da enzima acetilcolinesterase, o que prolonga a ação da ACh; a mambina e a  $\gamma$ -bungarotoxina contêm a seqüência Arg-Gly-Asp - a assinatura clássica das proteínas que se ligam ao receptor IIb-IIIa das plaquetas - de modo que possuem atividade similar às desintegrinas, *i.e.*, atuam como inibidores da agregação plaquetária; os peptídeos FS2 e calciseptina reconhecem canais de  $\text{Ca}^{+2}$  do tipo L. Em células de músculo cardíaco e liso, ambos os peptídeos atuam como antagonistas dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  do tipo L. Em células de músculo esquelético a calciseptina atua como agonista desses receptores. Além dos representantes com atividade biológica conhecida, há ainda outras toxinas de três dedos cujas funções não foram determinadas (Harvey, 2006; Gross, Drevet *et al.*, 2009).

De maneira similar, as toxinas de aranhas terafosídeas, cuja diversidade farmacológica é extensa, estão restritas a peptídeos relativamente pequenos que se enquadram em um número limitado de padrões moleculares. A maioria dessas toxinas apresenta três pares de resíduos de cisteína e pode apresentar dois motivos estruturais que diferem entre si de acordo com o arranjo de suas pontes dissulfeto, nomeadamente *Inhibitory Cysteine Knot* (ICK) e *Dissulfide-Directed Hairpin* (DDH) (Escoubas e Rash, 2004). Também é possível mencionar o motivo  $\alpha\beta$  estabilizado por cisteína (*Cysteine Stabilized  $\alpha\beta$  motif* - CS $\alpha\beta$ ), recorrente em peptídeos que atuam sobre canais iônicos (Bontems, Roumestand *et al.*, 1991; Kobayashi, Takashima *et al.*, 1991; Possani e De La Vega, 2006).

Apesar de possuírem um pequeno tamanho e estrutura que obedece a um padrão simples, os peptídeos podem realizar uma vasta gama de atividades biológicas. Essa aparente contradição pode ser explicada pelo fato de que um decapeptídeo pode ter  $20^{10}$  possíveis seqüências possíveis. A diversidade de peptídeos também é grandemente aumentada pelos aminoácidos não usuais e por uma extensa lista de possíveis modificações pós-traducionais (*e.g.*, hidrólises, acetilação, hidroxilação, glicosilação, sulfatação, iodação, carboxilação, amidação, fosforilação, etc.). Além da grande variedade de peptídeos lineares, existem os chamados peptídeos cíclicos, criados a partir da formação de uma ligação peptídica entre os aminoácidos N- e C-terminais de um peptídeo linear (Figura 4) (Sewald e Jakubke, 2002).



**Figura 4. Representação da estrutura química de um peptídeo cíclico.**

## 1.2 Seqüenciamento de peptídeos

A atividade biológica dos peptídeos é uma função de seu arranjo espacial, que por sua vez está diretamente relacionado à sua estrutura primária. Como corolário, o conhecimento da seqüência de aminoácidos de um peptídeo pode revelar informações sobre sua função, localização celular, modificações químicas, estabilidade e evolução. Uma vez que famílias de proteínas e peptídeos compartilham características funcionais e estruturais, diversas informações podem ser acessadas e inferências podem ser feitas a partir de uma busca por similaridades de uma seqüência recém obtida com outras moléculas conhecidas (Nelson e Cox, 2004).

O seqüenciamento de ácidos nucléicos é mais rápido e mais conveniente que o seqüenciamento de proteínas e peptídeos. Tamanha é a velocidade das técnicas de seqüenciamento de DNA que genomas completos de diversos organismos foram e continuam sendo elucidados. A habilidade de descrever a coleção completa de genes em um organismo resultou na redefinição do estudo de sistemas biológicos, criando a ciência da genômica e suas derivações (Liebler, 2002). Apesar da conveniência da dedução da estrutura primária de peptídeos a partir de seqüências de ácidos nucléicos, o seqüenciamento direto da molécula peptídica permanece indispensável. A determinação da estrutura primária a partir da seqüência de DNA não provê evidência inequívoca de existência nem da identidade de modificações pós-traducionais. Ademais, a determinação da seqüência, ainda que parcial, de um peptídeo ou proteína de interesse permite a síntese de um fragmento de DNA que pode ser utilizado para identificar e isolar o gene correspondente (Sewald e Jakubke, 2002).

A presença em sistemas com múltiplos componentes, a baixa concentração e as pequenas quantidades em que são encontrados são, freqüentemente, fatores limitantes para o isolamento e a determinação da estrutura de peptídeos naturais (Sewald e Jakubke, 2002). Quiçá, um dos exemplos mais extremos da manifestação dessa limitação seja o isolamento da tiroliberina, um hormônio tripeptídico (piroglutamil-histidil-prolina-NH<sub>2</sub>). Em 1969, os grupos dos pesquisadores Roger Guillemin e Andrew Schally independentemente purificaram e caracterizaram essa molécula a partir do processamento de hipotálamos de aproximadamente um milhão de suínos e de *ca.* dois milhões de ovinos, respectivamente (Nelson e Cox, 2004). Tendo em vista situações como essa, o estudo de peptídeos naturais foi grandemente assistido pelo desenvolvimento de técnicas de alta sensibilidade como a

separação e purificação por cromatografia líquida de alto desempenho (*high performance liquid chromatography* – HPLC), o seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman automatizada e, principalmente, pelo avanço das técnicas de espectrometria de massa (Sewald e Jakubke, 2002; Escoubas, 2006).

### 1.2.1 Método Edman

O método de seqüenciamento N-terminal desenvolvido por Pehr Edman em 1949, é um processo cíclico que consiste nas etapas de *acoplamento*, *degradação* e *conversão* (Edman, 1949). Cada ciclo envolve a reação do aminoácido na extremidade N-terminal de uma cadeia peptídica com fenilisotiocianato (*phenyl isothiocyanate* - PITC) sob condição ligeiramente básica, que resulta na formação do aduto feniltiocarbamoil (*phenyl thiocarbamoyl* - PTC) (*viz.* acoplamento). Segue-se, então, a remoção do excesso de PITC e o tratamento com um ácido anidro forte, tal como o ácido trifluoroacético (*trifluoroacetic acid* – TFA) para clivar o aminoácido N-terminal, de modo a produzir seu derivativo 2-anilino-5-tiazolinona, deixando íntegro o restante das ligações peptídicas da cadeia (*viz.* degradação). Por meio de tratamento do derivativo 2-anilino-5-tiazolinona em TFA aquecido é formado o derivativo 3-fenil-2-tiohidantoína (*3-phenyl-2-thiohydantoin* - PTH) (*viz.* conversão). O PTH-aminoácido pode ser identificado, por exemplo, por meio de HPLC de fase reversa (*reversed phase high performance liquid chromatography* - RP-HPLC) com detecção por absorbância de luz ultravioleta (Sewald e Jakubke, 2002).

Com duração de cerca de 50 minutos por ciclo, o método Edman freqüentemente provê a seqüência exata e sem ambigüidades para segmentos de até aproximadamente 30 aminoácidos. Esse limite deve-se a reações incompletas em cada ciclo, que resultam na formação de pequenas quantidades dos derivativos de PTH correspondentes aos aminoácidos nas posições anteriores da seqüência. Essas sobreposições tornam inviável a interpretação de resultados após vários ciclos. O seqüenciamento de peptídeos maiores que 30 resíduos ou de proteínas é alcançado por meio de seu tratamento com agentes proteolíticos, purificação e seqüenciamento individual dos fragmentos (Sewald e Jakubke, 2002).

Outras limitações do método Edman residem no fato de que para esse procedimento são necessários 10 a 100 pmol de amostra purificada à homogeneidade e em sua

incompatibilidade com peptídeos cujos aminoácidos N-terminais estejam modificados (*e.g.*, ácido piroglutâmico N-terminal) (Sewald e Jakubke, 2002).

### 1.2.2 Espectrometria de massa *in tandem*

A espectrometria de massa provou-se uma ferramenta muito útil nos campos da análise de proteínas e de peptídeos, bem como na análise proteômica. Espectrômetros de massa consistem em três componentes principais, nomeadamente a *fonte*, o *analisador* e o *detector*. A fonte cumpre a função de ionizar as moléculas presentes na amostra. Os íons gerados são então separados em função de sua relação massa/carga ( $m/z$ )<sup>1</sup> pelo *analisador* e detectados pelo *detector*. Em suma, o funcionamento de um espectrômetro de massa baseia-se na conversão dos componentes de uma mistura de moléculas ionizadas cujo  $m/z$  é subsequenteferido. Os dados são registrados automaticamente e podem ser extraídos para interpretação manual ou assistida por computador (Liebler, 2002). Assim, independentemente do interesse analítico, a espectrometria de massa visa à identificação de compostos a partir da massa atômica de seus constituintes. Tal identificação pode ser derivada apenas da informação da massa molecular do analito, ou pode ser assistida pela verificação da abundância relativa de isotólogos e/ou pela avaliação da massa de íons resultantes da fragmentação da molécula de interesse (Gross, 2011).

O principal desafio da espectrometria de massa de biomoléculas reside na etapa de ionização, a qual envolve transferir moléculas altamente polares de até dezenas ou centenas de kDa à fase gasosa sem destruí-las. Tal obstáculo foi superado por meio do desenvolvimento de técnicas de ionização branda tais como a eletronebulização (*electrospray ionization* – ESI) e a ionização e dessorção por laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization* – MALDI) (Steen e Mann, 2004).

No método ESI, uma agulha metálica de espessura capilar é mantida a um potencial elétrico na ordem de kV (em relação à entrada do espectrômetro de massa) e através dela é bombeada a amostra em solução. Esse processo gera gotículas altamente carregadas que são nebulizadas. O solvente é então evaporado das gotículas, o que diminui seu tamanho e portanto aumenta sua densidade de cargas. Íons dessolvatados multiplamente protonados são

---

<sup>1</sup> A unidade *Thomson* [Th] (em homenagem a J. J. Thomson) é também utilizada, em substituição à grandeza adimensional  $m/z$ . As unidades Th e  $m/z$  são equivalentes (Gross, 2011)

gerados pela dessorção dos íons do analito da superfície das gotículas, devido a intensos campos elétricos e/ou devido à fissão repetitiva das gotículas até que cada uma contenha apenas um íon do analito. Por admitir analitos em solução, o método ESI é passível de ser diretamente acoplado a etapas de separação por ( $\mu$ - ou  $\eta$ -) HPLC (Steen e Mann, 2004).

No método MALDI, o analito é co-cristalizado com um grande excesso de uma matriz com capacidade de absorver luz ultravioleta, a qual normalmente consiste em um ácido aromático de baixo peso molecular. Uma vez que seja irradiado um feixe de laser com comprimento de onda apropriado sobre os cristais da mistura analito/matriz, as moléculas de matriz em excesso sublimam-se e transferem o analito não volátil nelas embebido à fase gasosa (*viz.* dessorção). Após numerosas colisões entre íons de matriz e moléculas da amostra, as quais ocorrem na pluma que se desenvolve após a incidência do laser, são formados íons da amostra por meio de protonação prioritariamente unitária. Uma vez formados, os íons são acelerados por meio de potenciais elétricos até o analisador de massa de escolha (Steen e Mann, 2004).

A combinação dessas fontes de íons com uma variedade de analisadores permitiu que os instrumentos atingissem níveis de desempenho nos critérios de sensibilidade, de precisão e de resolução que há pouco mais de uma década eram impensáveis para a análise de biomoléculas (James, 2001; Escoubas, 2006). Os quatro tipos básicos de analisadores empregados na análise proteômica são os quadrupolos (Q), os do tipo tempo de voo (*time of flight* - TOF), os do tipo armadilha de íons (*ion trap* - IT) e os de ressonância em ciclotron de íons e transformada de Fourier (*Fourier transform ion cyclotron resonance* - FT-ICR). Recentemente, o analisador do tipo Orbitrap, também baseado na transformação de Fourier, tornou-se o padrão em laboratórios de pesquisa biológica avançada. Ademais, aplicam-se instrumentos que combinam analisadores tais como os quadrupolos-tempo de voo (*quadrupole-time of flight* - QqTOF) e os tempo de voo-tempo de voo (*time of flight-time of flight* - TOF-TOF) (Aebersold e Mann, 2003; Suckau, Resemann *et al.*, 2003; Steen e Mann, 2004; Gross, 2011). As características, vantagens e desvantagens de diferentes configurações de instrumentos no contexto de aplicações proteômicas foram sintética e compreensivamente revisadas por Aebersold e Mann, 2003. Uma revisão detalhada sobre os princípios de diferentes instrumentações atualmente disponíveis foi realizada por Gross, 2011.

A chamada espectrometria de massa *in tandem* engloba várias técnicas nas quais íons são selecionados com base em seu  $m/z$ , fragmentados e submetidos a uma segunda análise espectrométrica. Essas técnicas objetivam a aquisição e o estudo do espectro dos íons

resultantes da fragmentação de um precursor de interesse. Tais fragmentos estão relacionados à estrutura do íon precursor, o que permite a determinação de sua estrutura a partir da interpretação de seu espectro de fragmentação. Também referida como ‘espectrometria de massa/espectrometria de massa’, a espectrometria de massa *in tandem* é, por esse motivo, designada como MS/MS ou MS<sup>2</sup> (Liebler, 2002; Gross, 2011).

Um instrumento desenhado para realizar experimentos MS/MS precisa ter incorporado ao menos dois estágios de análise espectrométrica, configurados segundo o conceito MS/MS no espaço ou MS/MS no tempo. Na primeira configuração, dois analisadores são fisicamente concatenados para a realização de duas etapas consecutivas de análise. Isso é, o MS/MS no espaço refere-se à instrumentação na qual o espectro dos íons dos fragmentos é obtido por meio de analisadores espacialmente separados. A seleção dos íons do precursor baseada em seu *m/z* é realizada em uma sessão do instrumento, a dissociação ocorre em uma sessão intermediária e finalmente os produtos da fragmentação são transmitidos ao segundo analisador, por meio do qual é aferido *m/z* dos fragmentos. Todos os dispositivos que envolvem a transmissão de feixe de íons [e.g., TOF-TOF, triplo quadrupolo (*triple quadrupole* - QqQ) e QqTOF] utilizam essa via para análise MS/MS. A segunda configuração, MS/MS no tempo, emprega um único analisador [e.g., quadrupolo armadilha de íons (*quadrupole ion trap* - QIT), armadilha de íons linear (*linear ion trap* - LIT) e FT-ICR] que pode ser operado em etapas discretas de seleção de íons, ativação, e análise de produtos de fragmentação. Essas etapas acontecem em um único analisador, mas ocorrem seqüencialmente no tempo. Em princípio, ambos os conceitos podem ser expandidos de modo a permitir sucessivas etapas de seleção de íon precursor, seguidas de detecção de produtos de fragmentação. Tais experimentos são designados como MS<sup>*n*</sup>, sendo *n* o número de estágios do experimento de espectrometria de massa *in tandem* (Gross, 2011).

A espectrometria de massa *in tandem* tornou possível a obtenção de informações estruturais de peptídeos presentes em misturas complexas sem a necessidade da purificação de seus componentes individuais a um alto grau de homogeneidade (Hunt, Yates *et al.*, 1986). Isso se deve à habilidade de selecionar apenas uma janela de massas estreita o suficiente para excluir todos os componentes de uma mistura, exceto o componente de interesse (Papayannopoulos, 1995).

Além da possibilidade de lidar diretamente com amostras não purificadas, as vantagens da espectrometria de massa *in tandem* sobre o método Edman residem em sua sensibilidade (fmol *versus* pmol, respectivamente), na possibilidade de seqüenciamento de



peptídeos N-terminalmente modificados (além da elucidação da natureza dessas modificações) e de determinação de outras modificações pós-traducionais (Papayannopoulos, 1995; Liebler, 2002; Sewald e Jakubke, 2002). Para ilustrar essas características, pode ser mencionado o histórico da investigação da composição da PhM, uma fração do veneno da aranha armadeira (*Phoneutria nigriventer*), realizada por nosso grupo.

A separação da PhM foi resultado dos primeiros estudos dedicados à descrição da composição do veneno de *P. nigriventer*. Essa fração é constituída por peptídeos capazes de provocar contrações em músculo liso de íleo de cobaia. As tentativas iniciais de seqüenciamento desses peptídeos por meio de degradação de Edman foram impedidas pelos baixos rendimentos de purificação e pela presença de bloqueio N-terminal (Rezende Junior, Cordeiro *et al.*, 1991). Posteriormente, determinou-se a estrutura primária de 15 componentes daquela fração por meio de espectrometria de massas *in tandem* do tipo ESI-Q-TOF e MALDI-TOF-TOF. Revelou-se que se tratam de peptídeos relacionados às taquicininas, e cujas massas moleculares variam entre 800 a 1.800 Da. De maneira consistente com os relatos prévios de bloqueio N-terminal, todas as moléculas seqüenciadas apresentam um resíduo de ácido piroglutâmico. Ademais, as chamadas Phonetaquicininas apresentam modificações como proteólise e/ou amidação C-terminal (Pimenta, Rates *et al.*, 2005).

Usualmente, a interpretação de resultados é a etapa lenta na determinação da estrutura primária de peptídeos a partir de espectrometria de massa *in tandem*. Ao passo que a aquisição de um espectro MS/MS dura alguns minutos (ou mesmo segundos) em um instrumento ajustado e calibrado, a análise dos dados gerados está longe de ser trivial em muitos casos. O desafio representado pela interpretação de espectros MS/MS de peptídeos é grandemente aumentado quando não se possuem quaisquer informações prévias sobre sua seqüência de aminoácidos, *i.e.*, seqüenciamento *de novo* (Papayannopoulos, 1995). A interpretação *de novo* ainda não pode ser realizada de maneira confiável por recursos de *software*, sendo ainda uma tarefa que requer o esforço ‘manual’ de especialistas (Steen e Mann, 2004; Mujezinovic, Raidl *et al.*, 2006). Em todos os casos, o sucesso do seqüenciamento *de novo* criticamente depende da qualidade dos dados adquiridos, tanto em termos de acurácia e resolução, quanto em relação à riqueza de informação (*i.e.*, íons de fragmentos) contida em um espectro MS/MS (Steen e Mann, 2004).

O seqüenciamento de peptídeos por MS/MS torna-se um problema de mais simples solução quando a interpretação de dados é convertida a uma tarefa de busca por emparelhamento em banco de dados. Isso se deve ao fato de que apenas uma fração

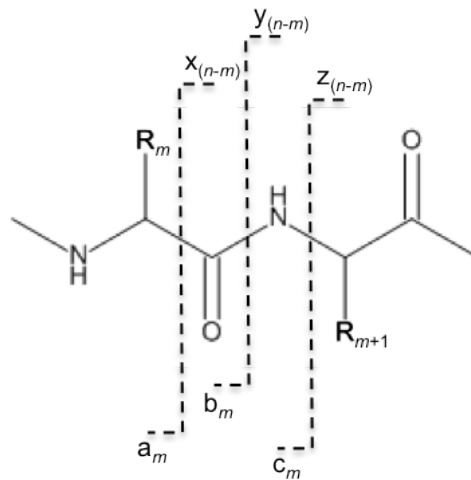
infinitesimal das seqüências peptídicas possíveis ocorre na natureza. Ademais, ainda que um espectro de fragmentação possua informações insuficientes para que a partir dele seja determinada a seqüência de aminoácidos completa, pode haver informações que permitam seu emparelhamento com uma molécula em um banco de dados (Steen e Mann, 2004).

Existem diferentes métodos para buscar emparelhamento de um espectro MS/MS com moléculas em uma base de dados, incluindo a ‘assinatura de seqüência peptídica’, ‘relação cruzada’ e o ‘emparelhamento baseado em probabilidade’. O método da ‘assinatura de seqüência peptídica’ extrai uma seqüência curta e não ambígua do padrão de fragmentação que, quando combinada com a informação da massa do precursor, é específica o suficiente para servir como sonda para a determinação da origem do peptídeo (Mann e Wilm, 1994). Por meio do método de ‘correlação cruzada’, seqüências peptídicas em uma base de dados são utilizadas para construir espectros MS/MS teóricos. A sobreposição desses espectros previstos com os espectros experimentais determina o melhor emparelhamento (Eng, McCormack *et al.*, 1994). Por meio do ‘emparelhamento baseado em probabilidade’, os fragmentos calculados das seqüências peptídicas em um banco de dados são comparados com os picos observados. A partir dessa comparação é calculada uma pontuação (*score*) que reflete a significância estatística do emparelhamento entre o espectro e as seqüências contidas no banco de dados (Perkins, Pappin *et al.*, 1999). Esses diferentes métodos estão implementadas em softwares tais como PeptideSearch, Sequest, Mascot, Sonar ms/ms e ProteinProspector (Steen e Mann, 2004).

Uma limitação dessa abordagem em relação ao seqüenciamento *de novo* reside no fato de que a primeira é passível de ser realizada principalmente para identificar peptídeos oriundos de organismos que tiveram seu genoma seqüenciado, de modo que todos os peptídeos possíveis sejam conhecidos. Em menor grau, também são acessíveis os proteomas de organismos já submetidos a estudos transcriptômicos, bem como os proteomas de organismos cujos genes possuam grande similaridade aos de organismos com informações genéticas disponíveis (Steen e Mann, 2004).

A interpretação de espectros MS/MS consiste principalmente em assinalar diferenças de massa entre íons de fragmentos abundantes resultantes clivagens ao longo da cadeia peptídica (Papayannopoulos, 1995). A nomenclatura para os íons resultantes das quebras ao longo da cadeia peptídica foi inicialmente proposta por Roepstorff e Fohlman (Roepstorff e Fohlman, 1984), modificada por Biemann (Biemann, 1988) (Figura 5) e complementada por Johnson *et al.* de modo a incluir íons resultantes de quebras adicionais nas cadeias

laterais (Johnson, Martin *et al.*, 1987; Johnson, Martin *et al.*, 1988). Em suma, a nomenclatura Roepstorff-Fohlman-Biemann é baseada no fato de que somente são detectados fragmentos que possuam carga. Se essa carga for retida por um fragmento N-terminal, o íon é denominado *a*, *b* ou *c*. De maneira análoga, se a carga for retida por um fragmento C-terminal, o íon é denominado *x*, *y* ou *z*. Um algarismo arábico subscrito indica o número de grupamentos R contidos no fragmento.



**Figura 5. Representação esquemática do sistema de nomenclatura Roepstorff-Fohlman-Biemann para os íons resultantes da quebra da cadeia de peptídeos.** A partir do N-terminal do precursor, os íons são consecutivamente denominados  $a_m$ ,  $b_m$  e  $c_m$ , onde  $m$  representa o número de grupos R contidos no fragmento. De maneira similar, a partir do C-terminal do precursor, os íons são consecutivamente denominados  $x_{n-m}$ ,  $y_{n-m}$  e  $z_{n-m}$ , onde  $n$  representa o número total de grupos R (ou de resíduos) do precursor e  $m$  representa o número de grupos R contidos no fragmento  $a$ ,  $b$  ou  $c$  correspondente (Roepstorff e Fohlman, 1984; Biemann, 1988).

A massa dos íons dos fragmentos gerados a partir de um precursor com carga positiva unitária pode ser calculada conforme as expressões abaixo, adaptadas de Papayannopoulos, 1995:

$$a_m = \sum_1^m aa_p - 27 u \quad (1)$$

$$b_m = \sum_1^m aa_p + 1 u \quad (2)$$

$$c_m = \sum_1^m aa_p + 18 u \quad (3)$$

$$x_{(n-m)} = \sum_{m+1}^n aa_p + 45 u \quad (4)$$

$$y_{(n-m)} = \sum_{m+1}^n aa_p + 19 u \quad (5)$$

$$z_{(n-m)} = \sum_{m+1}^n aa_p + 3 u \quad (6)$$

onde,

$n$  = Número total de resíduos no íon precursor;

$p$  = Posição de um dado resíduo no íon precursor.  $p$  é numerado seqüencialmente a partir do N-terminal até o C-terminal, sendo que  $1 \leq p \leq n$ ;

$aa_p$  = Massa do resíduo de aminoácido presente na posição  $p$ . Modificações nas cadeias laterais devem ser levadas em consideração.

$m$  = Posição da quebra, numerada de acordo com a posição  $p$  do resíduo localizado imediata e N-terminalmente em relação a ela.

As expressões acima devem ser alteradas, conforme necessário, para levar em consideração quaisquer modificações no amino- ou no carbóxi-terminal.

Vale notar que o espectro de fragmentação de peptídeos multiplamente protonados, em geral, encontra paralelo naquele de peptídeos com carga positiva unitária (Papayannopoulos, 1995). Claramente, um precursor multiplamente protonado pode gerar fragmentos com cargas menores ou iguais à sua (Gaskell, 1997). A presença de íons com diferentes cargas e a existência de réplicas de um mesmo fragmento em diferentes  $m/z$  resultam na necessidade da aplicação de algoritmos de deconvolução, de modo a possibilitar a interpretação do espectro de fragmentação de peptídeos multiplamente protonados (Mujezinovic, Raidl *et al.*, 2006).

Considerando que a massa do precursor com carga positiva unitária é calculada como a massa do peptídeo ( $M$ ) adicionada da massa de um próton ( $H$ ), representada como  $[M + H]^+$ , é também possível representar a expressão de cálculo da massa do íon  $y_{(n-m)}$  como:

$$y_{(n-m)} = [M + H]^+ - \sum_1^m aa_p \quad (7)$$

Assim, isolando o componente  $\sum_1^m aa_p$  na Equação 2 e substituindo-o na Equação 7, e vice-versa, obtemos:

$$y_{(n-m)} = [M + H]^+ - b_m + 1u \quad (8)$$

$$b_m = [M + H]^+ - y_{(n-m)} + 1u \quad (9)$$

De maneira similar, é também possível deduzir as seguintes fórmulas:

$$z_{(n-m)} = [M + H]^+ - c_m + 2u \quad (10)$$

$$c_m = [M + H]^+ - z_{(n-m)} + 2u \quad (11)$$

Essas simples relações são especialmente úteis na interpretação *de novo* de espectros gerados a partir de métodos de ativação que resultem principalmente em íons  $b$  e  $y$  [e.g., dissociação induzida (ou ativada) por colisão (*collision-induced dissociation* - CID; *collision-activated dissociation* - CAD) e decaimento de íons metatinstáveis; Eq. 8 e Eq. 9] ou  $c$  e  $z$  [e.g., dissociação por transferência de elétrons (*electron transfer dissociation* - ETD) e dissociação por captura de elétrons (*electron capture dissociation* - ECD); Eq. 10 e Eq. 11] (vide adiante discussão sobre métodos de ativação de íons precursores). Na prática, elas podem ser utilizada para identificar pares complementares  $b:y$  ou  $c:z$ , a partir dos quais estende-se o processo de assinalar o restante das séries de íons, mesmo que a identidade das séries não seja conhecida. Isso é, uma vez identificado um par de íons complementares, busca-se a partir de cada um deles diferenças de massa entre íons adjacentes que correspondam à massa de um resíduo de aminoácido. As diferenças encontradas são validadas a partir da sua verificação na série complementar. O processo de busca e validação de diferenças é iterado em ambas as direções do espectro de modo a ganhar a maior cobertura de seqüência possível. Feito isso, resta determinar a identidade das séries (*i.e.*, a orientação correta da seqüência), o que pode ser feito por meio da verificação da massa dos íons terminais e/ou de pares de íons  $a_m:b_m$  ou  $y_{(n-m)}:z_{(n-m)}$ , por exemplo.

Além dos íons de fragmentos produzidos por apenas uma quebra na cadeia carbônica do peptídeo, observa-se freqüentemente os chamados ‘fragmentos internos’, os quais não contém os extremos amino-terminal e tampouco o carbóxi-terminal do íon precursor. Considerando que os fragmentos internos podem ser gerados por uma quebra do tipo  $y$  em sua extremidade N-terminal e por uma quebra do tipo  $b$  em seu C-terminal, a notação utilizada para designar tais fragmentos é  $y_m b_m$ , de modo a manter consistência com a nomenclatura Roepstorff-Fohlman-Biemann. Por exemplo, no pentapeptídeo hipotético Ala-Val-Lys-Ile-Gln, o fragmento interno consistido pelos resíduos Lys-Ile, oriundo de quebra na ligação peptídica em ambas as suas extremidades, seria designado  $y_3 b_4$ . Os fragmentos internos podem ser úteis para determinar a ordem de resíduos em uma seqüência nos casos em que certos íons de fragmentos estejam ausentes em um espectro. Ademais, podem auxiliar na confirmação da seqüência deduzida a partir de outros fragmentos (Papayannopoulos, 1995). No entanto, uma grande abundância de fragmentos internos pode dificultar ou mesmo inviabilizar a interpretação *de novo* (Rates, Ferraz *et al.*, 2008).

É necessário também mencionar que íons ‘satélite’, originados a partir da perda adicional de  $\text{NH}_3$  ou  $\text{H}_2\text{O}$ , também podem ser produzidos. Esses íons são designados, por

exemplo,  $a_m - \text{NH}_3$  ou  $y_{(n-m)} - \text{H}_2\text{O}$ . Ademais, a fragmentação amino-terminal e carbóxi-terminal do mesmo aminoácido produz os íons ‘imônios’ ( $\text{HN}=\text{CH-R}$ ), cuja massa é 27 u menor que a massa de seus respectivos resíduos protonados. Localizados na região de baixa massa de um espectro, os imônios são indicadores da presença de um aminoácido no precursor, especialmente se outros íons de baixa massa correlatos também são encontrados. Dentre esses íons diagnósticos são de especial relevância aqueles da His (110), Phe (120, 91), Tyr (136, 91) e Trp (159, 130). Vale notar que caso não seja possível visualizar o imônio de um resíduo em particular, isso não necessariamente significa que o mesmo esteja ausente (Papayannopoulos, 1995; Steen e Mann, 2004).

Como mencionado anteriormente, a interpretação de espectros MS/MS consiste principalmente em assinalar diferenças de massa entre íons adjacentes de uma mesma série que correspondam à massa de aminoácidos. Assim, há uma limitação para a diferenciação de resíduos *quasi* isobáricos (Lys e Gln: 128,09496 u e 128,05858 u, respectivamente) e isobáricos (Ile e Leu: ambos 113,08406 u) (Papayannopoulos, 1995). No caso dos resíduos Lys e Gln, a diferença de massa (0,03638 u) pode ser resolvida em equipamentos com alta resolução e acurácia (Rates, Silva *et al.*, 2011). Alternativamente, por possuírem cadeia laterais com naturezas químicas distintas, esses resíduos podem ser diferenciados por meio de derivatização (*e.g.*, acetilação) ou pela especificidade de proteases como a tripsina (Papayannopoulos, 1995). No entanto, os resíduos Ile e Leu não podem ser diferenciados com base na análise das séries iônicas resultantes das clivagens ao longo da cadeia peptídica e tampouco pela natureza química de sua cadeia lateral. Como solução, pode ser empregado CID de alta energia (discutido adiante), que pode ocasionar a fragmentação adicional nas ligações entre carbonos  $\beta$  e  $\gamma$ . Esse processo resulta na perda de parte da cadeia lateral dos aminoácidos dos íons dos fragmentos resultantes das clivagens ao longo da cadeia peptídica, gerando os íons  $d_m$  (se N-terminais) ou  $w_m$  (se C-terminais). Dado que a Leu não possui ramificação no carbono  $\beta$ , a fragmentação da cadeia lateral desse resíduo gera apenas um íon  $d$  e  $w$ , cuja massa é 42 u menor que a massa dos íons  $a$  ou  $z$  correspondentes. Diferentemente, a Ile possui uma ramificação em seu carbono  $\beta$ , de modo que é passível de gerar dois íons  $d$  e  $w$ , cujas massas são 14 u e 28 u menores que a massa dos íons  $a$  ou  $z$  correspondentes (Johnson, Martin *et al.*, 1987). O CID de alta energia gera outro tipo de fragmento C-terminal resultante da perda completa da cadeia lateral, o qual é designado pela letra  $v$ . Esses íons não possuem uma contraparte N-terminal e são abundantes para aminoácidos que não produzem fragmentos da série  $w$  (Johnson, Martin *et al.*, 1988).

A etapa de ativação é crucial para experimentos MS/MS e define os produtos resultantes (Sleno e Volmer, 2004). Existem diferentes métodos de fragmentação que são empregados conforme a configuração do instrumento utilizado (Standing, 2003; Sleno e Volmer, 2004). Os parágrafos seguintes discutem brevemente os princípios desses três métodos, bem como as características dos espectros resultantes de sua aplicação em íons de moléculas peptídicas.

O CID figura como o método mais comumente utilizado para a ativação de íons. No método CID, a ativação ocorre por meio de colisões com moléculas de gás neutro (*e.g.*, N<sub>2</sub>, He, Ar ou Xe) em uma câmara (ou célula) de colisão. Quando um íon com energia translacional colide-se de maneira inelástica com uma molécula de gás neutro, parte da energia translacional é convertida em energia interna, o que subsequente resulta em decomposição.

Os experimentos de CID podem ser realizados sob condições de baixa ou alta energia de colisão (Sleno e Volmer, 2004). O CID de baixa energia (1 – 100 eV) é empregado em analisadores do tipo QqQ, QqTOF, IT e FT-ICR, por exemplo. Em instrumentos QqQ e QqTOF, o segundo quadrupolo (q2) consiste na câmara de colisão, sendo que a ativação é obtida principalmente por múltiplas colisões. Em adição à natureza do gás de colisão, a pressão da célula é um parâmetro relevante. Maiores pressões aumentam tanto o número de íons que sofrem colisões quanto o número de colisões sofridas por íons individuais. Ademais, os produtos de fragmentação podem ser ativados por novas colisões e realizar dissociações subsequentes (Sleno e Volmer, 2004).

O CID de alta energia é empregado em analisadores do tipo setor magnético (*magnetic sector* - B) ou do tipo TOF. Nesses instrumentos, o feixe de íons precursores possui energia cinética de alguns keV. Assim, a ativação do precursor é ocasionada por colisões únicas antes da análise da massa de seus produtos. Os produtos de decaimento pós-fonte (*post-source decay* – PSD) (discutido adiante) em instrumentos TOF podem ser aumentados pela realização de experimentos em condições de baixo vácuo, o que ocasiona colisões com gás residual no tubo de vôo ou por meio do emprego de uma câmara de colisão antes do analisador TOF (Sleno e Volmer, 2004).

Os fatores mencionados acima influenciam a distribuição de energia interna nos íons e, portanto, determinam o perfil dos produtos obtidos pelo método CID (Sleno e Volmer, 2004). Ainda que o processo de fragmentação parcialmente dependa da seqüência peptídica



do precursor, as condições do CID favorecem principalmente a fragmentação ao longo da cadeia peptídica, sendo que os fragmentos mais comumente observados são os das séries *a*, *b* e *y*. Vale notar que os íons *a* ocorrem em menor frequência e abundância que os íons *b*. Ainda, o íon *b*<sub>1</sub> é raramente observado, o que pode dificultar a determinação da ordem dos dois primeiros resíduos em uma seqüência (Papayannopoulos, 1995; Steen e Mann, 2004). Em contraste ao CID de alta energia, o CID de baixa energia não produz fragmentos resultantes de quebras nas cadeias laterais. No entanto, o CID de baixa energia resulta em abundantes fragmentos gerados a partir da perda de água ou amônia. Também abundam os fragmentos internos, resultado das múltiplas colisões que aumentam a probabilidade de clivagem em duas ligações peptídicas (Papayannopoulos, 1995).

Íons moleculares formados na fonte, possuindo energia interna suficiente para promover sua fragmentação espontânea no trajeto entre a fonte e o analisador, são classificados como íons metainstáveis. Em um instrumento TOF, se um íon fragmenta-se na fonte (*i.e.*, antes da aceleração ao tubo de vôo), precursor e produtos de fragmentação adquirem a mesma energia cinética sendo, portanto, passíveis de diferenciação pela sua velocidade e tempo de vôo, os quais estão relacionados a seu *m/z*. Quando um precursor adentra o tubo de vôo de um analisador TOF linear e lá ocorre dissociação de íons metainstáveis (*viz.* PSD), os produtos da fragmentação atingem o detector ao mesmo tempo que íon precursor por possuírem a mesma velocidade. Assim, os íons que se decompõem ao longo do tubo de vôo são detectados com o mesmo *m/z* do precursor. No entanto, esses produtos podem ser diferenciados pela aplicação de um analisador do tipo TOF refletor (*reflecton-TOF* - RETOF) ou por meio da re-aceleração dos produtos a um segundo analisador TOF (Suckau, Resemann *et al.*, 2003; Sleno e Volmer, 2004). Assim, o método PSD é extensivamente utilizado em instrumentos equipados com fonte MALDI e analisador RETOF ou TOF-TOF, podendo ser conjugado com o método CID (Standing, 2003; Suckau, Resemann *et al.*, 2003; Sleno e Volmer, 2004), como mencionado anteriormente. O método de dissociação de íons metainstáveis, em termos de padrões de fragmentação de peptídeos, é comparável ao CID. As principais diferenças incluem a ausência de clivagens de cadeias laterais e a maior ocorrência de produtos com perda de amônia (Sleno e Volmer, 2004).

O método ECD envolve a captura de elétrons por íons multiplamente carregados, o que ocasiona a redução de sua carga e sua subsequente fragmentação. O espectro MS/MS obtido a partir do ECD de peptídeos é bastante similar àquele de outros métodos de ativação. No entanto, os eventos nesse método ocorrem em um escala de tempo menor, o que permite

apenas a quebra direta de ligações. Como resultado, a ligação N-C $\alpha$  é rompida originando íons *c* e *z*. Ademais, pontes dissulfeto, estáveis em outros métodos de ativação, são preferencialmente clivadas no ECD (Sleno e Volmer, 2004). Esse método é empregado em nas condições de vácuo ultra-alto de instrumentos do tipo FT-ICR (Standing, 2003; Sleno e Volmer, 2004; Gross, 2011).

Aparelhos do tipo LIT podem ser operados de modo a armazenarem íons com cargas opostas. Esses analisadores podem, então, utilizar reações cátion-ânion para promover a dissociação de íons. Essa técnica denominada dissociação por transferência de elétrons (*electron-transfer dissociation* – ETD) é conduzida segundo as seguintes etapas: (i) injeção de íons multiplamente protonados no LIT, tal qual produzidos na fonte; (ii) modulação nas condições do LIT de modo a armazenar os íons protonados na sessão frontal do analisador; (iii) injeção de ânions reagentes no centro do LIT; (iv) ejeção de todos os íons exceto o íon precursor e o reagente doador de elétrons; (v) modulação nas condições do LIT de modo a promover a mistura e reação dos íons positivos e negativos no centro do analisador; e (vi) ejeção dos íons resultantes da fragmentação. De maneira similar ao método ECD, o ETD resulta principalmente em íons *c* e *z*. No entanto, a aplicação do ETD é limitada para peptídeos com protonação unitária ou dupla (Gross, 2011).

A coleção de técnicas acima descritas é principalmente empregada na identificação e caracterização de peptídeos nativos ou gerados por proteólise de até alguns poucos (2 – 4) kDa. A velocidade de aquisição de dados, especificidade e sensibilidade da espectrometria de massa a torna especialmente atraentes para esse fim. Vale notar que desenvolvimentos recentes têm permitido que a espectrometria de massa seja também utilizada para identificar, ou até mesmo determinar a estrutura primária completa de proteínas intactas (Reid e Mcluckey, 2002). Vale destacar que a espectrometria de massa, utilizada em conjunto com outras técnicas acessórias, encontra diversas outras aplicações em estudos proteômicos (Liebler, 2002; Aebersold e Mann, 2003), algumas das quais serão discutidas adiante no contexto do estudo de toxinas peptídicas de origem animal.

### 1.3 Venenos de origem animal

Venenos animais são reconhecidamente um grande repositório de moléculas bioativas. Essas moléculas incluem *inter alia* alcalóides, poliaminas, aminas biogênicas, proteínas e peptídeos (Bailey e Wilce, 2001; Pimenta e De Lima, 2005). O desenvolvimento de um sistema venenoso como estratégia utilizada na defesa contra predadores, disputa contra competidores e/ou na caça (*i.e.*, captura e digestão de presas) é um motivo recorrente em diversos grupos animais. Essa é uma inovação chave que permite a radiação adaptativa de grupos animais e seu sucesso ecológico (Fry, Vidal *et al.*, 2006; Fry, Scheib *et al.*, 2008; Fry, Roelants *et al.*, 2009). Além da potência do coquetel de toxinas produzidas, a eficácia desses sistemas em muitos casos está relacionada ao desenvolvimento de estruturas especializadas para a aplicação do veneno. Como indicadores da distribuição dos sistemas venenosos em diferentes grupos animais e de seus modos de evolução, os parágrafos a seguir descrevem brevemente alguns exemplos dessas estruturas.

Os representantes do filo Cnidaria possuem células especializadas denominadas cnidócitos, os quais apresentam organelas capazes de reversão, *viz.* cnidos. Essas células localizam-se na epiderme, sendo especialmente abundantes nos tentáculos. Desencadeada por estímulos mecânicos, químicos ou neurogênicos, a reversão dos cnidos envolve alteração repentina na pressão osmótica no interior da organela. Os nematocistos, um tipo de cnido urticante, quando descarregados consistem em uma cápsula e em um tubo em forma de cordão. O cordão é freqüentemente provido com uma abertura terminal e espinhos. Na descarga, auxiliado por estiletos no processo de punção, o cordão penetra no tecido do organismo infligido e promove a injeção de toxinas (Ruppert e Barnes, 1994).

Os moluscos da família Conidae (Mollusca, Gastropoda), os conos, possuem rádulas modificadas em arpões. Essas estruturas são longas, sulcadas e possuem extremidade farpada. A partir da projeção de sua probóscide longa e altamente manobrável, um único dente desliza para fora do saco radular na cavidade bucal, sendo posteriormente empurrado contra a presa. Através da cavidade oca do arpão, os conos injetam um veneno peptídico neurotóxico, que é produzido por uma glândula bulbar (Ruppert e Barnes, 1994; Olivera, Bulaj *et al.*, 2009).

Nos Chilopoda (Arthropoda, Mandibulata, Myriapoda), as patas do primeiro segmento torácico são modificadas para formar o característico aparato venenoso,

denominado forcípula ou toxognato (Lewis, 1981). A glândula de veneno é situada na parte distal do trocânter-prefemur e se estende pela forcípula, estrutura na qual o duto se abre sub-terminalmente. Secções transversais da glândula de veneno mostram um duto cercado em três quartos de sua circunferência por células glandulares. Essas, por sua vez, são cercadas por uma rede de fibras musculares, algumas das quais se estendem entre as células glandulares e se aderem ao duto central. Tais fibras, ao contraírem-se provocam a expulsão do veneno. A secreção é do tipo holócrina, de modo que, após liberar o seu conteúdo, a célula morre e é substituída por outra que está em processo de maturação (Duboscq, 1898; Lewis, 1981).

Escorpiões (Scorpiones), pseudo-escorpiões (Pseudoscorpiones) e aranhas (Araneae) são representantes venenosos do sub-filo Chelicerata. De maneira similar aos quilópodes, os quelicerados venenosos possuem fibras musculares que cercam a glândula de veneno. O veneno é expelido mediante contração dessas fibras. Entretanto, a localização do aparato venenoso difere entre as ordens. Nos escorpiões, o aparelho do ferrão encontra-se no último segmento abdominal. O aparelho consiste em uma base bulbosa que encerra a glândula de veneno e em agulhão afiado e curvo. Já as glândulas de veneno das aranhas estão localizadas nos segmentos basais das quelíceras e se abrem próximo à extremidade das presas. Os pseudo-escorpiões possuem palpos com garras que se assemelham àqueles dos escorpiões. No entanto, esses palpos são peculiares por apresentarem glândulas de veneno em um ou ambos os dedos, ou na mão. A glândula desemboca em um dente na ponta do dedo (Ruppert e Barnes, 1994).

Recentemente, descreveu-se o incomum aparato de veneno do besouro cerambicídeo *Onychocerus albitarsis* (Arthropoda, Insecta, Coleoptera). Tal aparato assemelha-se àquele dos escorpiões, consistindo em um agulhão provido de abertura sub-terminal que se estende a partir de um segmento em forma de bulbo que alberga a glândula de veneno. No entanto, o aparato localiza-se no segmento terminal nas antenas do inseto (Berkov, Rodriguez *et al.*, 2008).

Nos Hymenoptera aculeados (Arthropoda, Insecta), o aparato de injeção de veneno é uma modificação do órgão ovipositor, sendo que as glândulas de veneno possivelmente possuíam a função ancestral de secretar muco para cobertura e proteção dos ovos (Gillott, 2005). O aparato inclui duas lancetas que se movem independentemente, as quais se inserem com profundidade progressiva no local da punção na pele da vítima, permitindo a entrega do veneno através de uma abertura única no ferrão. Em muitos himenópteros sociais, as lancetas

são providas de farpas desenvolvidas que ancoram o ferrão no local da picada, impedindo sua remoção e ocasionando sua autotomia. Nesses casos, a picada, letal para o himenóptero, promove o abandono aparato inteiro, ainda bombeando veneno. Esse recurso é utilizado principalmente na defesa da colônia (Hermann, 1971).

Muitas serpentes avançadas (Squamata, Caenophidia) utilizam veneno, com ou sem constrição, para subjugar presas. Seu aparato venenoso inclui uma glândula de veneno pós-orbital associada a dentes inoculadores especializados. Os dentes inoculadores podem ocupar várias posições na maxila; Viperídeos e elapídeos possuem dentes inoculadores frontais tubulares. Nas demais linhagens, quando presentes, os dentes inoculadores localizam-se em posição anterior na maxila, sendo sólidos ou providos de sulcos superficiais ou profundos (Vonk, Admiraal *et al.*, 2008). Em contraste, nos lagartos helodermatídeos (Squamata, Helodermatidae) o veneno é produzido por uma glândula mandibular, a partir da qual o veneno é levado a dentes sulcados dispostos ao longo da mandíbula (Fry, Vidal *et al.*, 2006).

Postulou-se que nos Squamata a presença de uma glândula de veneno secretora de material protéico seja uma característica derivada compartilhada por todo o clado que compreende a linhagem das serpentes, dos lagartos iguanídeos e dos lagartos anguimorfos. A condição basal seria uma glândula serial, lobular e não-composta, secretora de material protéico, presente tanto na região mandibular quanto na maxilar, tal como retido nos lagartos iguanídeos. A retenção da função secretora nas glândulas maxilares (serpentes avançadas) ou mandibulares (anguimorfos) representa uma condição altamente derivada. Nas suas respectivas regiões, as serpentes (região maxilar) e os anguimorfos (região mandibular) independentemente evoluíram glândulas de veneno compostas, encasuladas e com lúmen para armazenamento do veneno líquido pronto para aplicação (Fry, Vidal *et al.*, 2006).

Espécies de peixes venenosos são encontradas nos grupos Chondrichthyes, Actinopterygii, Siluriformes e Acanthomorpha (Smith e Wheeler, 2006; Figueiredo, Andrick *et al.*, 2009). Estima-se que o número de espécies venenosas distribuídas somente nos Siluriformes e Acanthomorpha seja superior a 1.200. Nos Acanthomorpha, postulou-se que o aparato venenoso surgiu independentemente em 11 clados distintos, sendo que a estrutura consistida de glândulas de veneno associado a espinhos de nadadeiras (anais, dorsais e/ou pélvicas) evoluiu convergentemente em 9 desses 11 clados. As demais estruturas (*i.e.*, dente inoculador, espinho opercular dorsal, espinho opercular central e espinho cleital) são não-revertidas e unicamente derivadas (Smith e Wheeler, 2006).

O monotrema australiano, *Ornithorhynchus anatinus*, para além de uma plethora de características incomuns, é um dos raros mamíferos venenosos. Seu sistema venenoso, conhecido como sistema crural, consiste de um par de glândulas de veneno localizadas na porção dorsolateral do abdômen, as quais são conectadas por meio de um duto a um esporão em cada pata traseira. Esse sistema é desenvolvido apenas nos machos, sendo que a produção de veneno atinge seu pico durante a estação reprodutiva. Embora possa ser utilizado como defesa contra predadores em potencial, esse fato sugere que o sistema crural possa ter evoluído para uma função reprodutiva, *i.e.*, ferramenta para a dominância sobre outros machos durante disputas por acasalamento (Whittington, Koh *et al.*, 2009).

Os exemplos acima referem-se a estruturas especializadas na administração do veneno por meio de sua injeção diretamente no corpo da vítima. No entanto, é preciso complementar o universo de estratégias de defesa química contra predadores com aquelas que envolvem cerdas urticantes (*e.g.*, aranhas terafosídeas e larvas de lepidópteros) (Ruppert e Barnes, 1994; Gillott, 2005) e secreções dérmicas (*e.g.*, secreção da pele de anuros) (Clarke, 1997). Vale notar que a pele dos anfíbios, além de participar na defesa contra predadores, desempenha as funções de, por exemplo, troca gasosa, regulação hídrica, defesa contra parasitas e controle de excreção (Clarke, 1997).

Embora muitas das estruturas descritas acima tenham evoluído independentemente e haja grande variação estrutural entre elas, vários exemplos de evolução convergente são observados. A evolução do repertório de toxinas pode ser entendida de maneira similar.

As proteínas encontradas em venenos são o resultado de eventos de ‘recrutamento de toxinas’ nos quais um gene que codifica uma proteína ordinária, tipicamente uma que esteja envolvida em um processo regulatório chave, é duplicado e o novo gene é seletivamente expresso na glândula de veneno. Em muitos casos, esses genes de toxinas são amplificados para obter famílias multigênicas com extensivo ganho de novas funções, seguido de deleção de cópias ou da degradação de outras, o que forma cópias não funcionais ou pseudogenes. A recém-criada família multigênica de toxinas geralmente preserva o arcabouço molecular da proteína ancestral, mas os principais resíduos funcionais fora no núcleo do arcabouço são modificados (*i.e.*, geração de isoformas), de modo que uma miríade de novas atividades são daí derivadas (Fry, Roelants *et al.*, 2009) (vide o exemplo das toxinas de três dedos, mencionado anteriormente). É interessante notar como eventos de recrutamento estão associados à subsequente radiação adaptativa e diversificação ecológica de linhagens de organismos venenosos (Fry, Vidal *et al.*, 2006).

Vários grupos de proteínas foram convergentemente recrutados para uso como toxinas em múltiplas linhagens. Dentre elas destacam-se os arcabouços AVIT/colipase/procineticina, CAP [*Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP)*, *Antigen 5 (Ag5) and Pathogenesis-Related (PR1) Proteins*], quitinase, cistatina, defensinas, hialuronidase, Kunitz, lectina, lipocalina, peptídeo natriurético, peptidase S1, fosfolipase A2, esfingomielinase D e SPRY. Esses arcabouços compartilham características como condição secretória ancestral, atividade basal conservada e reticulação extensiva. Além dos tipos de proteínas recrutadas, há convergência de atividades biológicas e alvos moleculares. Nesse sentido, pode ser citada a convergência de toxinas com atividade neurotóxica que atuam como bloqueadores, ativadores ou prolongadores da ativação de canais iônicos, ou agonistas de receptores muscarínicos ou nicotínicos (Fry, Roelants *et al.*, 2009).

Observações como essas foram possibilitadas pelo conhecimento acumulado sobre a estrutura função e distribuição das toxinas animais. No entanto, os primeiros trabalhos científicos dedicados aos venenos animais eram motivados pelo desejo de entender a natureza de suas toxicidades e de desenvolver maneiras de inibir seus efeitos nocivos. Tais trabalhos levaram ao isolamento de várias toxinas de natureza peptídica ou protéica, possibilitando assim a caracterização bioquímica e farmacológica de tais componentes (Pimenta e De Lima, 2005; Escoubas, 2006). Como resultado, nas últimas duas décadas ficou evidente o potencial dos componentes dos venenos animais como guias para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, pesticidas ou sondas para alvos moleculares (Bailey e Wilce, 2001; Pimenta e De Lima, 2005; Escoubas, 2006; De Lima, Figueiredo *et al.*, 2007; Bosmans, Escoubas *et al.*, 2009; Da Veiga, Berger *et al.*, 2009; Nunes, Cardoso *et al.*, 2009; Souza e Palma, 2009). No APÊNDICE A do presente estudo encontra-se uma revisão desenvolvida por este autor e colaboradores (Rates, Verano-Braga, *et al.*, 2011), na qual são discutidos exemplos de moléculas oriundas dos venenos de espécies de aracnídeos brasileiros de importância médica que possuem possível aplicação terapêutica.

O potencial biotecnológico das toxinas animais é parcialmente derivado do fato de que diferentes isoformas, variantes naturais acumuladas pela natureza ao longo da escala de tempo evolutiva, foram finamente desenhadas para interagirem com seus alvos e deferirem suas ações tóxicas. Assim, as isoformas podem apresentar modulações sutis em sua especificidade, estabilidade e atividade biológica que podem ser utilizadas para entender tanto seu funcionamento molecular quanto o de seu alvos. Ademais, no contexto do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, essas modulações podem ser utilizadas na

seleção de caracteres vantajosos e, assim, assistir no processo de desenvolvimento de análogos sintéticos (Escoubas, 2006).

Vale ponderar que há limites para a aplicação terapêutica de moléculas peptídicas. Por exemplo, muitos peptídeos quando administrados oralmente, ou mesmo por via parenteral, não são eficazes devido à degradação proteolítica. Esse fato demanda que sejam empregadas modificações químicas para aumentar sua estabilidade e prolongar seu tempo de ação. Uma vez que os aminoácidos essenciais à atividade de um peptídeo sejam revelados, a síntese de análogos contendo aminoácidos não usuais, moléculas de ligação ou espaçadores, ciclização, ligações peptídicas alteradas ou mesmo a síntese de análogos não peptídicos (*viz.* peptidomiméticos) encontram-se dentre as estratégias possíveis (Sewald e Jakubke, 2002).

Considerando-se a diversidade de peptídeos e proteínas presentes em venenos, juntamente com o número de espécies venenosas conhecidas, conclui-se que apenas uma inconspícua fração (menos de 1%) das moléculas desse repositório foi identificada e caracterizada (Menez, Stocklin *et al.*, 2006). Ademais, até recentemente, foi priorizada a investigação das moléculas mais abundantes e/ou com toxicidade evidente. Dessa maneira, certas classes de moléculas, tais como os peptídeos não reticulados e com massa molecular inferior a 3 kDa, que geralmente estão representados em baixas concentrações ou que apresentam efeitos não-letais, foram negligenciados mesmo nos grupos de animais venenosos já submetidos a intensa investigação (Pimenta e De Lima, 2005).

A toxínologia, por estudar complexos sistemas moleculares (*i.e.*, venenos) beneficiou-se das técnicas proteômicas, para a caracterização e identificação de moléculas. Desenvolvimentos nas técnicas de espectrometria de massa, assim como os avanços no seqüenciamento automático (Edman), purificação/fracionamento (HPLC multidimensional,  $\mu$ LC, 2D-PAGE), determinação de estrutura tridimensional de proteínas (NMR, cristalografia de alta resolução) e bioinformática foram críticos para possibilitar a análise proteômica de venenos (Escoubas, 2006). Várias estratégias ‘venômicas’, muitas vezes complementares, vêm sendo empregadas na investigação de diversos aspectos da toxínologia, as quais se encontram exemplificadas nos parágrafos das sessões seguintes.



### 1.3.1 Investigação proteômica de venenos animais

A procura por novas moléculas bioativas visando, por exemplo, o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, é comumente impelida pela identificação de uma molécula candidata por meio de ensaio biológico. À identificação sucedem-se a purificação e a caracterização do componente ativo. Entretanto, tal abordagem é apropriada quando grandes quantidades iniciais de material são disponíveis para realizar ensaios biológicos durante todas as etapas de purificação do composto de interesse (Favreau, Menin *et al.*, 2006).

Entretanto, se for possível adquirir dados estruturais e/ou físico-químicos (*i.e.*, seqüência primária, massa molecular, hidrofobicidade, etc.) de componentes de um veneno, explorando o potencial da bioinformática, é possível inferir o alvo molecular de tais compostos. Feito isso, a suposta atividade biológica de um composto de interesse pode ser validada através da síntese química ou expressão heteróloga, seguida do ensaio biológico (Pimenta e De Lima, 2005; Favreau, Menin *et al.*, 2006).

A possibilidade de selecionar e fragmentar compostos no espectrômetro de massa, diretamente de venenos brutos ou de frações semi-purificadas evita a necessidade de purificação extensiva. Tal abordagem, discutida nas sessões anteriores, pode ser aplicada a espécies raras ou cujo veneno é de difícil obtenção. O seqüenciamento *de novo* de pequenos peptídeos através de espectrometria de massa vem abrindo novas vistas para a toxilogia, uma vez que moléculas até recentemente negligenciadas puderam ser caracterizadas (Pimenta e De Lima, 2005; Rates, Ferraz *et al.*, 2008; Verano-Braga, Rocha-Resende *et al.*, 2008).

Adicionalmente, para caracterizar peptídeos de uma mesma família, é possível utilizar o recurso dos espectrômetros de massa de seletivamente detectarem uma característica específica de um peptídeo. Quando acoplados a cromatografia líquida *on line*, métodos de varredura de íon precursor (*precursor ion scanning*) são úteis na detecção de padrões específicos (James, 2001). De maneira similar, a varredura de perda neutra (*neutral loss scan*) permite, por exemplo, a detecção de ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilado que comumente ocorre em toxinas de *Conus* (Jakubowski, Keays *et al.*, 2004).

A listagem de massas moleculares dos compostos presentes nos venenos pode ser utilizada para identificar grupos de toxinas baseado na amplitude de massas e tempos de retenção cromatográfica (Pimenta, Stocklin *et al.*, 2001b; Favreau, Menin *et al.*, 2006;

Nascimento, Rates *et al.*, 2006; Rates, Bemquerer *et al.*, 2007). Esse recurso é bastante utilizado como ferramenta de controle de preparações comerciais de venenos brutos (Favreau, Menin *et al.*, 2006) e em aplicações taxonômicas (Escoubas, Celerier e Nakajima, 1997; Escoubas, Chamot-Rooke *et al.*, 1999; Stocklin, Mebs *et al.*, 2000; Fry, Wickramaratna *et al.*, 2002; Fry, Wuster *et al.*, 2003; Nascimento, Rates *et al.*, 2006).

Ainda, variações individuais intra-específicas no perfil protéico de venenos, atribuídas a dieta (Creer, Malhotra *et al.*, 2003), sexo (Escoubas, Corzo *et al.*, 2002; Menezes, Furtado *et al.*, 2006), idade (Escoubas, Corzo *et al.*, 2002; Guercio, Shevchenko *et al.*, 2006) e número de extrações de veneno (Boeve, Kuhn-Nentwig *et al.*, 1995; Pimenta, De Marco Almeida *et al.*, 2003) já foram avaliadas por meio de técnicas proteômicas. As diferenças observadas podem refletir modulações observadas na sintomatologia de picada e/ou toxicidade do veneno (Boeve, Kuhn-Nentwig *et al.*, 1995; Guercio, Shevchenko *et al.*, 2006) e, portanto, auxiliar o desenvolvimento de antídotos e mais eficientes (Ciscotto, Rates *et al.*; Guercio, Shevchenko *et al.*, 2006).

Recentemente foi desenvolvida a análise direta de tecidos frescos através de MALDI-MS (Caprioli, Farmer *et al.*, 1997; Redeker, Toullec *et al.*, 1998; Fournier, Day *et al.*, 2003; Rubakhin, Greenough *et al.*, 2003; Chaurand, Schwartz *et al.*, 2004). Essa técnica, batizada como MALDI-*imaging*, tem sido utilizada para medir o arranjo espacial e a concentração relativa de compostos em amostras biológicas. No contexto de estudos toxinológicos, essa técnica foi empregada, por exemplo, na determinação da localização espacial de peptídeos relacionados à bradicinina e dermaseptinas na pele de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Brand, Krause *et al.*, 2006; Brand, Leite *et al.*, 2006) e de raniceptinas na pele de *Hypsiboas raniceps* (Magalhaes, Melo *et al.*, 2008).

## 2 Objetivos e justificativa

Os objetivos do presente estudo consistem na caracterização peptidômica do veneno de *Tityus serrulatus* e da secreção dérmica de *Phasmahyla jandaia*. Ademais, objetivou-se a determinação da estrutura primária completa e da atividade biológica da toxina  $\mu$ -TRTX-An1a oriunda do veneno de *Acanthoscurria natalensis*.

Os APÊNDICES B e C e a sessão seguinte trazem uma introdução sobre a biologia dos animais investigados, uma revisão do estado da arte do conhecimento sobre a composição e atividade de seus respectivos venenos, a descrição das análises realizadas, a apresentação dos resultados obtidos e conclusões.

Dentre as moléculas de diferentes naturezas químicas presentes nos sistemas investigados, os peptídeos, em especial os não-reticulados, foram o principal objeto deste estudo. Os fatores motivadores dessa escolha foram discutidos nas sessões anteriores e incluem: (a) característica modular (*i.e.*, resíduos de aminoácidos concatenados por meio de ligações peptídicas); (b) diversidade oriunda das combinações de ‘módulos’ e de modificações pós-traducionais; (c) possibilidade de determinação da estrutura primária, incluindo modificações pós-traducionais, por meio de espectrometria de massa; (d) possibilidade de síntese química em fase sólida para posterior ensaio biológico; (e) grande número de representantes nos organismos estudados.

Ainda que todos sejam representantes da biodiversidade brasileira, a seleção dos organismos estudados pode, à primeira vista, parecer incomum ou desarmônica: um escorpião de ocorrência em ambientes antrópicos, cujos acidentes são problema de saúde pública (*T. serrulatus*), uma aranha caranguejeira de ocorrência nos biomas caatinga e cerrado (*A. natalensis*) e uma perereca endêmica da porção sul da Serra do Espinhaço (*P. jandaia*). É fato que esse conjunto foi constituído de maneira fortuita; o estudo desenvolvido com o veneno de *T. serrulatus* insere-se no âmbito de linhas de pesquisa já consolidadas no LVTA, enquanto os estudos desenvolvidos com o veneno de *A. natalensis* e com a secreção dérmica de *P. jandaia* foram iniciados a partir de colaborações com a Dra. Ilka Biondi, da Universidade Estadual de Feira de Santana, e com o Sr. Felipe Leite, da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, respectivamente. No entanto, há fatores que resultam na coesão entre os três estudos.

Como será fundamentado adiante, estudos dedicados à descrição da composição do veneno de representantes do gênero *Acanthoscurria* e *Phasmahyla* ainda não haviam sido realizados. Ademais, o gênero *Phasmahyla* era o único dentre o cinco gêneros de Phyllomedusinae, uma sub-família de anuros hilídeos cuja secreção dérmica tem sido extensivamente investigada, que permanecia sem estudos similares. Já *T. serrulatus* figura dentre os organismos venenosos mais intensamente estudados. No entanto, estudos anteriores apontavam a diversidade de peptídeos com massa molecular inferior a 3 kDa no veneno desse organismo, sem que houvesse outras iniciativas de sistematicamente identificar essas moléculas. Para preencher essas lacunas de conhecimento, a composição peptídica dos venenos de *T. serrulatus* e da secreção dérmica de *P. jandaia* foi investigada por um fluxo de trabalho similar que resumidamente consistia em fracionamento por meio de cromatografia líquida, espectrometria de massa (MS e MS/MS), seqüenciamento *de novo*, seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman automatizada e busca de similaridades. No caso de *A. natalensis*, foi empregado seqüenciamento N-terminal (Edman) e *de novo* (MS/MS) para a determinação da estrutura primária completa da toxina  $\mu$ -TRTX-An1a. Ademais, o estudo envolveu a investigação da atividade da  $\mu$ -TRTX-An1a sobre neurônio de inseto utilizando-se técnicas eletrofisiológicas.

De maneira comum, os estudos visaram à prospecção de moléculas biologicamente ativas com usos biotecnológicos potenciais e à construção de conhecimento sobre a composição dos sistemas venenosos investigados bem como sobre seus modos de ação.

### 3 Seqüenciamento e estudo da atividade farmacológica da toxina $\mu$ -TRTX-An1a, oriunda do veneno da aranha *Acanthoscurria natalensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae)

#### 3.1 Introdução

As aranhas da infra-ordem Mygalomorphae (Arthropoda, Chelicerata, Arachnida, Araneae) compreendem as caranguejeiras e as aranhas-alçapão (*trap-door spiders*) e estão distribuídas em 15 famílias com 300 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies (Hedin e Bond, 2006). As características distintivas das aranhas migalomorfas são o fato de não apresentarem segmentação abdominal externa aparente, a presença de dois pares de pulmões laminares e as garras de suas quelíceras que se articulam no mesmo plano do eixo longitudinal do corpo (Barnes, 1993).

As aranhas denominadas caranguejeiras<sup>2</sup> são aquelas incluídas na família Theraphosidae, representada por cerca de 900 espécies divididas em 112 gêneros (Platnick, 2011). Características morfológicas distintivas das aranhas da família Theraphosidae incluem: a presença de pêlos urticantes do tipo I e/ou III e/ou IV; bulbo palpal com grande subgutelo estendido e com quilhas presentes; ausência de órgão estridulatório entre a superfície externa das quelíceras e a superfície interna da coxa dos palpos, as quais são parcialmente ou totalmente desprovidas de pêlos (Pérez-Miles, Lucas *et al.*, 1996).

As caranguejeiras, assim como as demais aranhas, são predadores e se alimentam de uma variedade de presas vertebradas e invertebradas. A habilidade de capturar presas grandes sem auxílio de teias implica na necessidade de utilização de força física e de venenos eficientes capazes de agir rapidamente sobre o sistema nervoso central e periférico. Estão distribuídas por todo o mundo e, ainda que tendam a estar mais representadas em áreas tropicais e semi-tropicais, sua diversidade ecológica é extensa e inclui áreas úmidas ou secas, savanas, desertos, florestas tropicais ou habitats semi-temperados. A diversidade de seus nichos ecológicos e seus comportamentos predatórios correlaciona-se com a grande

---

<sup>2</sup> Na língua inglesa, os representantes da família Theraphosidae são denominadas '*tarantulas*' o que deve, então, ser traduzido para o português como 'aranha-caranguejeira' ou, simplesmente 'caranguejeira'. Na língua portuguesa, 'tarântula' é a denominação popular das aranhas pertencentes à família dos licosídeos (Araneomorphae, Lycosidae), que deve ser traduzida para o inglês como '*wolf spider*'.

diversidade de moléculas observada nos venenos de seus representantes (Escoubas e Rash, 2004).

O veneno dos terafosídeos é uma complexa mistura de sais, nucleotídeos, aminoácidos livres, neurotransmissores, poliaminas, peptídeos, proteínas e enzimas (Savel-Niemann, 1989; Escoubas, Diochot *et al.*, 2000; Rash e Hodgson, 2002; Escoubas e Rash, 2004). Conforme relatos de acidentes com humanos, os sintomas da picada de aranhas-caranguejeiras estão limitados a dor local moderada a severa, parestesia, hiperalgesia persistente, edema, eritema, enrijecimento de articulações, inchaço de membros e câimbras. Em casos mais severos de envenenamento, podem ser observados câimbras e espasmos musculares que podem persistir por várias horas (Schmidt, 1989; Lucas, Da Silva Junior *et al.*, 1994; Isbister, Seymour *et al.*, 2003; Isbister e Gray, 2004). Em vista disso, o veneno dessas aranhas pode ser essencialmente considerado inofensivo para humanos, entretanto pode afetar vertebrados e invertebrados com diferentes potências (Escoubas e Rash, 2004). Vale notar que já foram relatadas atividades inseticidas nesses venenos, com dose efetiva ( $DE_{50}$ ) na ordem de 0,017 a 0,726 nL de veneno/mg de inseto sobre *Gryllus bimaculatus* (Escoubas e Rash, 2004).

Baixa toxicidade do veneno total não implica necessariamente na inexistência de toxinas com alta-afinidade por seus alvos moleculares (Escoubas e Rash, 2004). Isso permite que venenos com baixa toxicidade total, tal qual o caso de algumas espécies de caranguejeiras, ainda sejam fontes potenciais de, por exemplo, moléculas que constituem ferramentas de dissecação de processos fisiológicos. Portanto, o veneno das caranguejeiras vem sendo alvo de investigações toxinológicas, brevemente revisadas nos parágrafos seguintes.

O mapeamento de massas de peptídeos geradas por MALDI-TOF MS de 55 venenos de caranguejeiras mostra uma distribuição molecular ‘bimodal’, com 57,8% dos peptídeos incluídos em uma classe cujos representantes possuem massas entre 3500 e 4500 Da (~ 31 a 40 aminoácidos) e com 6,9% dos peptídeos incluídos em uma segunda classe cujos representantes possuem massas entre 6.500 e 7.000 Da (~ 58 a 63 aminoácidos) (Escoubas e Rash, 2004). De fato, a maioria das toxinas peptídicas de terafosídeos já descritas se enquadra na classe de 3.500 a 4.500 Da. Duas toxinas descritas (U1-TRTX-Lp1a e U1-TRTX-Lp1b) possuem massa molecular de aproximadamente 5.300 Da. Nenhuma toxina com massa superior a 6000 Da foi caracterizada indicando o potencial para descoberta de novas moléculas biologicamente ativas nos venenos das caranguejeiras. Como mencionado anteriormente, ainda que a diversidade molecular e farmacológica das toxinas terafosídeas

pareça ser extensa, essas estão restritas a peptídeos relativamente pequenos que se enquadram em um número limitado de padrões moleculares: *i.e.*, ICK e DDH (Escoubas e Rash, 2004).

As toxinas terafosídeas já descritas foram isoladas por meio de quatro abordagens principais revisadas por Escoubas e Rash, 2004. A primeira refere-se ao isolamento de toxinas ativas, por meio da injeção do veneno ou de suas frações em camundongos ou insetos. Apesar de ser favorecida pela simplicidade, essa abordagem possui a limitação de negligenciar peptídeos não tóxicos que, ainda assim, podem apresentar alta afinidade pelos seus alvos moleculares. Muitos dos peptídeos isolados por meio dessa análise não possuem mecanismos de ação elucidados. A segunda abordagem consiste na purificação e seqüenciamento dos componentes mais abundantes do veneno. As toxinas TxP1 e TxP5 isoladas a partir dessa abordagem ainda não possuem alvos moleculares definidos.

Outra abordagem consiste na análise global dos componentes de um veneno ou dos venenos de espécies de aranhas relacionadas, sistematicamente isolando-se componentes e determinando-se seus modos de ação em vários ensaios com foco na avaliação de seus efeitos sobre alvos específicos. Essa abordagem, que representa uma elaboração da primeira estratégia descrita, pode restringir o investigador à análise daquelas moléculas mais ativas sobre determinados alvos, e resultar na não-caracterização de muitas outras toxinas.

Recentemente, novos subtipos de canais iônicos têm sido descobertos a um rápido passo. O estudo de suas funções fisiológicas requer ferramentas farmacológicas, o que estimulou vários grupos a realizar prospecção por ligantes para esses alvos específicos. Essa abordagem levou à identificação da maioria das toxinas de caranguejeiras já descritas. Assim, foram descritos ligantes para canais neuronais de cálcio dependentes de voltagem, para canais de cálcio da classe E, para alguns subtipos de canais de potássio e canais de sódio, para canais iônicos sensíveis a acidez (*Acid Sensitive Ion Channels* - ASICs) e, finalmente, para canais iônicos mecanossensíveis (*Mechanosensitive Ion Channels* - MSCs). Essa abordagem vem e, certamente, continuará eficientemente revelando novos ligantes, mas está restrita a alvos conhecidos.

Inicialmente utilizadas como meio de identificação e avaliação de variabilidade em venenos de caranguejeiras (Escoubas, Celerier e Nakajima, 1997; Escoubas, Whiteley *et al.*, 1998; Escoubas, Chamot-Rooke *et al.*, 1999; Escoubas, Corzo *et al.*, 2002), abordagens proteômicas também vêm sendo empregadas para a análise da composição e descoberta de novas toxinas nesses venenos (Legros, Celerier *et al.*, 2004; Liao, Cao *et al.*, 2007). Por meio

do seqüenciamento de novas toxinas espera-se que sua similaridade com outras moléculas já conhecidas possa direcionar os esforços posteriores de caracterização de atividade biológica.

O gênero terafosídeo *Acanthoscurria* possui 34 espécies descritas, amplamente distribuídas na região Neotropical, principalmente na América do Sul (Lucas, Gonzalez-Filho *et al.*, 2011). No entanto, com relação à caracterização de moléculas biologicamente ativas, estudos envolvendo caranguejeiras representantes desse gênero, até o momento, restringiram-se à investigação de peptídeos e acilpoliaminas com atividade antimicrobiana presentes na hemolinfa da *A. gomesiana* (Silva, Daffre *et al.*, 2000; Lorenzini, Da Silva *et al.*, 2003; Lorenzini, Fukuzawa *et al.*, 2003; Fazio, Oliveira *et al.*, 2006; Barbosa, Daffre *et al.*, 2007; Fazio, Jouvensal *et al.*, 2007; Moreira, Rodrigues *et al.*, 2007; Pereira, Silva *et al.*, 2007; Remuzgo, Andrade *et al.*, 2008; Miranda, Miranda *et al.*, 2009) sendo inexistentes trabalhos de identificação e caracterização estrutural e biológica de peptídeos e outros componentes moleculares do veneno dessas aranhas. Recentemente, um estudo desenvolvido por nosso grupo reportou a purificação e seqüenciamento parcial de uma insetotoxina (massa molecular média: 5.375 u), proveniente do veneno da espécie *A. natalensis* (Borges, 2008), que ocorre nos biomas caatinga e cerrado (Lucas, Gonzalez-Filho *et al.*, 2011). O presente estudo reporta o seqüenciamento completo e a caracterização, por métodos eletrofisiológicos, da atividade da toxina, então denominada  $\mu$ -theraphotoxin-An1a ( $\mu$ -TRTX-An1a)<sup>3</sup>, sobre a função de neurônios dorsais não pareados medianos (*dorsal unpaired median* - DUM) de barata

---

<sup>3</sup> Adotou-se o sistema de nomenclatura de toxinas proposto por (King, Gentz *et al.*, 2008): ‘ $\mu$ ’ remete ao antagonismo observado sobre corrente de sódio dependente de voltagem; ‘Theraphotoxin’ remete ao nome da família Theraphosidae; ‘An1a’ remete a *Acanthoscurria natalensis*, peptídeo 1, isoforma a.



## 3.2 Material e métodos<sup>4</sup>

### 3.2.1 Animais e obtenção de veneno

Aranhas caranguejeiras fêmeas adultas da espécie *A. natalensis*, provenientes da cidade de Feira de Santana/BA e arredores, foram conservadas em cativeiro e submetidas a múltiplas extrações de veneno.

O veneno foi obtido através de estimulação elétrica na base das quelíceras, coletado com o auxílio de micro-pipeta e imediatamente transferido para água acidificada resfriada (0,1% TFA, aproximadamente 4°C). Esta solução foi, então, centrifugada (14.000 g, durante 5 minutos) e as frações sobrenadantes agrupadas e liofilizadas. Os venenos liofilizados foram armazenados em freezer (-20°C) até o uso.

### 3.2.2 Purificação da $\mu$ -TRTX-An1a

A purificação da  $\mu$ -TRTX-An1a foi realizada por cromatografia bidimensional ou unidimensional, conforme descrito a seguir. A homogeneidade da  $\mu$ -TRTX-An1a era avaliada por MALDI-TOF-TOF MS. A toxina purificada e liofilizada era armazenada em freezer (-20°C) até o uso.

#### 3.2.2.1 Cromatografia bidimensional

A cromatografia bidimensional consistiu no fracionamento do veneno de *A. natalensis* por cromatografia de troca catiônica (CIEX) seguido de cromatografia de fase reversa (RPC) das frações de interesse obtidas no passo anterior. Para esta estratégia de

---

<sup>4</sup> A conservação de exemplares de *A. natalensis* em cativeiro e as extrações de veneno foram realizadas no Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana; o seqüenciamento N-terminal foi realizado no Laboratório de Espectrometria de Massa, da unidade de Recursos Genéticos e Biotecnologia, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; os ensaios eletrofisiológicos foram realizados no *Laboratoire de Neurophysiologie Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires*, da *Université d'Angers*; e os experimentos de LC-MS e LC-MS/MS foram realizados no *Department of Biochemistry and Molecular Biology*, da *University of Southern Denmark*.

purificação foi empregado sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ÄKTA Explorer 100 (Amersham Biosciences), controlado pelo software UNICORN 4.11, equipado com módulo de coleta automática de frações (Frac920, Amersham Biosciences). A eluição foi acompanhada por meio do monitoramento da absorbância a 214 e 280 nm.

Para a etapa de CIEX, utilizou-se uma coluna TSK-Gel CM-SW, 15 cm x 4,6 mm (Tosoh Biosep), com fluxo de 0,75 mL.min<sup>-1</sup>. A coluna foi equilibrada com acetato de sódio 50 mM (pH 5) (eluente A). A amostra de veneno (2 mg) foi dissolvida no eluente A e aplicada à coluna. A eluição foi obtida através de um gradiente linear de NaCl (em acetato de sódio 50 mM, pH 5 – eluente B), de 0 a 1 M, com inclinação de 10 mM.min<sup>-1</sup>.

Para a etapa de RPC foi utilizada uma coluna Chromolith Performance RP-18 (100 x 4,6 mm) (Merk), com fluxo de 5,0 mL.min<sup>-1</sup>. A coluna foi equilibrada com solução aquosa de TFA 0,1% (eluente A), sendo a fração de interesse proveniente da etapa de CIEX aplicada à coluna. A eluição foi obtida por meio de gradiente linear de 0 - 100% de solução de TFA 0,1% em acetonitrila (ACN) (eluente B), em 11,5 minutos. Amostras obtidas por essa estratégia foram submetidas aos ensaios eletrofisiológicos.

### 3.2.2.2 Cromatografia unidimensional

A cromatografia unidimensional consistiu na purificação da  $\mu$ -TRTX-An1a por meio do fracionamento do veneno de *A. natalensis* por RPC e re-cromatografia (RPC) das frações de interesse obtidas no passo anterior. Para esta estratégia de purificação foi empregado sistema HPLC (Shimadzu Co.) equipado com módulo de detecção UV-VIS SPD-10A, dois módulos cromatográficos LC-10AD e módulo registrador C-R6A.

O veneno bruto de *A. natalensis* foi pesado e diluído em solução aquosa de TFA 0,1% (v/v) em concentração aproximada de 1 g.L<sup>-1</sup>. As RPCs foram realizadas utilizando-se uma coluna Source<sup>™</sup> 5 4.6/150 (Pharmacia Biotech), com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. A coluna foi equilibrada com solução aquosa de TFA 0,1% (eluente A) e, então 1 mL de amostra era aplicada à coluna. A eluição foi obtida por meio de gradiente linear de 0 - 40% de solução de TFA 0,1% em acetonitrila (ACN) (eluente B), com inclinação de 1 %.min<sup>-1</sup>. Amostras obtidas por essa estratégia foram submetidas às análises da estrutura primária.

### 3.2.3 Redução e alquilação da $\mu$ -TRTX-An1a

A redução de pontes dissulfeto e a alquilação de resíduos de cisteína da  $\mu$ -TRTX-An1a foram realizadas segundo os protocolos descritos a seguir.

(A) Cerca de 100  $\mu$ g de  $\mu$ -TRTX-An1a foram dissolvidos em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM (pH 8), incubados com DTT (concentração final de 25 mM) e cloridrato de guanidina 6 M a 70°C durante 1 hora e posteriormente incubados com iodoacetamida (concentração final de 50 mM) a 37°C, durante 1 hora, na ausência de luz (Aitken e Learmonth, 2002). As amostras derivatizadas por meio deste protocolo foram re-cromatografadas por RP-HPLC (LC10 AD VP, Shimadzu Co.) em coluna  $\text{C}_{18}$  (218TP54, Vydac-Dionex), analisadas por MALDI-TOF-TOF e submetidas ao seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman automatizada.

(B) Neste protocolo foi empregada uma versão modificada do método de ‘preparação de amostra assistida por filtro’ (*filter-aided sample preparation* – FASP) (Wisniewski, Zougman *et al.*, 2009). Cerca de 10  $\mu$ g de  $\mu$ -TRTX-An1a foram desnaturados e reduzidos por DTT 100 mM em Tris-HCl 100 mM (pH 7,6) e SDS 4%, mediante incubação a 110°C durante 5 minutos. O meio de reação contendo a  $\mu$ -TRTX-An1a desnaturada e reduzida foi misturado a 200  $\mu$ L de uréia 8 M em um dispositivo filtrante Microcon YM-3 (Millipore) e o dispositivo centrifugado a 14,000 g a 20°C durante 40 minutos. O concentrado foi diluído em 200  $\mu$ L de uréia 8 M em Tris-HCl 100 mM (pH 8,5) e o dispositivo foi novamente centrifugado nas mesmas condições. Subseqüentemente, 100  $\mu$ L de iodoacetamida 50 mM e uréia 8 M em Tris-HCl 100 mM (pH 8,5) foram adicionados ao concentrado. O meio de reação, protegido da luz, foi incubado por 5 min à temperatura ambiente e o dispositivo foi novamente centrifugado nas mesmas condições. O concentrado contendo a  $\mu$ -TRTX-An1a reduzida e alquilada foi ressuspenso em  $\text{H}_2\text{O}$  contendo ácido fórmico 0,1% (v/v) e submetido a LC-MS/MS.

### 3.2.4 Seqüenciamento N-terminal

A estrutura primária da  $\mu$ -TRTX-An1a foi investigada por meio de seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman automatizada do polipeptídeo em sua forma reduzida e alquilada ( $\mu$ -TRTX-An1a<sub>Alq</sub>). Para tanto, utilizou-se um seqüenciador modelo PPSQ-23

(Shimadzu Co.). As frações cromatográficas contendo o material de interesse (i.e.  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>Alq</sub>) foram concentradas por evapo-centrifugação, ressuspensas em 20  $\mu$ L de água deionizada, contendo 0,1% (v/v) de TFA e analisadas segundo instruções do fabricante.

### 3.2.5 Espectrometria de massa

#### 3.2.5.1 MALDI-TOF-TOF

Análises por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF-TOF foram realizadas em instrumentos AutoFlex III ou Ultraflex III (Bruker Daltonics), operados em modo positivo e controlados pelo *software* FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics). Amostras eram misturadas a uma solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (1:1, v/v) diretamente em placas MTP AnchorChip 400/384 ou 800/384 (Bruker Daltonics) e secadas em temperatura ambiente. Para a determinação da massa monoisotópica de moléculas com massa entre 800 – 5,000 Da, foi empregado o modo refletido com calibração externa utilizando-se o padrão de calibração de peptídeos indicado pela fabricante (*Peptide Calibration Standard*, Bruker Daltonics). Para a determinação da massa média de moléculas com massa entre 5,000 – 20,000 Da, foi empregado o modo linear com calibração externa utilizando-se o padrão de calibração de proteínas indicado pela fabricante (*Protein Calibration Standard*, Bruker Daltonics). Para a visualização de resultados foi utilizado o *software* FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

#### 3.2.5.2 LTQ-Orbitrap

Para complementar os resultados obtidos pela degradação de Edman, a estrutura primária da  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>Alq</sub> foi investigada por meio de espectrometria de massa *in tandem*. Para tanto, foi utilizado um instrumento LTQ Orbitrap Velos ETD (ThermoFisher Scientific) interfaceado com um cromatógrafo EasyLC (Proxeon), ambos controlados pelo *software* *Thermo Xcalibur 2.1* (ThermoFisher Scientific).

Na etapa cromatográfica do experimento, foi utilizada uma coluna analítica (diâmetro interno e externo: 100  $\mu\text{m}$  e 375  $\mu\text{m}$ , respectivamente; comprimento: 15 cm) empacotada com resina ReproSil-Pur C<sub>18</sub> (diâmetro de partícula: 3  $\mu\text{m}$ ) (Dr. Maisch GmbH). A coluna foi equilibrada em solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) (eluente A). A amostra foi aplicada na coluna e, em seguida, realizou-se um gradiente linear de 0 – 34% do eluente B [ácido fórmico 0,1%, H<sub>2</sub>O 10% e ACN 90% (v/v)] em 63 minutos. Foi utilizado um fluxo de solvente de 250  $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Foi empregada uma fonte de nanoeletronebulização (Proxeon) operada com voltagem de 2,3 kV e temperatura de 270 °C. O espectrômetro de massa foi operado de maneira dado-dependente para que automaticamente alternasse entre aquisição MS e MS/MS. A acurácia do analisador de massas Orbitrap foi calculada no dia do experimento em 1,8 ppm. Os íons parentais foram analisados em alta resolução (60.000 FWHM) e os 2 íons mais intensos em cada ciclo foram ativados pelo método ETD e os fragmentos resultantes foram resolvidos também no analisador Orbitrap (30.000 FWHM). Cada ciclo (MS e MSMS) tinha a duração aproximada de 7,2 segundos.

Para a determinação da massa monoisotópica da  $\mu$ -TRTX-An1a em sua forma nativa foi realizado experimento LC-MS, conduzido tal como descrito para o experimento LC-MS-MS sem as etapas de espectrometria de massa *in tandem*.

Os espectros MS e MS/MS foram visualizados e deconvoluídos para carga unitária por meio do *software* Thermo Xcalibur 2.1. Os espectros originais e deconvoluídos foram utilizados para a interpretação *de novo* manual.

### 3.2.6 Análise de seqüência

Uma vez obtidas informações sobre a estrutura primária da  $\mu$ -TRTX-An1a, buscas por moléculas similares eram realizadas por meio do programa BLASTP 2.2.23+ (Altschul, Madden *et al.*, 1997) contra o banco de dados *nr* sem filtro de taxonomia. Alinhamento múltiplo de seqüências foi realizado por meio do *software* ClustalW 2.0.12 (Thompson, Higgins *et al.*, 1994; Larkin, Blackshields *et al.*, 2007).

### 3.2.7 Quantificação da $\mu$ -TRTX-An1a

Para a quantificação da toxina  $\mu$ -TRTX-An1a, foi empregado o método de determinação de absorvância em luz ultravioleta (Waddell, 1956), conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = 144 \cdot (A_{215} - A_{225}) \quad (12)$$

$A_{215}$  e  $A_{225}$  são as absorvâncias a 215 nm e 225 nm, respectivamente, da  $\mu$ -TRTX-An1a diluída em água. Para o aferimento da absorvância em luz ultravioleta foi utilizado um espectrofotômetro UV-160A (Shimadzu Co.) e cubetas de quartzo com capacidade volumétrica de 1,0 mL.

### 3.2.8 Ensaios eletrofisiológicos

Para a avaliação dos efeitos da toxina  $\mu$ -TRTX-An1a sobre o funcionamento de canais iônicos em sistema nervoso de insetos, foi utilizada a técnica de *patch-clamp*, na configuração *whole-cell* (Hamill, Marty *et al.*, 1981) em neurônios DUM de baratas *Periplaneta americana* macho adultas.

Os animais foram criados em cativeiro a 29°C sob ciclo claro/escuro de 12 h. Os experimentos foram realizados em neurônios DUM isolados da linha média do gânglio abdominal terminal da corda nervosa de *P. americana*. Os neurônios foram obtidos por meio de tratamento enzimático e dissociação mecânica conforme previamente descrito (Lapied, Malecot *et al.*, 1989). As células foram incubadas por 12 h a 29°C antes dos experimentos eletrofisiológicos.

Foi utilizado o modo *voltage-clamp* para registrar as correntes de membrana e o modo *current-clamp* para registrar potenciais de ação. Os sinais foram aferidos por meio de um amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments Inc.). As pipetas de *patch* foram confeccionadas a partir do estiramento de tubos capilares de vidro de boro silicato (Clark Electromedical Instruments) e possuíam resistências na ordem de 0,7 a 0,9 M $\Omega$  quando

preenchidas com solução interna de pipeta (vide composição abaixo). O potencial da junção líquida entre o banho e a solução interna era sempre compensado antes da formação do gigaselo ( $>2 \text{ G}\Omega$ ).

Para os estudos de *voltage-clamp* do influxo de sódio, pulsos de voltagem eram gerados por um estimulador programável (SMP 310, Biologic, Claix, France). Alternativamente, pulsos de voltagem eram gerados por um computador IBM Pentium 100, munido do software pClamp (pClamp version 6.03, Axon Instruments) conectado a um sistema Labmaster DMA - 125 kHz (TL-1-125 interface, Axon Instruments). A não ser quando indicado de outra maneira, as células eram mantidas a um potencial de  $-90 \text{ mV}$ , e pulsos de teste de  $30 \text{ ms}$  de duração eram aplicados com uma frequência de  $0,3 \text{ Hz}$ . Ainda que a maior parte das correntes capacitiva e de vazamento tenha sido compensada eletronicamente no início de cada experimento, a subtração da capacitância e da corrente de vazamento residual era realizada por meio do protocolo P/4 do software pClamp. Assim, o computador gerava quatro sub-pulsos antes da aplicação do pulso do teste principal. As correntes evocadas pelos sub-pulsos eram somadas para que fossem computadas as correntes de capacitância e de vazamento, as quais eram subtraídas das correntes evocadas pelo pulso de teste principal. Os dados eram exibidos em um osciloscópio digital (310, Nicolet Instrument) e armazenados no disco rígido do computador (frequência de aquisição de dados:  $33,3 \text{ kHz}$ ) para análise posterior.

Para os experimentos no modo *current-clamp*, pulsos de corrente despolarizante eram eliciados com frequência de  $0,5 \text{ Hz}$  por meio de estimulador programável (SMP 310, Biologic).

A composição das soluções utilizadas encontra-se detalhada na tabela abaixo:

**Tabela 1. Soluções utilizadas para experimentos eletrofisiológicos com neurônios DUM de *Periplaneta americana*.**

<b>Solução externa para modo <i>Current-clamp</i></b>			<b>Solução interna para modo <i>Current-clamp</i></b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidade</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidade</b>
[NaCl]	200,00	mM	[K-aspartame]	160,00	mM
[KCl]	3,10	mM	[KF]	10,00	mM
[MgCl <sub>2</sub> ]	4,00	mM	[NaCl]	10,00	mM
[CaCl <sub>2</sub> ]	5,00	mM	[MgCl <sub>2</sub> ]	1,00	mM
[HEPES]	10,00	mM	[ATP-Mg]	1,00	mM
pH	7,40	-	[CaCl <sub>2</sub> ]	0,50	mM
			[EGTA]	10,00	mM
			[HEPES]	10,00	mM
			pH	7,40	-

<b>Solução externa para modo <i>Voltage-clamp</i></b>			<b>Solução interna para modo <i>Voltage-clamp</i></b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidade</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidade</b>
[NaCl]	80,00	mM	[CsCl]	90,00	mM
[TEA-Cl]	120,00	mM	[CsF]	70,00	mM
[KCl]	3,10	mM	[NaCl]	15,00	mM
[CaCl <sub>2</sub> ]	2,00	mM	[MgCl <sub>2</sub> ]	1,00	mM
[MgCl <sub>2</sub> ]	7,00	mM	[ATP-Mg]	3,00	mM
[CdCl <sub>2</sub> ]	1,00	mM	[EGTA]	10,00	mM
[4-AP]	5,00	mM	[HEPES]	10,00	mM
[HEPES]	10,00	mM	pH	7,40	-
pH	7,40	-			

Quando quantificados, os dados estão expressos em médias  $\pm$  erro padrão de medida (EPM).

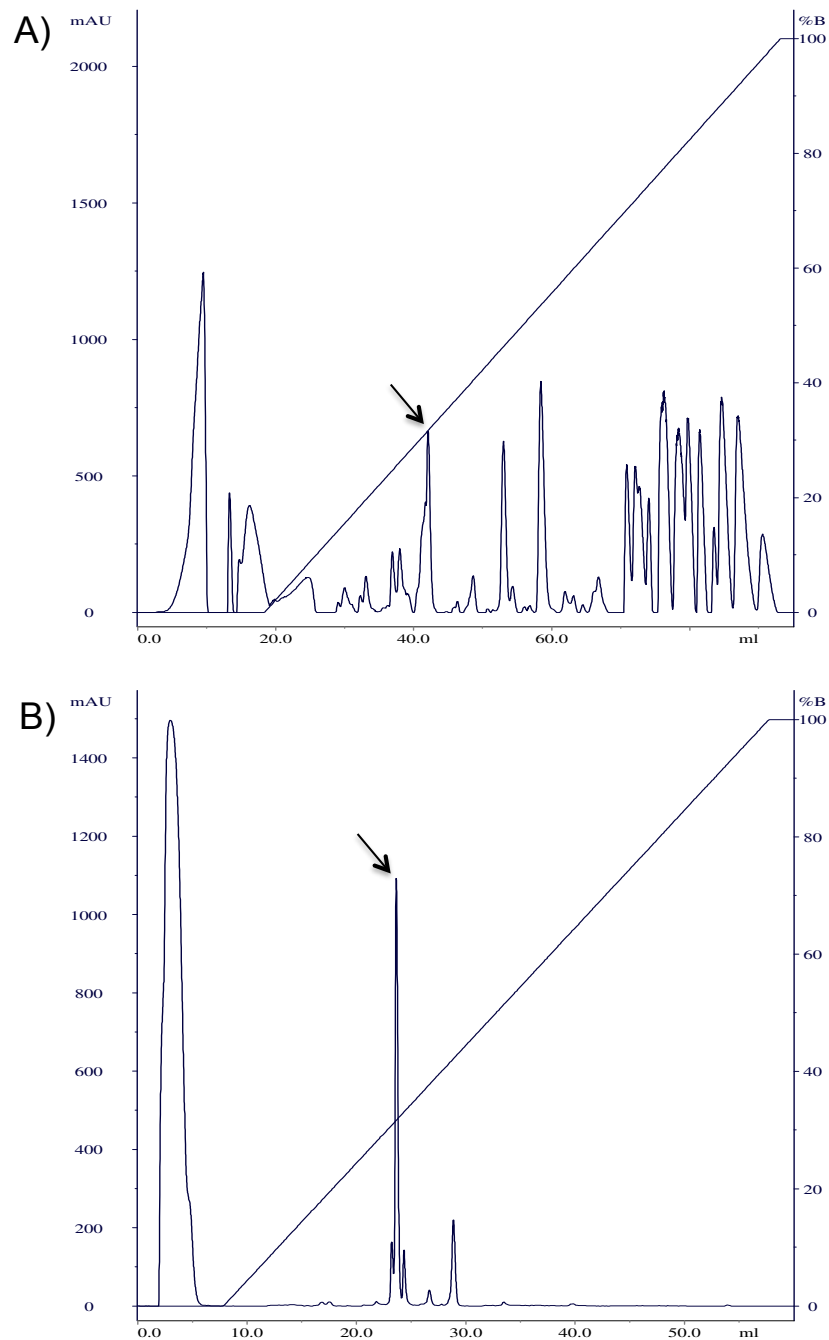


### 3.3 Resultados e discussão

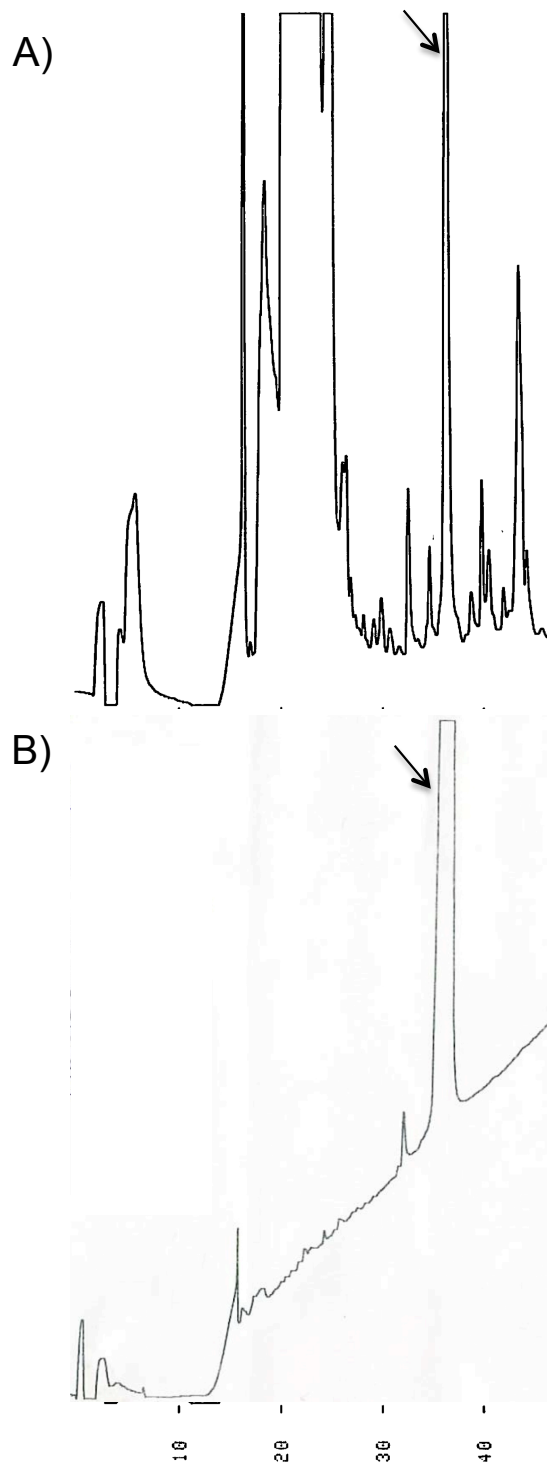
#### 3.3.1 Purificação da $\mu$ -TRTX-An1a

Foram empregadas duas estratégias para a purificação de  $\mu$ -TRTX-An1a, *i.e.*, cromatografia bidimensional (Figura 6) e unidimensional (Figura 7). Ambas resultaram na purificação da  $\mu$ -TRTX-An1a à homogeneidade, determinada por MALDI-TOF-TOF (não mostrado). Na primeira estratégia, a fração contendo a toxina de interesse eluía com concentrações de eluente B entre 28,8 – 32,8% e entre 31,3 - 32,8% nas etapas de CIEX e RPC, respectivamente. Na segunda, a fração contendo a toxina de interesse eluía com concentrações entre 30 – 31% em ambas as etapas de RPC.

As alíquotas de  $\mu$ -TRTX-An1a purificadas por meio de cromatografia bidimensional foram utilizadas em ensaios eletrofisiológicos, enquanto as alíquotas purificadas por cromatografia unidimensional foram empregadas na determinação da estrutura primária.



**Figura 6. Purificação da  $\mu$ -TRTX-An1a por meio de cromatografia bidimensional.** (A) Cromatografia de troca catiônica (CIEX). Veneno bruto de *Acanthoscurria natalensis* (2 mg) foi aplicado à coluna de CIEX (TSK-Gel® CM-SW, 15 cm x 4.6 mm) previamente equilibrada com o eluente A (acetato de sódio 50 mM, pH 5). Um gradiente linear foi realizado (0 – 1 M [NaCl] com inclinação de  $10 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ ) aumentando a concentração do eluente B (acetato de sódio 50 mM e NaCl 1M, pH 5). Fluxo:  $0,75 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . (B) Cromatografia de fase reversa (RPC). As frações de interesse obtidas na etapa de CIEX foram aplicadas à coluna de RPC (Source 5 4.6/150), previamente equilibrada com  $\text{H}_2\text{O}$  contendo TFA 0,1% (v/v) (eluente A). A eluição foi obtida através de gradiente linear (0 - 100% em 11,5 minutos) de ACN contendo TFA 0,1% (v/v) (eluente B). Fluxo:  $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . São mostradas leituras de absorbância a 214 nm. As setas indicam as frações contendo a toxina  $\mu$ -TRTX-An1a.



**Figura 7. Purificação da  $\mu$ -TRTX-An1a por meio de cromatografia unidimensional.** (A) O veneno bruto de *Acanthoscurria natalensis* (1 mg) foi aplicado à coluna de RPC (Source 5 4.6/150), previamente equilibrada com  $\text{H}_2\text{O}$  contendo TFA 0,1% (v/v) (eluyente A). A eluição foi obtida através de gradiente linear (0 - 40% na inclinação de  $1\%.\text{min}^{-1}$ ) de ACN contendo TFA 0,1% (v/v) (eluyente B). Fluxo: 1 mL/min. (B) Frações de interesse foram agrupadas e re-submetidas a RPC. São mostradas leituras de absorvância a 214 nm. As setas indicam as frações contendo a toxina  $\mu$ -TRTX-An1a (eluição:  $\approx 30\%$  B). Números indicados na abscissa referem-se à duração em minutos do programa cromatográfico (0 - 7 min, 0% B; 7 - 47 min, 0 - 40% B).

### 3.3.2 Determinação e análise da estrutura primária da $\mu$ -TRTX-An1a

Como mencionado acima, em um estudo anterior, foram elucidados 26 resíduos da estrutura primária da  $\mu$ -TRTX-An1a por meio de seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman do polipeptídeo em sua forma nativa (Borges, 2008). No presente estudo, a toxina  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alq</sub> foi submetida ao seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman. Confirmaram-se os 26 resíduos determinados anteriormente e elucidou-se a identidade de 11 resíduos adicionais (Tabela 2).

**Tabela 2. Seqüenciamento N-terminal de  $\mu$ -TRTX-An1a e de sua forma reduzida e alquilada ( $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alq</sub>) por degradação de Edman automatizada.**

Forma	Seqüência										
$\mu$ -TRTX-An1a (Borges, 2008)			10		20				30		
	IIECF	FSCEI	EKDGK	SKEGK	PCKPK	G					
$\mu$ -TRTX-An1a <sub>alq</sub>	IIECF	FSCEI	EKDGK	SKEGK	PCKPK	GDKDK	DKKCG	GW			

Para a determinação do segmento restante da seqüência, a  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alq</sub> foi submetida a um experimento LC-MS-MS. No modo MS,  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alq</sub> foi visualizada por meio de seus íons  $[M + 7H]^{+7}$ ,  $[M + 8H]^{+8}$ ,  $[M + 9H]^{+9}$  e  $[M + 10H]^{+10}$ . Sua massa monoisotópica foi determinada em 5.718,87 u. Tal fato sugere a presença de 6 resíduos de cisteína, em virtude da diferença de 348 u [*i.e.*, 6 x 58 u, referente à diferença de massa molecular entre cisteínas oxidadas (-S-S-) e carbóxi-amidometil cisteínas] entre a massa monoisotópica da  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alq</sub> e de sua forma nativa (5.370,67 u). Os resultados acima estão sumarizados na Tabela 3.

**Tabela 3. Determinação da massa monoisotópica (M) de  $\mu$ -TRTX-An1a e de sua forma reduzida e alquilada ( $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alq</sub>).**

Forma	$z$	$[M + zH]^{z+}$ (Th)	$M_{\text{obs}}$ (u)	$\overline{M}_{\text{obs}}$ (u)
$\mu$ -TRTX-An1a	4	1.343,676	5.370,67	5.370,67
	5	1.075,143	5.370,68	
	6	896,120	5.370,67	
	7	768,246	5.370,67	
$\mu$ -TRTX-An1a <sub>alq</sub>	7	817,987	5.718,85	5.718,87
	8	715,866	5.718,87	
	9	636,438	5.718,87	
	10	572,895	5.718,87	

Massa molecular de H: 1,007825 u. ' $M_{\text{obs}}$ ' = massa molecular observada. ' $z$ ' indica a carga dos íons verificados.

Os íons multiplamente carregados de  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alq</sub> foram analisados por MS/MS com ativação por ETD. Os espectros MS/MS, original e deconvolvido, do íon  $[M + 7H]^{+7}$  foram utilizados para dedução da seqüência da  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alq</sub>. Por meio dessa análise foi possível determinar a seqüência dos 10 resíduos restantes. No entanto, não foi possível diferenciar os resíduos Ile/Leu nas posições 41, 45 e 47. Ainda que os íons  $c_{47}$  e  $z_1$  não tenham sido visualizados, foi possível identificar o resíduo C-terminal como Ile/Leu devido à diferença entre a massa observada do íon  $c_{46}$  e a massa teórica do íon  $c_{\text{max}}$ , *i.e.*,  $c_{\text{max}} = [M + H]^+ - 16$  u.

A Tabela 4 representa a interpretação do espectro MS/MS da  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alq</sub> e a Tabela 5 mostra de maneira consolidada o resultado da determinação de sua estrutura primária. A seqüência da  $\mu$ -TRTX-An1a foi depositada no UniProtKB sob o número de acesso B3A0P0.

Tabela 4. Interpretação do espectro MS/MS do íon  $[M + 7H]^{+7}$  de  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alg</sub>.

Série c					Série z							
z = 5	z = 4	z = 3	z = 2	z = 1	#	Seq.	#	z = 1	z = 2	z = 3	z = 4	z = 5
					1	I	47					
					2	I	46					
					3	E	45				-0.028	
					4	CAM	44					
					5	F	43					
					6	F	42					
					7	S	41					
					8	CAM	40					
					9	E	39					
					10	I	38					
					11	E	37					
					12	K	36					
					13	D	35					
					14	G	34					
			-0.002		15	K	33					
			-0.003		16	S	32				-0.011	-0.007
			0.005		17	K	31					
			0.005		18	E	30				0.001	0.002
			0.007		19	G	29				0.001	0.001
					20	K	28			-0.007	-0.001	-0.002
			0.009		21	P	27					
		0.003	0.008		22	CAM	26					
					23	K	25			0.007	-0.002	
					24	P	24					
					25	K	23					
	-0.001				26	G	22			-0.003		
	-0.003				27	D	21		0.003	-0.004		
	0.004	-0.004			28	K	20			-0.002		
	-0.006	0.008			29	D	19		-0.001	0.000		
	0.005	0.004			30	K	18		-0.005	0.000		
	-0.006	-0.000			31	D	17		-0.011	-0.000		
	-0.005	0.001			32	K	16			-0.002		
	0.008	0.003			33	K	15		-0.003	0.002		
	-0.002	-0.005			34	CAM	14					
	0.004	-0.007			35	G	13		0.003			
					36	G	12		-0.002			
					37	W	11		-0.004			
					38	R	10		0.002			
				<u>0.021</u>	39	CAM	9					
0.018					40	K	8	-0.006	-0.001			
					41	L/I	7	0.000				
					42	K	6	-0.005				
-0.010					43	M	5	-0.003				
	-0.011				44	CAM	4					
	-0.023				45	L/I	3	0.002				
	0.002				46	K	2	-0.001				
					47	L/I	1					

Os números decimais indicam, em u, a diferença entre o valor teórico e o observado dos íons de fragmentos, *i.e.*,  $[M + zH]_{teor}^{+z} - [M + zH]_{obs}^{+z}$ . 'z' indica a carga dos íons dos fragmentos verificados. O íon C<sub>39</sub> (sublinhado) foi verificado no espectro deconvolvido a z = 1. A seqüência peptídica está representada no sentido N → C-terminal de cima para baixo. 'CAM' indica carbóxi-amidometil cisteína.

**Tabela 5. Determinação da estrutura primária completa da  $\mu$ -TRTX-An1a.**

Seqüência	$M_{\text{obs}} (\mathbf{u})^*$	$M_{\text{calc}} (\mathbf{u})^\ddagger$	$M_{\text{obs}} - M_{\text{calc}} (\mathbf{u})$
10                      20                      30			
IIECF FSCEI EKDGK SKEGK PCKPK GDKDK	5.370,67	5.370,67	0,00
40			
DKKCG GWRCK lKMCl Kl			

O segmento hachurado foi elucidado por degradação de Edman da  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alq</sub>. O segmento restante foi elucidado por espectrometria de massa *in tandem* (ESI-LTQ-Orbitrap) da  $\mu$ -TRTX-An1a<sub>alq</sub>. “l” indica resíduos Ile/Leu não diferenciados. \* $M_{\text{obs}}$  refere-se a massa molecular monoisotópica do  $\mu$ -TRTX-An1a em sua forma nativa determinada por ESI-LTQ-Orbitrap.  $\ddagger M_{\text{calc}}$  refere-se à massa calculada a partir da seqüência determinada, considerando cisteínas oxidadas (-S-S-).

O resultado da busca por seqüências similares à  $\mu$ -TRTX-An1a está sumarizado na Tabela 6. O alinhamento múltiplo de  $\mu$ -TRTX-An1a e das similares está mostrado na Figura 8. Apesar da seqüência da toxina U1-TRTX-Hh1a não ter produzido alinhamento significativo na busca por similaridades, sua estrutura primária foi incluída na Figura 8 com o objetivo de orientar as discussões abaixo.

Tabela 6. Sequências produzindo alinhamentos significantes com  $\mu$ -TRTX-An1a.

No. de acesso	Nome	Referência	Espécie*	Score	Cobertura	<i>e</i>
<a href="#">P85497.1</a>	U1-theraphotoxin-Bal a	(Corzo, Bernard <i>et al.</i> , 2009)	<i>Brachypelma albiceps</i>	49.3	100%	$7 \times 10^{-8}$
<a href="#">P61509.1</a>	U1-theraphotoxin-Asp1a	(Savel-Niemann, 1989)	<i>Aphonopelma sp.</i>	48.9	100%	$1 \times 10^{-7}$
<a href="#">P85504.1</a>	U1-theraphotoxin-Bal b	(Corzo, Bernard <i>et al.</i> , 2009)	<i>Brachypelma albiceps</i>	48.5	100%	$1 \times 10^{-7}$
<a href="#">P49265.1</a>	U1-theraphotoxin-Bs1a	(Kaiser, Griffin <i>et al.</i> , 1994)	<i>Brachypelma smithi</i>	48.5	100%	$1 \times 10^{-7}$
<a href="#">P61506.1</a>	U1-theraphotoxin-Lp1b	(Escoubas, Celerier, Romi-Lebrun <i>et al.</i> , 1997)	<i>Lasiadora parahybana</i>	45.8	91%	$2 \times 10^{-6}$
<a href="#">ADF28496.1</a>	putative mature sequence toxin-like LFEC	(Diego-Garcia, Peigneur <i>et al.</i> , 2010)	<i>Citharischius crawshayi</i>	45.8	100%	$4 \times 10^{-6}$
<a href="#">Q5Q114.1</a>	U1-theraphotoxin-Lsp1b	(Vieira, Moura <i>et al.</i> , 2004)	<i>Lasiadora sp.</i>	43.9	100%	$3 \times 10^{-5}$
<a href="#">Q5Q113.1</a>	U1-theraphotoxin-Lsp1c	(Vieira, Moura <i>et al.</i> , 2004)	<i>Lasiadora sp.</i>	43.9	95%	$4 \times 10^{-5}$
<a href="#">P0CC19.1</a>	U1-theraphotoxin-Lsp1a	(Vieira, Moura <i>et al.</i> , 2004)	<i>Lasiadora sp.</i>	43.1	95%	$7 \times 10^{-5}$
<a href="#">ADF28498.1</a>	putative mature sequence toxin-like RFEC	(Diego-Garcia, Peigneur <i>et al.</i> , 2010)	<i>Citharischius crawshayi</i>	42.4	97%	$1 \times 10^{-4}$
<a href="#">B1P1A7.1</a>	U3-theraphotoxin-Cj1b	(Liao, Cao <i>et al.</i> , 2007; Chen, Deng <i>et al.</i> , 2008)	<i>Chilobrachys jingzhao</i>	41.6	100%	$2 \times 10^{-4}$
<a href="#">P0CC18.1</a>	U1-theraphotoxin-Lp1a	(Escoubas, Celerier, Romi-Lebrun <i>et al.</i> , 1997)	<i>Lasiadora parahybana</i>	40.8	91%	$2 \times 10^{-4}$
<a href="#">B1P1A6.1</a>	U3-theraphotoxin-Cj1a	(Liao, Cao <i>et al.</i> , 2007; Chen, Deng <i>et al.</i> , 2008)	<i>Chilobrachys jingzhao</i>	40.4	100%	$5 \times 10^{-4}$
<a href="#">B1P1A9.1</a>	U3-theraphotoxin-Cj1c	(Chen, Deng <i>et al.</i> , 2008)	<i>Chilobrachys jingzhao</i>	40.4	100%	$6 \times 10^{-4}$
<a href="#">ABY77731.1</a>	HWTX-VIIc precursor	(Jiang, Peng <i>et al.</i> , 2008)	<i>Haplopelma huwenum</i>	37.7	100%	0.008
<a href="#">D2Y2J2.1</a>	Hainantoxin-II-19	(Tang, Zhang <i>et al.</i> , 2010)	<i>Haplopelma hainanum</i>	35.0	100%	0.080
<a href="#">D2Y227.1</a>	Hainantoxin-II-16	(Tang, Zhang <i>et al.</i> , 2010)	<i>Haplopelma hainanum</i>	35.0	100%	0.082
<a href="#">D2Y214.1</a>	Hainantoxin-II-3	(Tang, Zhang <i>et al.</i> , 2010)	<i>Haplopelma hainanum</i>	32.0	100%	1.3

A busca por seqüências similares foi realizada por meio do *software* BLASTP 2.2.23+ contra o banco de dados *nr* sem filtro de taxonomia. \*Os nomes de espécies aqui indicados estão de acordo com Platnick, 2011; apenas nomes atualmente válidos estão mostrados, portanto, esses podem diferir daqueles adotados na literatura citada.



U1-TRTX-Lsp1a	FFECTFECDIKK-----EG-KPCKPKGCKCKDKDNKDHHKCS--GGWRCKLKLCLKF	49
U1-TRTX-Lp1a	FFECTFECDIKK-----EG-KPCKPKGCKCKDKDNKDHHKCS--GGWRCKLKLCLKF	49
U1-TRTX-Lp1b	FFECTLECDIKK-----EG-KPCKPKGCKCNDKDNKDHHKCS--GGWRCKLKLCLKF	49
U1-TRTX-Lsp1c	FFECTFECDIKK-----EG-KPCKPKGCKCDDKDNKDHHKCS--GGWRCKLKLCLKF	49
U1-TRTX-Lsp1b	LFECTFECDIKK-----EG-KPCKPKGCKCDDKDNKDHHKCS--GGWRCKLKLCLKI	49
U1-TRTX-Bala	IIECVFSCDIKK-----EG-KPCKPKG-----EKKCT--GGWRCKIKLCLKI	39
U1-TRTX-Bal1b	IFECVFSCDIKK-----EG-KPCKPKG-----EKKCT--GGWRCKIKLCLKI	39
U1-TRTX-Asp1a	IFECVFSCDIEK-----EG-KPCKPKG-----EKKCT--GGWKCKIKLCLKI	39
U1-TRTX-Bs1a	IFECVFSCDIEK-----EG-KPCKPKG-----EKKCS--GGWKCKIKLCLKI	39
<b>μ-TRTX-An1a</b>	<b>IIECFFSCEIEKDGSKEG-KPCKPKG----DKDK--DKKC---GGWRCKLKMCLK1</b>	<b>47</b>
U3-TRTX-Cj1b	IFECFSFSCDIKK-----NG-KPCKGAG-----EKKCS--GGWRCKMNFVVKF	39
U3-TRTX-Cj1c	---CSFSCDIKK-----G-KPCTGAG-----EKKCS--GGWRCKMNFVVKF	35
U3-TRTX-Cj1a	LFECFSFSCDIKK-----NG-KPCKGSG-----EKKCS--GGWRCKMNFVVKV	39
toxin-like	LFECVISCDIEK-----EG-KPCKPKG-----EKECKPKGGWKCKFNFCCLKV	41
toxin-like-RFEC	RFECAISCDIQK-----EG-KPCKPNG-----EKECKAKGGWKCKFNFCVKI	41
Hainantoxin-II-19	LFECVSCEIEK-----EGNKDCKK-----KKCR--GGWKCKFNMCVKV	37
Hainantoxin-II-16	LFECVSCEIEK-----EGNKDCKK-----KKCI--GGWKCKFNMCVKV	37
Hainantoxin-II-3	LFECVSCEIEK-----EGNKDCKK-----KKCK--GGWECKFNMCVKV	37
U1-TRTX-Hh1a	LFECFSFSCIEK-----EGDKPCKP-----KKCK--GGWKCKFNMCVKV	37
HWTX-VIIc-precursor	LFECVISCEIEK-----KG-ESCKP-----KECK--GGWKCKFNMCVKV	36
Consenso	* ..*:*:* * : * * *:* ***.***::*:*.*	

**Figura 8. Alinhamento de μ-TRTX-An1a com toxinas similares.** São mostradas apenas as seqüências dos peptídeos maduros. Alinhamento múltiplo de seqüências foi gerado por meio do *software* ClustalW 2.0.12. Espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento (*Multiple alignment gap penalty*: 5). As notações do consenso, *i.e.*, ‘\*’, ‘.’ e ‘:’, significam que os resíduos em uma dada coluna são idênticos em todas as seqüências, que substituições conservadas foram observadas e que substituições semi-conservadas foram observadas, respectivamente. O número de resíduos em cada seqüência está indicado na coluna à direita. “1” indica resíduos Ile/Leu não diferenciados.

A seqüência da μ-TRTX-An1a apresentou similaridade com aquelas de toxinas oriundas de outras espécies terafosídeas e que pertencem à família da U1-TRTX-Hh1a (anteriormente denominada como huwentoxin-II).

A U1-TRTX-Hh1a ([P82959](#)) consiste em um peptídeo de 37 resíduos de aminoácido, oriundo do veneno da aranha caranguejeira chinesa *Haplopelma huwenum*. Essa toxina é capaz de paralisar baratas por várias horas de maneira reversível, com ED<sub>50</sub> equivalente a 29 ± 12 ηmol.g<sup>-1</sup>. A U1-TRTX-Hh1a também bloqueia a transmissão neuromuscular em preparação de nervo frênico murino isolado, sendo assim uma molécula tóxica para mamíferos e insetos (Shu e Liang, 1999). Dentre seus resíduos incluem-se 6 cisteínas que formam três pontes dissulfeto dispostas conforme o seguinte arranjo: Cys<sub>4</sub>-Cys<sub>18</sub>, Cys<sub>8</sub>-Cys<sub>29</sub> e Cys<sub>23</sub>-Cys<sub>34</sub>. Assim, resulta a incomum conectividade I–III, II–V e IV–VI que contrasta com o padrão predominante nas toxinas terafosídeas (*i.e.*, I–IV, II–V e III–VI) (Shu, Huang *et al.*, 2001). A estrutura tridimensional da U1-TRTX-Hh1a revela duas voltas-β (Cys<sub>4</sub>-Ser<sub>7</sub> e Lys<sub>24</sub>-Trp<sub>27</sub>) e folha-β antiparalela dupla (Trp<sub>27</sub>-Cys<sub>29</sub> e Cys<sub>34</sub>-Lys<sub>36</sub>), sendo que, devido ao seu padrão de pontes dissulfeto, essa toxina não possui o motivo de nó de cisteína (motivo ICK). Diferentemente, essa toxina apresenta o motivo DDH (Shu, Lu *et al.*, 2001; 2002).

Com base na similaridade das estruturas primárias, assumiu-se que outros representantes da família da U1-TRTX-Hh1a também apresentariam o motivo DDH (Escoubas e Rash, 2004; Liao, Cao *et al.*, 2007; Yuan, Jin *et al.*, 2007; Chen, Deng *et al.*, 2008; Corzo, Bernard *et al.*, 2009; Diego-Garcia, Peigneur *et al.*, 2010; Tang, Zhang *et al.*, 2010). De fato, a elucidação da estrutura tridimensional da U1-TRTX-Ba1b por meio de 2D-NMR revelou que essa toxina apresenta conectividade de resíduos de cisteínas consistente com o padrão DDH. No entanto, diferentemente da U1-TRTX-Hh1a, a U1-TRTX-Ba1b apresenta uma folha- $\beta$  antiparalela de três segmentos formados pelos resíduos Lys<sub>15</sub>-Cys<sub>17</sub>, Trp<sub>29</sub>-Lys<sub>32</sub> e Leu<sub>35</sub>-Lys<sub>38</sub>. O primeiro segmento está conectado ao segundo por meio de uma grande volta formada pelos resíduos Pro<sub>19</sub>-Gly<sub>28</sub>, ao passo que o segundo segmento conecta-se ao terceiro por meio de uma volta- $\beta$ . Assim como a U1-TRTX-Hh1a e outros moduladores de canais iônicos, a superfície molecular da U1-TRTX-Ba1b possui intensa anisotropia eletrostática devido a um *cluster* de resíduos básicos formado pelos resíduos K<sub>11</sub>, K<sub>12</sub>, K<sub>15</sub>, R<sub>30</sub>, K<sub>32</sub> e K<sub>34</sub> (Corzo, Bernard *et al.*, 2009). Tais resíduos apresentam alto grau de conservação nas posições correspondentes das toxinas mostradas na Figura 8.

Em relação ao padrão de pontes dissulfeto da toxina U1-TRTX-Bs1a, há informações divergentes na literatura. Apesar da grande similaridade entre a estrutura primária das toxinas U1-TRTX-Bs1a, U1-TRTX-Hh1a e U1-TRTX-Ba1b (Figura 8), foi reportado que a conectividade das pontes dissulfeto da primeira obedece ao padrão I-IV, II-V e III-VI, o qual iguala-se àquele das toxinas com motivo ICK (Kaiser, Griffin *et al.*, 1994; Escoubas e Rash, 2004). Essa informação está registrada também no banco de dados UniprotKB ([P49265.1](#)). Vale notar que a seqüência dessa toxina é idêntica à isoforma da toxina U1-TRTX-Asp1a ([P61509.1](#)), a U1-TRTX-Asp1b, fato que se encontra apontado na entrada referente à U1-TRTX-Bs1a ([AS398](#)) no banco de dados de toxina de aranhas, o AracnoServer (Herzig, Wood *et al.*, 2010). De maneira contrastante, o AracnoServer indica a conectividade I-III, II-V e IV-VI para U1-TRTX-Bs1a com base em sua identidade com U1-TRTX-Asp1b. Esse fato também é re-afirmado em outras referências (Shu, Lu *et al.*, 2002; Diego-Garcia, Peigneur *et al.*, 2010).

Para as moléculas similares à  $\mu$ -TRTX-An1a reportou-se atividade biológica sobre mamíferos ou insetos. Nesse sentido, verificou-se que as toxinas U1-TXTX-Ba1a e U1-TRTX-Ba1b não apresentam toxicidade para camundongos quando injetadas por via intracranial ou intra-peritonal com doses de até 3  $\mu\text{g}\cdot 20\text{ g}^{-1}$  e 20  $\mu\text{g}\cdot 20\text{ g}^{-1}$ , respectivamente. Ademais, ambas não apresentaram antagonismo sobre a condutância de sódio em canais de

inseto (Para/tipE) ou de mamíferos (Nav1.2 and Nav1.5) expressos em ovócitos de *Xenopus laevis*. No entanto, U1-TXTX-Ba1a e U1-TRTX-Ba1b apresentam toxicidade e letalidade sobre grilos *Acheta domestica*, com  $DL_{50}$  equivalente a  $10.8 \pm 1.4 \mu\text{g.g}^{-1}$  e  $9.2 \pm 0.9 \mu\text{g.g}^{-1}$ , respectivamente (Corzo, Bernard *et al.*, 2009). De maneira similar, a U1-TRTX-Asp1a e sua isoforma U1-TRTX-Asp1b injetadas por via intra-abdominal possuem atividade tóxica sobre baratas *P. americana* (Savel-Niemann, 1989).

Sugeriu-se que as toxinas oriundas do gênero *Lasiadora* (*i.e.*, U1-TRTX-Lsp1a, U1-TRTX-Lsp1b, U1-TRTX-Lsp1c, U1-TRTX-Lp1a e U1-TRTX-Lp1b) adotam a conformação DDH, modificada por segmento extra -CKCXDKDNKD- contendo uma ponte dissulfeto adicional (Escoubas, Célérier *et al.*, 1997; Vieira, Moura *et al.*, 2004) (Figura 8). U1-TRTX-Lp1a e U1-TRTX-Lp1b não compartilham a atividade insetotóxica das outras moléculas da família, mas são tóxicas para camundongos (Escoubas, Celerier, Romi-Lebrun *et al.*, 1997). Ademais, foi demonstrado que U1-TRTX-Lsp1b, obtida através de expressão heteróloga, bloqueia canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L em células BC3H1 (Dutra, Sousa *et al.*, 2008). Assim, postulou-se que o segmento -CKCXDKDNKD- atua na seletividade dessas toxinas (Diego-Garcia, Peigneur *et al.*, 2010).

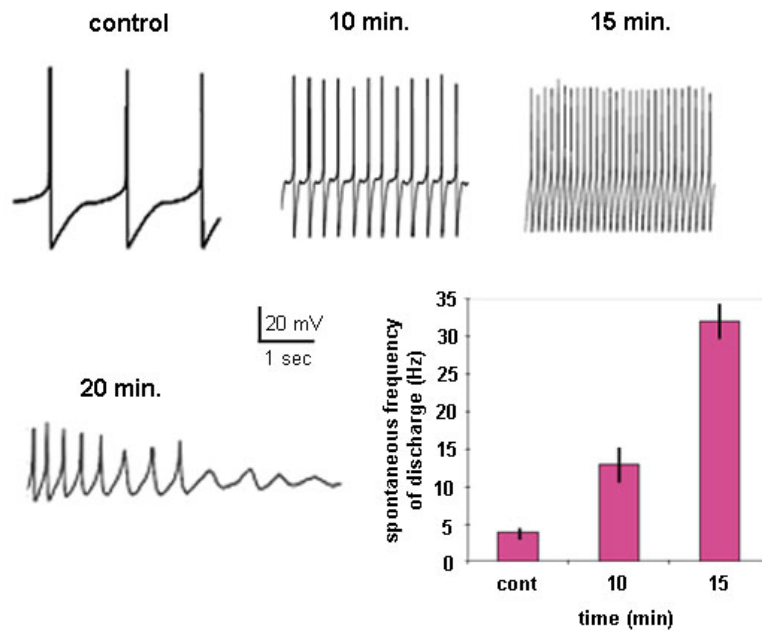
Para as demais toxinas mostradas na Tabela 6, ainda não há estudos descrevendo suas atividades biológicas ou seus alvos moleculares. Entretanto, vale notar que U3-TRTX-Cj1b não possui efeitos sobre correntes iônicas ativadas por voltagem em neurônios de gânglio dorsal de rato (canais de sódio sensíveis e resistentes à tetrodotoxina, de potássio e de cálcio) (Chen, Deng *et al.*, 2008).

Além da presença de regiões conservadas, a análise da Figura 8 revela peculiaridades da estrutura primária da  $\mu$ -TRTX-An1a em relação à seqüência de toxinas similares. Em particular, é evidente a presença de dois segmentos extras formados pelos resíduos Asp<sub>13</sub>-Lys<sub>17</sub> e Asp<sub>27</sub>-Lys<sub>30</sub>. De maneira relevante, nota-se a presença do motivo Lys<sub>12</sub>-Asp<sub>13</sub>-Gly<sub>14</sub> localizado em um longo segmento entre Cys<sub>II</sub> e Cys<sub>III</sub>. Tal fato suscita a hipótese que esse peptídeo poderia apresentar atividade similar às desintegrinas, as quais consistem em uma família de peptídeos presente no veneno de várias víboras, que seletivamente bloqueiam a função de receptores de integrina (Calvete, Marcinkiewicz *et al.*, 2005).

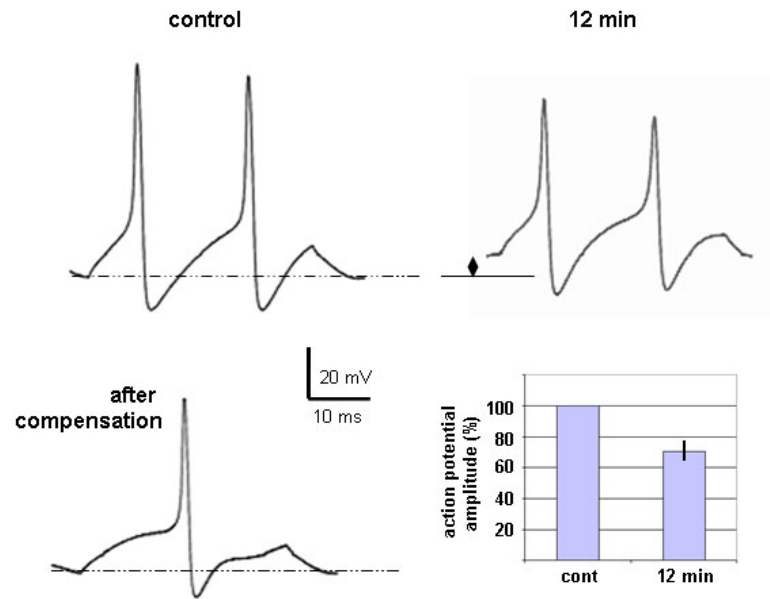
### 3.3.3 Ensaios eletrofisiológicos

Tendo em vista a atividade insetotóxica previamente reportada (Borges, 2008) e sua similaridade com outras toxinas com atividade neurotóxica em insetos, foram avaliados os efeitos da  $\mu$ -TRTX-An1a em neurônios DUM de barata, por técnicas de eletrofisiologia.

Verificou-se que essa toxina (100  $\eta$ M) é capaz de aumentar a frequência de descargas espontâneas nessas células (Figura 9) e de diminuir a amplitude dos potenciais de ação (Figura 10).

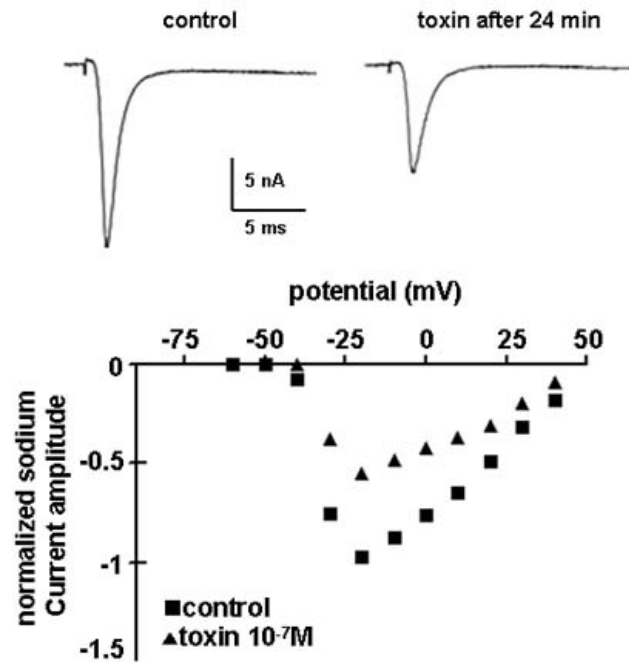


**Figura 9.** Efeitos da toxina  $\mu$ -TRTX-An1a (100  $\eta$ M) isolada do veneno de *Acanthoscurria natalensis* sobre a atividade elétrica espontânea em neurônios dorsais mediais não pareados (DUM) de barata (*Periplaneta americana*) registrados em modo *current-clamp*. Barras: EPM.



**Figura 10.** Efeitos da toxina  $\mu$ -TRTX-An1a (100 nM) isolada do veneno de *Acanthoscurria natalensis* sobre a amplitude do potencial de ação em neurônios dorsais mediais não pareados (DUM) de barata (*Periplaneta americana*) registrados em modo *current-clamp*. Barras: EPM.

A Figura 11 mostra que  $\mu$ -TRTX-An1a (100 nM) é capaz de parcialmente bloquear a corrente  $\text{Na}^+$  nas células de neurônios DUM, diminuindo o valor máximo do perfil  $I$ - $V$ , mas sem alterar a dependência de voltagem. A capacidade de bloquear correntes de sódio pode indicar o mecanismo pelo qual é observada a redução da amplitude do potencial de ação quando essa toxina é aplicada a essa mesma preparação (Figura 10). Nesse sentido, trabalhos anteriores mostram que, mediante a aplicação de 100 nM de saxitoxina (STX) nessa preparação, leva à diminuição gradual da amplitude máxima do potencial de ação espontâneo até que seja completamente abolido (Lapied, Malecot *et al.*, 1989).



**Figura 11.** Painel superior: Efeitos da toxina  $\mu$ -TRTX-An1a ( $100 \text{ nM}$ ) isolada do veneno de *Acanthoscurria natalensis* sobre correntes de influxo de  $\text{Na}^+$  registradas em modo *voltage-clamp* em neurônios dorsais mediais não pareados (DUM) de barata (*Periplaneta americana*). Influxo de  $\text{Na}^+$  foi eliciado por pulso despolarizante de  $-10 \text{ mV}$  com duração de  $30 \text{ ms}$  a partir do potencial de *holding* de  $-90 \text{ mV}$ . Painel inferior: **Comparação da relação corrente-voltagem ( $I$ - $V$ ) das correntes de  $\text{Na}^+$  em neurônios DUM de barata.** Correntes obtidas por meio de pulsos despolarizantes de  $30 \text{ ms}$  de duração, a partir do potencial de *holding* de  $-90 \text{ mV}$ .

A propriedade de simultaneamente provocar um aumento na frequência de descargas espontâneas e diminuir a amplitude dos potenciais de ação indica que a  $\mu$ -TRTX-An1a possui atividade sobre mais de um alvo molecular, sendo assim uma toxina promíscua. Nesse sentido, vale notar que a frequência de descargas nessa preparação é controlada principalmente por corrente de  $\text{K}^+$  do tipo A ( $I_{KA}$ ), corrente de  $\text{Cl}^-$  sensível a  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Cl,Ca}}$ ), corrente de influxo de  $\text{K}^+$  ativadas por despolarização ( $I_H$ ) e corrente transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  ativada em baixa voltagem ( $I_{\text{CatLVA}}$ ). Assim, é possível especular que a  $\mu$ -TRTX-An1a interfira diretamente em uma das correntes supracitadas ou que essa toxina aja de maneira indireta, considerando-se que canais dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular são funcionais ou regulados apenas em uma estreita faixa de concentração desse íon (Raymond e Lapied, 1999; Grolleau e Lapied, 2000).

No presente estudo não possível realizar a investigação da atividade da  $\mu$ -TRTX-An1a sobre outras correntes iônicas e, tampouco, a determinação de uma curva dose-resposta para sua atividade sobre corrente de  $\text{Na}^+$  dependente de voltagem. Tal fato deveu-se à limitada quantidade de toxina disponível. Assim, esses pontos provocam interesse como perspectivas para a continuação desta pesquisa.

### 3.4 Conclusão

No presente estudo, a determinação da estrutura primária completa da  $\mu$ -TRTX-An1a foi possibilitada pela utilização de seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman automatizada e espectrometria de massa *in tandem* (LTQ-Orbitrap), demonstrando a complementaridade dessas técnicas.

A busca em banco de dados revelou a similaridade da  $\mu$ -TRTX-An1a com toxinas terafosídeas que possuem o incomum motivo DDH. Ademais, destacou-se que essa toxina possui o motivo de desintegrina KGD. Assim, como próximos passos nas elaborações futuras deste estudo, sugere-se a confirmação da conectividade de suas pontes dissulfeto e a avaliação da sua potencial atividade de desintegrina.

Os ensaios eletrofisiológicos em neurônios DUM de *P. americana* revelaram que a  $\mu$ -TRTX-An1a provoca aumento na frequência de descargas espontâneas e diminuição da amplitude do potencial de ação. O último efeito pode ser atribuído ao antagonismo da  $\mu$ -TRTX-An1a observado sobre de correntes de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem. Ainda que  $\mu$ -TRTX-An1a possa ser uma toxina promíscua com alvos ainda não identificados, reporta-se pela primeira vez um alvo molecular de uma toxina de uma família da U1-TRTX-Hh1a em insetos.

Dessa forma, além de ser o primeiro passo na descrição da biodiversidade molecular do veneno de aranhas do gênero *Acanthoscurria*, o presente estudo constitui-se como uma relevante contribuição para a caracterização da estrutura e função de um representante da família da U1-TRTX-Hh1a.



## 4 Conclusão global

Como discutido anteriormente, os venenos são inovações chave em várias linhagens animais e encerram um arsenal de moléculas peptídicas (Fry, Roelants *et al.*, 2009). A identificação sistemática de seus componentes, seja pelo seqüenciamento direto (*e.g.*, Edman ou MS/MS) ou indireto (*e.g.*, determinação de transcriptomas das glândulas de veneno) objetivam a catalogação completa da diversidade molecular dessas secreções biológicas. Por meio da consecução desse objetivo espera-se obter informações sobre a evolução desses sistemas e sobre os mecanismos pelos quais os venenos efetuam sua função antagônica sobre outros organismos. Ademais, espera-se a descoberta de novas moléculas que possam ser exploradas para estudar outros fenômenos biológicos em nível fisiológico ou que sirvam para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos ou biotecnológicos (Rodriguez De La Vega, Schwartz *et al.*, 2010).

Ainda que a diversidade peptídica dos venenos represente um grande horizonte para a busca das informações supracitadas, a compreensão desse universo molecular ainda é desafiadora. Por exemplo, a presença de centenas de entidades peptídicas foi reportada no veneno de *T. serrulatus* (Pimenta, Stocklin *et al.*, 2001a; Nascimento, Rates *et al.*, 2006). No presente estudo (APÊNDICE B), a avaliação sistemática de peptídeos do veneno dessa espécie de escorpião mostrou que muitas das moléculas identificadas são fragmentos ou formas truncadas de toxinas maiores. Embora o seu significado biológico ainda seja elusivo, os resultados dos estudos de minimização das hipotensinas (Verano-Braga, Rocha-Resende *et al.*, 2008; Verano-Braga, De Lima *et al.*, 2009; Verano-Braga, Figueiredo-Rezende *et al.*, 2010), discutidos no APÊNDICE A e APÊNDICE B, são uma indicação da relevância desses fragmentos para a diversificação de alvos moleculares das toxinas do veneno. De maneira similar, a presença de formas truncadas da bradicinina e de peptídeos relacionados em *P. jandaia* (APÊNDICE C) pode estar relacionada a modulações de sua afinidade por diferentes subtipos de receptores (Regoli, Jukic *et al.*, 1993). Assim, mesmo que certos fragmentos ou formas truncadas sejam apenas o resultado da degradação natural (Magalhaes, Melo *et al.*, 2008) ou arte fatual de peptídeos maduros, os exemplos acima caracterizam esses variantes como uma fronteira da diversidade molecular de venenos pouco explorada no campo da toxinologia.

Este estudo, além revelar novas famílias peptídicas, identificou numerosos variantes (isoformas) de famílias moleculares já conhecidas. Assim, a extensão do conhecimento desse repertório peptídico pode assistir futuras investigações sobre relações entre estrutura e função e que visem o desenvolvimento de aplicações terapêuticas ou biotecnológica dessas moléculas naturais. Não obstante, nota-se que nos venenos dos três organismos estudados ainda resta um expressivo número de moléculas ainda não caracterizadas.

A natureza das moléculas investigadas neste estudo é favorável à síntese química em fase sólida. Isso possibilita a obtenção de material para futuros estudos sobre sua atividade biológica, sem a necessidade de purificação de grandes quantidades de peptídeos nativos.

Finalmente, é mister destacar o fundamental papel desempenhado pelas técnicas de espectrometria de massa para a elucidação da estrutura primária dos peptídeos identificados neste estudo. Graças à sensibilidade, precisão, resolução e à habilidade da espectrometria de massa de lidar com amostras complexas foram reveladas informações que não seriam acessíveis por outras estratégias. No entanto, devem ser reconhecidas as limitações dessa técnica, relacionadas principalmente a dificuldades na interpretação *de novo* e à diferenciação de resíduos isobáricos, e a sua complementaridade com o seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman.

## 5 Referências

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* [S.I.], v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.
- AITKEN, A.; LEARMONTH, M. Carboxymethylation of Cysteine Using Iodoacetamide/Iodoacetic Acid. In: WALKER, J. M. (Ed.). *The Protein Protocols Handbook*. Totowa: Humana Press, 2002. Cap.59. p. 455-456.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 25, n. 17, p. 3389-402, 1997.
- BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. *Emerg Med (Fremantle)* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 28-36, 2001.
- BARBOSA, F. M. *et al.* Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole. *FEMS Microbiol Lett* [S.I.], v. 274, n. 2, p. 279-86, 2007.
- BARNES, R. D. *Zoologia dos Invertebrados*. 4. ed. São Paulo: Livraria Roca, 1993.
- BERKOV, A. *et al.* Convergent evolution in the antennae of a cerambycid beetle, *Onychocerus albitarsis*, and the sting of a scorpion. *Naturwissenschaften* [S.I.], v. 95, n. 3, p. 257-61, 2008.
- BIEMANN, K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed Environ Mass Spectrom* [S.I.], v. 16, n. 1-12, p. 99-111, 1988.
- BOEVE, J. L. *et al.* Quantity and quality of venom released by a spider (*Cupiennius salei*, Ctenidae). *Toxicon* [S.I.], v. 33, n. 10, p. 1347-57, 1995.
- BONTEMS, F. *et al.* Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science* [S.I.], v. 254, n. 5037, p. 1521-3, 1991.
- BORGES, C. L. S. *Purificação e caracterização parciais da peçonha da aranha Acanthoscurria natalensis, aranha caranguejeira do semi-árido baiano*. (2008). (Mestrado em Biotecnologia) - ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2008.
- BOSMANS, F. *et al.* Spider venom peptides as leads for drug and insecticide design. In: DE LIMA, M. E. *et al.* (Ed.). *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: UFMG, 2009. p. 269-291.
- BRAND, G. D. *et al.* Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* [S.I.], v. 27, n. 9, p. 2137-46, 2006.

- \_\_\_\_\_. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 347, n. 3, p. 739-46, 2006.
- CALVETE, J. J. *et al.* Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* [S.I.], v. 45, n. 8, p. 1063-74, 2005.
- CAPRIOLI, R. M. *et al.* Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* [S.I.], v. 69, n. 23, p. 4751-60, 1997.
- CHAURAND, P. *et al.* Profiling and imaging proteins in tissue sections by MS. *Anal Chem* [S.I.], v. 76, n. 5, p. 87A-93A, 2004.
- CHEN, J. *et al.* Molecular diversity and evolution of cystine knot toxins of the tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Cell Mol Life Sci* [S.I.], v. 65, n. 15, p. 2431-44, 2008.
- CISCOTTO, P. H. *et al.* Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J Proteomics* [S.I.], v. 74, n. 9, p. 1810-25.
- CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol Rev Camb Philos Soc* [S.I.], v. 72, n. 3, p. 365-79, 1997.
- CORZO, G. *et al.* Insecticidal peptides from the therapsid spider *Brachypelma albiceps*: an NMR-based model of Ba2. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1794, n. 8, p. 1190-6, 2009.
- CREER, S. *et al.* Assessing the phylogenetic utility of four mitochondrial genes and a nuclear intron in the asian pit viper genus, *Trimeresurus*: separate, simultaneous, and conditional data combination analyses. *Mol Biol Evol* [S.I.], v. 20, n. 8, p. 1240-51, 2003.
- DA VEIGA, A. B. G. *et al.* *Lonomia obliqua* venom: Pharmaco-toxicological effects and biotechnological perspectives. In: DE LIMA, M. E. *et al.* (Ed.). *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: UFMG, 2009. p. 371-392.
- DE LIMA, M. E. *et al.* Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* [S.I.], v. 146, n. 1-2, p. 264-79, 2007.
- DIEGO-GARCIA, E. *et al.* Venom components from *Citharischius crawshayi* spider (Family Theraphosidae): exploring transcriptome, venomics, and function. *Cell Mol Life Sci* [S.I.], v. 67, n. 16, p. 2799-813, 2010.
- DUBOSCQ, O. Recherches sur les Chilopodes. *Archives de Zoologie Experimentale et Générale* [S.I.], v. 6, n. 3, p. 481-650, 1898.
- DUTRA, A. A. *et al.* Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiadora* sp. effecting on calcium channels. *Peptides* [S.I.], 2008.
- EDMAN, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem* [S.I.], v. 22, n. 3, p. 475, 1949.

ENG, J. K. *et al.* An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein databas. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* [S.I.], v. 5, n. 11, p. 976-989, 1994.

ESCOUBAS, P. Mass spectrometry in toxinology: a 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms. *Toxicon* [S.I.], v. 47, n. 6, p. 609-13, 2006.

ESCOUBAS, P. *et al.* High-performance liquid chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide fingerprinting of tarantula venoms in the genus *Brachypelma*: chemotaxonomic and biochemical applications. *Rapid Commun Mass Spectrom* [S.I.], v. 11, n. 17, p. 1891-9, 1997.

\_\_\_\_\_. Two novel peptide neurotoxins from the venom on the tarantula *Lasiodora parahybana*. *Toxicon* [S.I.], v. 35, n. 6, p. 806-806, 1997.

\_\_\_\_\_. Two novel peptide neurotoxins from the venom on the tarantula *Lasiodora parahybana*. *Toxicon* [S.I.], v. 35, n. 6, p. 805-806, 1997.

\_\_\_\_\_. A comparison of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry methods for the analysis of crude tarantula venoms in the *Pterinochilus* group. *Rapid Commun Mass Spectrom* [S.I.], v. 13, n. 18, p. 1861-8, 1999.

\_\_\_\_\_. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms. *Rapid Commun Mass Spectrom* [S.I.], v. 16, n. 5, p. 403-13, 2002.

\_\_\_\_\_. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie* [S.I.], v. 82, n. 9-10, p. 893-907, 2000.

ESCOUBAS, P.; RASH, L. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon* [S.I.], v. 43, n. 5, p. 555-74, 2004.

ESCOUBAS, P. *et al.* Multidimensional peptide fingerprinting by high performance liquid chromatography, capillary zone electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of tarantula venom samples. v. 12. n. 161998. p. 1075-1084.

FAVREAU, P. *et al.* Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: case applications with single arthropod specimen. *Toxicon* [S.I.], v. 47, n. 6, p. 676-87, 2006.

FAZIO, M. A. *et al.* Biological and structural characterization of new linear gomesin analogues with improved therapeutic indices. *Biopolymers* [S.I.], v. 88, n. 3, p. 386-400, 2007.

\_\_\_\_\_. Structure-activity relationship studies of gomesin: importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. *Biopolymers* [S.I.], v. 84, n. 2, p. 205-18, 2006.

FIGUEIREDO, S. G. *et al.* Venomous fish: a brief overview. In: DE LIMA, M. E. *et al* (Ed.). *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: UFMG, 2009. p. 73-98.

FOURNIER, I. *et al.* Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *Neuro Endocrinol Lett* [S.I.], v. 24, n. 1-2, p. 9-14, 2003.

FRY, B. G. *et al.* The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [S.I.], v. 10, p. 483-511, 2009.

\_\_\_\_\_. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Mol Cell Proteomics* [S.I.], v. 7, n. 2, p. 215-46, 2008.

\_\_\_\_\_. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* [S.I.], v. 439, n. 7076, p. 584-8, 2006.

\_\_\_\_\_. Electrospray liquid chromatography/mass spectrometry fingerprinting of *Acanthophis* (death adder) venoms: taxonomic and toxinological implications. *Rapid Commun Mass Spectrom* [S.I.], v. 16, n. 6, p. 600-8, 2002.

\_\_\_\_\_. Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxinological implications. *Rapid Commun Mass Spectrom* [S.I.], v. 17, n. 18, p. 2047-62, 2003.

GASKELL, S. J. Electrospray: Principles and Practice. *J. Mass Spectrom.* [S.I.], v. 32, n. 7, p. 677-688, 1997.

GILLOTT, C. *Entomology*. 3. ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2005.

GROLLEAU, F.; LAPIED, B. Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J Exp Biol* [S.I.], v. 203, n. Pt 11, p. 1633-48, 2000.

GROSS, G. *et al.* The three-fingered toxins (TFTs). In: DE LIMA, M. E. *et al* (Ed.). *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: UFMG, 2009. p. 423-448.

GROSS, J. H. *Mass spectrometry: a textbook*. 2. ed. Heidelberg Dordrecht London New York: Springer, 2011.

GUERCIO, R. A. *et al.* Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci* [S.I.], v. 4, n. 1, p. 11, 2006.

HAMILL, O. P. *et al.* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* [S.I.], v. 391, n. 2, p. 85-100, 1981.

HARVEY, A. L. Snake venom peptides. In: KASTIN, J. A. (Ed.). *Handbook of biologically active peptides*. Burlington: Academic Press, 2006. Cap.52. p. 355-362.

HEDIN, M.; BOND, J. E. Molecular phylogenetics of the spider infraorder Mygalomorphae using nuclear rRNA genes (18S and 28S): conflict and agreement with the current system of classification. *Mol Phylogenet Evol* [S.I.], v. 41, n. 2, p. 454-71, 2006.

HERMANN, H. R. Sting autotomy, a defense mechanism in certain social Hymenoptera. *Insectes Sociaux* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 111-120, 1971.

HERZIG, V. *et al.* ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 39, n. Database issue, p. D653-7, 2010.

HUNT, D. F. *et al.* Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 83, n. 17, p. 6233-7, 1986.

ISBISTER, G. K.; GRAY, M. R. Bites by Australian mygalomorph spiders (Araneae, Mygalomorphae), including funnel-web spiders (Atracinae) and mouse spiders (Actinopodidae: Missulena spp). *Toxicon* [S.I.], v. 43, n. 2, p. 133-40, 2004.

ISBISTER, G. K. *et al.* Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. *Toxicon* [S.I.], v. 41, n. 4, p. 519-24, 2003.

JAKUBOWSKI, J. A. *et al.* Determining sequences and post-translational modifications of novel conotoxins in *Conus victoriae* using cDNA sequencing and mass spectrometry. *J Mass Spectrom* [S.I.], v. 39, n. 5, p. 548-57, 2004.

JAMES, P. E. *Proteome research: Mass spectrometry*. Berlin: Springer, 2001. (Principles and practice).

JIANG, L. *et al.* Molecular diversification based on analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*. *Toxicon* [S.I.], v. 51, n. 8, p. 1479-89, 2008.

JOHNSON, R. S. *et al.* Collision-induced fragmentation of (M + H)<sup>+</sup> ions of peptides. Side chain specific sequence ions. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* [S.I.], v. 86, n. 1, p. 137-154, 1988.

\_\_\_\_\_. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal Chem* [S.I.], v. 59, n. 21, p. 2621-5, 1987.

KAISER, II *et al.* Primary structures of two proteins from the venom of the Mexican red knee tarantula (*Brachypelma smithii*). *Toxicon* [S.I.], v. 32, n. 9, p. 1083-93, 1994.

KING, G. F. *et al.* A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* [S.I.], v. 52, n. 2, p. 264-76, 2008.

KOBAYASHI, Y. *et al.* The cystine-stabilized alpha-helix: a common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolymers* [S.I.], v. 31, n. 10, p. 1213-20, 1991.

- LAPIED, B. *et al.* Ionic Species Involved in the Electrical Activity of Single Adult Aminergic Neurones Isolated from the Sixth Abdominal Ganglion of the Cockroach *Periplaneta Americana*. v. 144. n. 11989. p. 535-549.
- LARKIN, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* [S.I.], v. 23, n. 21, p. 2947-8, 2007.
- LEGROS, C. *et al.* Nanospray analysis of the venom of the tarantula *Theraphosa leblondi*: a powerful method for direct venom mass fingerprinting and toxin sequencing. *Rapid Commun Mass Spectrom* [S.I.], v. 18, n. 10, p. 1024-32, 2004.
- LEWIS, J. G. E. *The biology of centipedes*. Cambridge: Cambridge University Press, 1981.
- LIAO, Z. *et al.* Proteomic and peptidomic analysis of the venom from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Proteomics* [S.I.], v. 7, n. 11, p. 1892-907, 2007.
- LIEBLER, D. C. *Introduction to Proteomics - Tools for the New Biology*. Totowa, NJ: Humana press, 2002.
- LORENZINI, D. M. *et al.* Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev Comp Immunol* [S.I.], v. 27, n. 9, p. 781-91, 2003.
- \_\_\_\_\_. Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an antimicrobial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Insect Biochem Mol Biol* [S.I.], v. 33, n. 10, p. 1011-6, 2003.
- LUCAS, S. M. *et al.* Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of Sao Paulo, Brazil. *Toxicon* [S.I.], v. 32, n. 10, p. 1211-5, 1994.
- \_\_\_\_\_. Redescription and new distribution records of *Acanthoscurria natalensis* (Araneae: Mygalomorphae: Theraphosidae). *Zoologia* [S.I.], v. 28, n. 4, p. 525-530, 2011.
- MAGALHAES, B. S. *et al.* Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 377, n. 4, p. 1057-61, 2008.
- MANN, M.; WILM, M. Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal Chem* [S.I.], v. 66, n. 24, p. 4390-9, 1994.
- MENEZ, A. *et al.* 'Venomics' or : The venomous systems genome project. *Toxicon* [S.I.], v. 47, n. 3, p. 255-9, 2006.
- MENEZES, M. C. *et al.* Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* [S.I.], v. 47, n. 3, p. 304-12, 2006.
- MIRANDA, A. *et al.* Gomesin. A powerful antimicrobial peptide isolated from the Brazilian tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. In: DE LIMA, M. E. *et al.* (Ed.). *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: UFMG, 2009. p. 227-247.



- MOREIRA, C. K. *et al.* Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium* spp. *Exp Parasitol* [S.I.], v. 116, n. 4, p. 346-53, 2007.
- MUJEZINOVIC, N. *et al.* Cleaning of raw peptide MS/MS spectra: improved protein identification following deconvolution of multiply charged peaks, isotope clusters, and removal of background noise. *Proteomics* [S.I.], v. 6, n. 19, p. 5117-31, 2006.
- NASCIMENTO, D. G. *et al.* Moving pieces in a taxonomic puzzle: venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon* [S.I.], v. 47, n. 6, p. 628-39, 2006.
- NELSON, L. D.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. ed.: W. H. Freeman, 2004.
- NUNES, K. P. *et al.* Animal toxins as potential pharmacological tools for treatment of erectile dysfunction. In: DE LIMA, M. E. *et al.* (Ed.). *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: UFMG, 2009. p. 313-322.
- OLIVERA, B. *et al.* Peptide toxins from the venoms of cone snails and other toxoglossan gastropods. In: DE LIMA, M. E. *et al.* (Ed.). *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: UFMG, 2009. p. 25-48.
- PAPAYANNOPOULOS, I. A. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrometry Reviews* [S.I.], v. 14, n. 1, p. 49-73, 1995.
- PEREIRA, L. S. *et al.* Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 352, n. 4, p. 953-9, 2007.
- PÉREZ-MILES, F. *et al.* Systematic revision and cladistic analysis of Theraphosinae (Araneae: Theraphosidae). *Mygalomorph* [S.I.], v. 1, p. 33-68, 1996.
- PERKINS, D. N. *et al.* Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* [S.I.], v. 20, n. 18, p. 3551-3567, 1999.
- PIMENTA, A. M.; DE LIMA, M. E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *J Pept Sci* [S.I.], v. 11, p. 670-676, 2005.
- PIMENTA, A. M. *et al.* Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* [S.I.], v. 17, n. 5, p. 413-8, 2003.
- \_\_\_\_\_. Electrospray ionization quadrupole time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometric analyses to solve micro-heterogeneity in post-translationally modified peptides from *Phoneutria nigriventer* (Aranea, Ctenidae) venom. *Rapid Commun Mass Spectrom* [S.I.], v. 19, n. 1, p. 31-7, 2005.

\_\_\_\_\_. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun Mass Spectrom* [S.I.], v. 15, n. 17, p. 1562-72, 2001a.

\_\_\_\_\_. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [S.I.], v. 15, n. 17, p. 1562-72, 2001b.

PLATNICK, N. I. The World Spider Catalog, Version 12.0. American Museum of Natural History, 2011.

POSSANI, L. D.; DE LA VEGA, R. C. Scorpion venom peptides. In: KASTIN, J. A. (Ed.). *Handbook of biologically active peptides*. Burlington: Academic Press, 2006. Cap.51. p. 339-354.

RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* [S.I.], v. 40, n. 3, p. 225-54, 2002.

RATES, B. *et al.* Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha): shedding light on venoms from a neglected group. *Toxicon* [S.I.], v. 49, n. 6, p. 810-26, 2007.

\_\_\_\_\_. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. *Toxicon* [S.I.], v. 52, n. 5, p. 611-618, 2008.

\_\_\_\_\_. Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). *Toxicon* [S.I.], v. 57, n. 1, p. 35-52, 2011.

RAYMOND, V.; LAPIED, B. Hyperpolarization-activated inward potassium and calcium-sensitive chloride currents in beating pacemaker insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Neuroscience* [S.I.], v. 93, n. 3, p. 1207-18, 1999.

REDEKER, V. *et al.* Combination of peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and immunodetection on single glands or cells. *Anal Chem* [S.I.], v. 70, n. 9, p. 1805-11, 1998.

REGOLI, D. *et al.* Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. *Can J Physiol Pharmacol* [S.I.], v. 71, n. 8, p. 556-67, 1993.

REID, G. E.; MCLUCKEY, S. A. 'Top down' protein characterization via tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* [S.I.], v. 37, n. 7, p. 663-75, 2002.

REMUZGO, C. *et al.* Acanthoscurrin fragment 101-132: Total synthesis at 60 degrees C of a novel difficult sequence. *Biopolymers* [S.I.], 2008.

REZENDE JUNIOR, L. *et al.* Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* [S.I.], v. 29, n. 10, p. 1225-33, 1991.

RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C. *et al.* Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* [S.I.], v. 56, n. 7, p. 1155-61, 2010.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* [S.I.], v. 11, n. 11, p. 601, 1984.

RUBAKHIN, S. S. *et al.* Spatial profiling with MALDI MS: distribution of neuropeptides within single neurons. *Anal Chem* [S.I.], v. 75, n. 20, p. 5374-80, 2003.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. *Zoologia dos invertebrados*. 6. ed. São Paulo, Brasil: Rocca, 1994.

SAVEL-NIEMANN, A. Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multicomponent system. *Biol Chem Hoppe Seyler* [S.I.], v. 370, n. 5, p. 485-98, 1989.

SCHMIDT, G. Efficacy of bites from Asiatic and African tarantulas. *Trop Med Parasitol* [S.I.], v. 40, n. 2, p. 114, 1989.

SEWALD, N.; JAKUBKE, H. *Peptides: Chemistry and Biology*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2002.

SHU, Q. *et al.* Assignment of the disulfide bonds of huwentoxin-II by Edman degradation sequencing and stepwise thiol modification. *Eur J Biochem* [S.I.], v. 268, n. 8, p. 2301-7, 2001.

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* [S.I.], v. 53, n. 5, p. 486-91, 1999.

SHU, Q. *et al.* Sequence-specific Assignment of <sup>1</sup>H-NMR Resonance and Determination of the Secondary Structure of HWTX-II. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* [S.I.], v. 33, n. 1, p. 65-70, 2001.

\_\_\_\_\_. The structure of spider toxin huwentoxin-II with unique disulfide linkage: evidence for structural evolution. *Protein Sci* [S.I.], v. 11, n. 2, p. 245-52, 2002.

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

SLENO, L.; VOLMER, D. A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* [S.I.], v. 39, n. 10, p. 1091-112, 2004.

SMITH, W. L.; WHEELER, W. C. Venom evolution widespread in fishes: a phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. *J Hered* [S.I.], v. 97, n. 3, p. 206-17, 2006.

SOUZA, B. M.; PALMA, M. S. Peptides from hymenoptera venoms: biochemistry, pharmacology and potential applications in health. In: DE LIMA, M. E. *et al* (Ed.). *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: UFMG, 2009. p. 345-370.

STANDING, K. G. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. *Curr Opin Struct Biol* [S.I.], v. 13, n. 5, p. 595-601, 2003.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

STOCKLIN, R. *et al.* Identification of snake species by toxin mass fingerprinting of their venoms. *Methods Mol Biol* [S.I.], v. 146, p. 317-35, 2000.

SUCKAU, D. *et al.* A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* [S.I.], v. 376, n. 7, p. 952-65, 2003.

TANG, X. *et al.* Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses. *J Proteome Res* [S.I.], v. 9, n. 5, p. 2550-64, 2010.

THOMPSON, J. D. *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 22, n. 22, p. 4673-80, 1994.

VERANO-BRAGA, T. *et al.* From bradykinin-potentiating peptides to Hypotensins: More than four decades of research. In: DE LIMA, M. E. *et al.* (Ed.). *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2009. p. 235-247.

\_\_\_\_\_. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B(2) kinin receptor. *Toxicon* [S.I.], v. 56, n. 7, p. 1162-71, 2010.

\_\_\_\_\_. *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 371, n. 3, p. 515-20, 2008.

VIEIRA, A. L. *et al.* Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiadora* sp. *Toxicon* [S.I.], v. 44, n. 8, p. 949-52, 2004.

VONK, F. J. *et al.* Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature* [S.I.], v. 454, n. 7204, p. 630-3, 2008.

WADDELL, W. J. A simple UV spectrophotometric method for the determination of protein. *J. Lab. Clin. Med.* [S.I.], v. 48, p. 311 – 314., 1956.

WHITTINGTON, C. M. *et al.* Understanding and utilising mammalian venom via a platypus venom transcriptome. *J Proteomics* [S.I.], v. 72, n. 2, p. 155-64, 2009.

WISNIEWSKI, J. R. *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* [S.I.], v. 6, n. 5, p. 359-62, 2009.

YUAN, C. *et al.* Proteomic and peptidomic characterization of the venom from the Chinese bird spider, *Ornithoctonus huwena* Wang. *J Proteome Res* [S.I.], v. 6, n. 7, p. 2792-801, 2007.

## **APÊNDICE A** - From the stretcher to the pharmacy's shelf: drug leads from medically important Brazilian venomous arachnid species

RATES, B. *et al.* From the stretcher to the pharmacy's shelf: drug leads from medically important Brazilian venomous arachnid species. *Inflammation & Allergy - Drug Targets* [S.I.], v. 10, n. 4, p. 410-9, 2011.

# From the Stretcher to the Pharmacy's Shelf: Drug Leads from Medically Important Brazilian Venomous Arachnid Species

Breno Rates<sup>1</sup>, Thiago Verano-Braga<sup>1</sup>, Daniel Moreira Santos<sup>1</sup>, Kênia Pedrosa Nunes<sup>1,2</sup>, Adriano M.C. Pimenta<sup>1</sup> and Maria Elena De Lima<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, Brazil

<sup>2</sup>School of Medicine, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA

**Abstract:** Accidents involving venomous animals have always caught the attention of mankind due to their lethality and other clinical implications. However, since the molecules obtained from animal venoms have been the product of millions of years of evolutionary process, toxins could be used to probe physiological mechanisms and could serve as leads for drug development. The present work reviews the state of the art pertaining to venom molecules from Brazilian medically important arachnid species bearing potential biotechnological applications. Special focus is given to toxins isolated from the scorpion *Tityus serrulatus* and the spiders *Phoneutria nigriventer* and *Lycosa erythrognatha*, whose venoms possess molecules acting as erectile function modulators and as antihypertensive, analgesic, neuroprotective and antimicrobial agents.

**Keywords:** Drug development, *Tityus serrulatus*, *Phoneutria nigriventer*, *Lycosa erythrognatha*.

## 1. INTRODUCTION

Historically, venomous animals were always associated with mythological figures that represented the trickiest or the main untreatable character of human beings. The first steps toward the scientific knowledge of antivenom production and the understanding of the “why” these animals possess strong substances and “how” these substances could be used to subdue preys and in the defense against predators appeared scarcely in the second half of the 19<sup>th</sup> century and in the first half of the 20<sup>th</sup> century [1, 2]. It was only after the 1950's that the biochemical composition of these venoms, along with attempts to isolate the molecules responsible for the observed clinical effects, has started to be revealed and populate the researchers' handbooks and scientific journals.

As soon as venoms have started unveiling their secrets, toxinologists realized that the molecules obtained from animal venoms, in fact, had been selected by millions of years of evolutionary process in order to impair the physiological functioning of their victims – both preys and predators. And hence, such molecules could be used to probe physiological mechanisms, such as homeostasis and neurotransmission [3-9].

Along this way, from the very beginning of toxinology to our days, some examples can be selected to illustrate notable uses of such molecules, not only to elicit deleterious effects, but mainly to depict their successful biotechnological use as drug leads or as active principles by themselves. Among such examples is the use of bradykinin

potentiating peptides (BPPs) extracted from the *Bothrops jararaca* venom in order to develop Captopril<sup>®</sup>, one of the most successful examples of blockbuster drug, used as an Angiotensin Converting Enzyme inhibitor (ACEi).

The following sections review the state of the art pertaining to molecules from the venom of Brazilian medically important arachnid species bearing potential biotechnological applications. Special focus is given to toxins isolated from the scorpion *Tityus serrulatus* and the spiders *Lycosa erythrognatha* and *Phoneutria nigriventer*. Such discussions highlight current efforts for characterizing the biological properties of such molecules.

## 2. HYPOTENSIVE PEPTIDES AS ANTIHYPERTENSIVE DRUG LEADS

Cardiovascular disorders are the main causes of human deaths in modern life. Among such disorders, hypertension is particularly harmful, since it raises the risk of stroke and heart attack, although usually asymptomatic. By the year 2025, approximately 30% of human population (about 1.56 billion people) is estimated to suffer from hypertension [10]. For this, although several antihypertensive agents are currently traded, including *inter alia* angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi), angiotensin II receptor antagonists,  $\alpha$  and  $\beta$ -blockers, diuretic agents and calcium channel blockers, there is a great interest in developing new drugs for hypertension [11].

A number of toxins - isolated from different venom sources - act in the cardiovascular system. Among these, bradykinin-potentiating peptides (BPPs), which are low molecular weight peptides able to enhance the hypotensive activity of bradykinin (BK), an endogenous peptide involved in the control of blood pressure [12, 13], can be mentioned. BPPs usually inhibit the angiotensin-converting enzyme (ACE), which plays an important role in the regulation of

\*Address correspondence to this author at the Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Bloco O4, Sala 125, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627. CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil; Tel: +55 31 3409 2659; Fax: +55 31 3409 2614; E-mail: melenalima@icb.ufmg.br

blood pressure [14]. For instance, as previously mentioned, BPPs from the venom of the Brazilian viper *Bothrops jararaca* lead to the development of Captopril<sup>®</sup>, the first commercial ACEI, currently used for treating hypertension [15-17]. This has prompted the interest in the search of new BPPs in different organisms such as snakes [18-22], spiders, scorpions and other arthropods [4, 23-27].

Our group has recently described the so-called Hypotensins (TsHpt) (Table 1), a novel family of BPPs present in the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. These cysteine-devoid peptides display a random-coiled structure as indicated by circular dichroism and 2D-RMN experiments. The presence of two proline residues at their C-terminal portion, in similar fashion to the 'classical' BPPs [5, 27] is noteworthy. Regarding pharmacological activity, besides potentiating BK, the peptide TsHpt-I induces a transient BK-independent hypotension in rats, as well as a NO-dependent vasodilatation in aortic ring preparations [27]. Differently from all known BPPs, TsHpt-I acts as an agonist of the BK receptor B<sub>2</sub>R [28] and does not inhibit ACE [27]. Structure minimization studies of TsHpt-I [28], consisting in the solid-phase synthesis of a series of C-terminal truncated analogues and the evaluation of their pharmacological effects (summarized in Table 1) have demonstrated that the tripeptide Lys-Pro-Pro is able to reproduce all vascular effects of the 25 amino acid-long native TsHpt-I. Yet, the transient BK-independent hypotension was effectively reproduced by the dipeptide Lys-Pro whereas BK potentiation of hypotensive effects were reproduced by the dipeptide Pro-Pro. The basic Lys residue in the Lys-Pro and Lys-Pro-Pro analogues has been shown to be crucial for the interaction with B<sub>2</sub>R, which induces the synthesis and release of NO ultimately leading to vasodilatation.

Despite the fact that these results indicate the mechanism of the transient BK-independent hypotension caused by TsHpt-I, the mechanism by which it promotes potentiation of the hypotensive effects of BK remains elusive. Until

recently, it was widely accepted that the mode of action of the BPPs was solely attributed to ACE inhibition. However, the molecular mechanisms of BK potentiation appear to be more complex than previously suspected, since there is a growing number of BPPs which do not act as ACE inhibitors as reported [18, 27, 29]. So far, attempts to model this 'alternative' BK-potentiating pathway have been unfruitful and rather speculative. Even ACE-inhibiting BPPs seem to have complex mechanisms, possibly encompassing a cross-talk between ACE and B<sub>2</sub>R [30, 31].

Moreover, the relationship between the pharmacological features and the mode of action of different bradykinin potentiating molecules and some of their analogues also appears to be intricate. Some of the observed correlations can be classified as follows: i) anti-hypertensive effect clearly associated to BK potentiation and ACE inhibition, (BPP9a – Table 2); ii) anti-hypertensive effect without BK-potentiating activity and ACE inhibition (BPP7a – Table 2); iii) potentiation of BK without anti-hypertensive effect (Captopril<sup>®</sup> in low doses); iv) vasodilation without ACE inhibitor activity (lisinopril); and v) anti-hypertensive effect with BK-potentiation and action in B<sub>2</sub>R without inhibit ACE (TsHpts – Table 2) [5, 27].

Although further work is required for a complete elucidation of the TsHpt and TsHpt-analogues modes of action, this family embodies a significant potential for leading to the development of new anti-hypertensive drugs. Moreover, the fact that tri- and dipeptides are able to reproduce pharmacological effects of the native peptide is advantageous in a biotechnological perspective, since it may represent reduced production costs, as well as an easier absorption by the digestive mucosa.

### 3. VENOM K<sup>+</sup> CHANNEL BLOCKERS AND IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY

Similarly to other scorpions, the molecular gamut of *Tityus serrulatus*' venom includes the 30 - 42 residue-long

**Table 1. Biochemical and Biological Features of TsHpt-I and its Synthetic Analogues**

Name	Primary Structure	BK Potentiation	BK-Independent Hypotension	B <sub>2</sub> R Agonist	Reference
TsHpt-IV	AEIDFSGIPEDIIKEIKETNAKPP	N/D	N/D	N/D	[27]
TsHpt-III	AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPP	N/D	N/D	N/D	[27]
TsHpt-II	AEIDFSGIPEDIIKEIKETNAKPPA	N/D	N/D	N/D	[27]
TsHpt-I	AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA	Yes	Yes	Yes	[27, 28]
TsHpt-I <sub>[KETNAKPPA]</sub>	KETNAKPPA	Yes	Yes	N/D	[27, 28]
TsHpt-I <sub>[KPPA]</sub>	KPPA	Yes	Yes	N/D	[27, 28]
TsHpt-I <sub>[PPA]</sub>	PPA	Yes	No	N/D	[27, 28]
TsHpt-I <sub>[KPP]</sub>	KPP	Yes	Yes	Yes	[27, 28]
TsHpt-I <sub>[acKPP]</sub>	acKPP	Yes	No	No	[27, 28]
TsHpt-I <sub>[KP]</sub>	KP	No	Yes	N/D	[27, 28]
TsHpt-I <sub>[PP]</sub>	PP	Yes	No	N/D	[27, 28]
TsHpt-I <sub>[PA]</sub>	PA	No	No	N/D	[27, 28]

<sup>1</sup>N/D<sup>1</sup> stands for Not Determined; <sup>1</sup>acK<sup>1</sup> stands for acetylated lysine residue.

'short chain' toxin family. The representatives of this group are generally cross-linked by three disulfide bridges and are mostly active on potassium channels [32].

**Table 2. Non-Exhaustive List of 'Classical' BPPs**

Name	Primary Structures	Source	References
BPP7a	<EDGPIPP	<i>Bothrops jararaca</i>	[19]
BPP9a	<EWPRPQIPP	<i>Bothrops jararaca</i>	[13]
BPP-10b	<ENWPRPQIPP	<i>Bothrops jararaca</i>	[22]
BPP-10c	<ENWPHFPQIPP	<i>Bothrops jararaca</i>	[13]

'<E' stands for a pyroglutamic acid residue.

Amongst the K<sup>+</sup> channel-blocking toxins in the *T. serrulatus*' venom, one may mention Ts7, also known as TstX-K $\alpha$ , TstX-K Alpha, Tityustoxin K-alpha, Potassium channel toxin alpha-KTx 4.1, TsII-9, TsTx-K-alpha, TSK4 and Toxin II-9 [32], which *inter alia* has been shown to block homomeric mouse Kv1.3 channels of the *Shaker* subfamily of voltage-gated K<sup>+</sup> channels with high affinity [33]. The toxin occludes the pore of the channel expressed in *Xenopus* oocytes and in mammalian cell line L929, without changing its kinetic properties [33]. Additionally, the affinity of Ts6 (also known as TsTX-IV,  $\alpha$ -KT<sub>X12.1</sub>, Potassium channel toxin alpha-KT<sub>X12.1</sub>, Butantoxin and BuTX) for Kv1.3 channels has been suggested due to its ability to compete with the <sup>125</sup>I-kaliotoxin for the binding on rat brain synaptosomes [34].

Kv1.3 channels have been intensively investigated as pharmacological targets for immunosuppressive therapy. Such interest arises from the fact that an ideal immunosuppressive agent should distinctively inhibit the proliferation of T cell subsets involved in autoimmune injury, leaving protective immune reactions unaltered. In that sense, in several autoimmune diseases, including multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and type-I diabetes mellitus, chronically activated T<sub>EM</sub> cells are responsible for tissue damage. Hence, autoimmune disease therapy should specifically target activated T<sub>EM</sub> cells. It has been observed that both naïve T<sub>CM</sub> and T<sub>EM</sub> cells (either CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>) express low levels of Kv1.3 and of the intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel K<sub>Ca</sub>3.1. Specific stimulation of naïve and T<sub>CM</sub> is followed by a conspicuous upregulation of K<sub>Ca</sub>3.1, whereas the number of Kv1.3 channels increases moderately. Contrastingly, the activation of T<sub>EM</sub> accompanies an increase in the number of Kv1.3 channels without changing K<sub>Ca</sub>3.1 levels and the proliferation of T<sub>EM</sub> cells becomes Kv1.3-dependent. Hence, selective Kv1.3 inhibitors can completely and persistently inhibit the proliferation of the former cells, without interfering with the proliferation of T<sub>CM</sub> cells [35-38].

Known peptidic Kv1.3-blockers encompass 30–40 residues-long (*ca.* 4 kDa) toxins from scorpions, sea anemones or other animals. These toxins typically bear a large positive net charge, thus, being impermeant through cell membranes. Similarly to Ts7, they exert their activity by occluding the external end of the channel pore, thereby preventing the outward flow of K<sup>+</sup> ions. This interaction depends upon a fairly large surface, where several residues

contribute to the high affinity and selectivity of the binding. Contrastingly, small hydrophobic molecule blockers (800 Da) permeate through cell membranes and bind the water-filled cavity of the channel. The binding of small molecules involves fewer contact points with the channel, resulting in lower affinity and selectivity in comparison to peptidic toxins. In the other hand, Kv1.3-blocking small molecules entail easier and less costly production and more easily achievable oral bioavailability. Moreover, peptides are more likely to trigger an immune reaction in the recipient and may be less stable [35-38]. In spite of pros and cons of both peptide and small molecule blockers, specific Kv1.3 blockage represents an important alternative to the general immunosuppression approach currently used for the treatment of autoimmune diseases. In that sense, Ts6 and Ts7 and other venom Kv1.3 could be of valuable assistance to the further design of immunosuppressive therapeutics.

#### 4. ANTIMICROBIAL PEPTIDES

The worldwide increased bacterial resistance to antibiotics has prompted the search for novel antimicrobial agents, being antimicrobial peptides (AMPs) one of the categories of molecules that have been subjected to a great deal of research effort. These peptides have been described in wide array of sources such as bacteria, fungi, protozoa, plants and animals [39]. The range of organisms targeted by AMPs is equally diverse: Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, and viruses [40-43].

These highly variable peptides show an array of lengths spanning from 7 to 55 residues although usually possessing conservative net positive charge and displaying amphipathic  $\alpha$ -helix or  $\beta$ -sheet, provided that within a lipid membrane milieu [44, 45]. Nonetheless, AMPs can be generically classified into three main classes according to their amino acid composition and 3D structure [46, 47]: i) cysteine-devoid peptides with amphipathic  $\alpha$ -helical structure, ii) peptides with three disulphide bonds giving peptides with a flat dimeric  $\beta$ -sheet structure and iii) peptides with compositional bias toward proline, arginine, tryptophan or histidine residues.

In addition to acting through the selective disruption of cell membranes [48-51], the activity of some AMPs has been reported to be independent from cellular lyses. Such mechanisms include direct action upon the transcription or replication of the DNA machinery, enzymatic activation or inhibition, among others [46, 52].

AMPs have been found in arthropod venoms, mainly in spiders and scorpions [53]. Cytolytic peptides in spider venoms have been described in labidognath spiders, essentially in members of the superfamily Lycosidoidea, mainly constituted by non-web-building, omnivorous hunting spiders. The AMPs from spiders are mainly  $\alpha$ -helical peptides with high positive charge (>6+) [53].

The first description of antimicrobial activity in arachnids was published in 1989 in the Chinese spider *Lycosa singoriensis* [54], which was later followed by the isolation of AMPs with molecular masses in a range from 2,000 to 3,000 Da [55]. These molecules were found to inhibit the growth of Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria and



fungi (*Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*) at micromolar concentrations. The first spider venom AMPs to be sequenced were Lycotoxin I and II, isolated from the wolf spider *Lycosa carolinensis* venom [56]. Lycotoxin I and II display an amphipathic  $\alpha$ -helix, with lysine repeats occurring at every four or five residues, and typical of many very active antimicrobial peptides, showing activity against Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*) and yeast (*Candida glabrata*), as well as hemolytic activity in higher concentrations. Later, LyeTx-I, a cationic antimicrobial peptide from the Brazilian spider *Lycosa erythrognatha* venom was reported to inhibiting the growth of bacteria (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and fungi (*Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans*) at micromolar concentrations [57]. Moreover, the lytic effect of LyeTx-I upon lipid membranes was investigated by means of phosphatidylcholine, cholesterol and ergosterol liposomes [57]. Lytic activity could be detected down to picomolar range. The dose-dependent effect of LyeTx I on membrane permeability was found to be sigmoidal [57], suggesting that the peptide may suffer from oligomerization so as to cause membrane permeabilization [58]. Nuclear magnetic resonance revealed that the structure of LyeTx I in dodecylphosphocholine media comprises a small random-coil region at the N-terminus followed by an amphipathic  $\alpha$ -helix, which extends to the amidated C-terminus [57]. Such structural arrangement might favor the peptide-membrane interaction [57].

Regarding scorpion venom AMPs, scorpine was one of the first AMPs characterized in these arachnids. Originally, isolated from *Pandinus imperator*, scorpine possesses 75 amino acids (8,350 Da), and three disulfide bridges [59]. Other peptides with scorpine features have been isolated from scorpion venoms and show antimicrobial and K<sup>+</sup>-channel blocking activities [60, 61]. The scorpine-like peptides show two domains. Firstly, the C-terminal domain, which is stabilized by three or four disulfide bridges and exhibits the CS $\alpha\beta$ -motif (cysteine stabilized  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -sheet motif). The C-terminal domain is supposed to be responsible for the K<sup>+</sup>-channel blocking activity. The N-terminal domain shows an  $\alpha$ -helical structure and is supposed to be responsible for an antimicrobial activity [60, 62].

In the light of the facts described above, spider and scorpion AMPs are a still sparsely investigated biodiversity repository, despite being a promising source of models for study and development of new antimicrobial agents [56, 63-65].

## 5. ARACHNID TOXINS AS POSSIBLE MODELS OF DRUGS TO INCREASE ERECTILE FUNCTION

Priapism, defined as a painful and persistent penile erection not associated with sexual interest or stimulation [66], has been reported as one the symptoms in human envenomation by spiders and scorpions [67, 68].

The mechanisms involved in venom-induced priapism are still unclear and poorly studied. Since penile erection involves a balance between contractile and relaxing agents [69], it seems that the release of neurotransmitters such as acetylcholine, norepinephrine and others, caused by spider

and scorpion venoms [70-74] interfere with the tonus of penile smooth muscle. Yet, the initiation of erectile process, after sexual stimulation, involves the opening of channels resulting in ion fluxes (Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, *inter alia*) [75, 76]. Therefore, one can suppose that ion-channel targeting toxins from arthropod venoms could alter penile physiological functions, resulting in priapism or influencing the erectile dynamics. Furthermore, likewise in erectile function, the clinical symptomatology observed in severe spider and scorpion envenomation involves mainly sympathetic and parasympathetic stimulation [77].

A penis is innervated by both autonomic and somatic nerve fibers, with sympathetic and parasympathetic nerves emerging from the pelvis to form the cavernous nerves. Penile erection is a neurovascular phenomenon that depends upon neural integrity, a functional vascular system, and healthy cavernosal tissue [69, 78, 79]. In physiological conditions, penile erection occurs due to the release of neurotransmitters from nerve terminals found in penile arteries and cavernous tissue, together with vasoactive relaxing factors from endothelial cells, resulting in relaxation of smooth muscle and arteries. Such relaxation allows significantly increased blood flow and engorgement of the penis, resulting in erection [80, 81].

The nitric oxide pathway is critically important for physiological induction and maintenance of erection [82-84]. NO is synthesized from L-arginine by the action of NO synthase (NOS). It is noteworthy that three NOS isoforms are known: neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) and inducible NOS (iNOS) [84, 85]. Upon sexual stimulation, NO is released from nonadrenergic noncholinergic nerves (NANC), nitrergic nerves and endothelial cells, inducing the formation of cyclic GMP (cGMP) by activation of soluble guanylyl cyclase (sGC) leading to cavernosum smooth muscle relaxation and penile erection [82, 86]. On the other hand, the termination of erection is elicited by hydrolysis of cGMP by phosphodiesterase type 5 (PDE 5), which leads to contraction of corpus cavernosum [78, 83, 87-90].

Erectile dysfunction (ED) is defined as the persistent inability to achieve or maintain sufficient erection for a satisfactory sexual performance [91]. Many factors can contribute to the development of ED, including vascular diseases, such as atherosclerosis, hypertension, diabetes mellitus and smoking, besides anxiety or depression [69, 92-97]. The use of specific pharmacological medications, e.g. antihypertensive drugs, diuretics, cardiac medications, hormones and antidepressants can induce ED. Significant strategic changes for the pharmacological treatment of ED have occurred, mainly with regard to the advent of effective oral erectogenic drugs [78]. Nowadays, using phosphodiesterase type-5 (PDE5) inhibitors, e.g. sildenafil (Viagra®), tadalafil (Cialis®) and vardenafil (Levitra®) [69, 89, 95, 98], is the main pharmacotherapy for treating ED. The mechanism of action of these inhibitors requires intact NO-relaxing nerve fibers and healthy corpus cavernosum endothelium. These drugs inhibit the PDE5, preventing hydrolysis of cGMP and consequently maintaining the erection. However, PDE5 inhibitors, specially sildenafil, are not efficient in the treatment of patients with vascular disease, such as diabetes or radical prostatectomy, where NO

production is impaired [89]. Therefore, there is an open opportunity for the development of new therapeutic strategies targeting the induction NO synthesis.

Grippingly, most studies reporting arthropods venoms or toxins as agents influencing erectile function describe an increase in NO release and, hence relaxation of corpus cavernosum [98-101]. Neurogenic relaxation mediated by NO from NANC nerve terminals was observed in isolated rabbit and human corpus cavernosum incubated with the *Tityus serrulatus* scorpion venom [99, 102]. Also, a purified toxin from this venom (TsVII) induced relaxation in rabbit corpus cavernosum, which was attributed to its selective action on Na<sup>+</sup>-channel in penile nerves suggesting enhancement in NO release [103]. Venoms from the scorpions *Androctonus australis* and *Buthotus judaicus* have also been shown to relax the cavernosum tissue by activating NANC nerve fibers [104].

Some spider toxins have also been studied as for their activity in erectile function. As an example, the toxin L- $\alpha$ TX, from the black widow spider, *Latrodectus mactans* has been suggested to induce priapism, which is one of the symptoms resulting from envenomation by this spider [105]. The crude venom of the spider *Phoneutria nigriventer* was able to induce relaxation of corpus cavernosum that was abolished by L-NAME, a nonspecific inhibitor of NOS [106]. Two purified toxins, PnTx2-5 and PnTx2-6 from *P. nigriventer* venom, have been demonstrated to cause penile erection [98, 100, 107] and PnTx2-6 was able to reverse a severe erectile dysfunction in hypertensive rats [107]. In addition, these toxins have been shown to prolong activation and deactivation processes of Na<sup>+</sup>-channels [108, 109]. Both PnTx2-5 and PnTx2-6 seem to cause penile erection by a mechanism involving NO release in mice and rats [101, 107]. In that sense, PnTx2-6 was recently shown to increase NO production due to its action in slowing Na<sup>+</sup> channels inactivation in penile nitrergic neurons, allowing Ca<sup>2+</sup> influx to facilitate NO/cGMP signaling. In addition, the relaxation effect evoked by this toxin in the penile tissue is independent of PDE5 [110]. Biodistribution studies of radioactively labeled PnTx2-6 has demonstrated that this toxin is found in mice testicles [111] as well as in rat penis [107] after intraperitoneal injection. Recently, it was shown that PnTx2-6 can modify the expression profile of some genes, including those involved in the NO pathway in mice penile tissue [112].

Since the toxins mentioned herein are highly active on ion channels, for example, those acting on inactivation/activation phases of Na<sup>+</sup>-channels that may change the neuronal Ca<sup>+</sup> influx (which alters the neurotransmitter balance as well as the NO/cGMP pathway), it is reasonably to argue that these molecules might be useful as pharmacological tools to understand related erectile function pathways, as well as ED pathology. However, studies are still necessary to elucidate the precise action of such venoms/toxins in the erectile mechanism. Besides, it must be also considered that many of these toxins are highly toxic to mammals and their use as a drug is not yet a viable strategy. Rather, we believe that these toxins could constitute good models to propose possible synthetic drugs, as exemplified by other natural molecules. Future studies must

consider the use of synthetic products that minimize possible collateral effects and mainly the toxicity of these molecules.

## 6. PERSPECTIVES FROM PhTx3

The so-called PhTx3 is one of the neurotoxic polypeptide fractions from the venom of the spider *P. nigriventer*. Further purification of PhTx3 yields six homogeneous toxins, which have been serially named as PnTx3-1 to PnTx3-6 [113]<sup>1</sup>. This fraction was shown to induce a progressive flaccid paralysis in mice upon intracerebroventricular injection [113]. Moreover, PhTx3 abolishes the Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release as well as increase in the concentration of cytosolic free calcium in response to membrane depolarization induced by KCl in synaptosomes [114]. The six PnTx3 isotoxins were also individually evaluated in that experimental model and it had been demonstrated that PnTx3-3 and PnTx3-4 were also effective against the KCl-evoked glutamate release [114]. Later on, it had been shown that PnTx3 blocks with different affinities all high voltage activated (HVA) Ca<sup>2+</sup>-channels (P/Q, R, N and L) [115], and that PnTx3-3 and PnTx3-4 exert antagonist effects mainly upon P/Q Ca<sup>2+</sup>-channels, which are involved in exocytosis control of nerve terminals [116-118]. Interestingly, besides impairing Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release, it has been reported that PnTx3-4 is able to inhibit the uptake of glutamate by synaptosomes in a time-dependent manner and that this inhibition in turn leads to a decrease in the Ca<sup>2+</sup>-independent release of glutamate [119].

In the light of these facts, the protective effect of PhTx3 and the individual toxins PnTx3-3 and PnTx3-4 over hippocampal damage, resulting from ischemia-induced glutamate release, have been evaluated [120, 121]. Such a hypothesis is driven from the fact that the action termination of the excitatory neurotransmitter glutamate in the synaptic cleft depends upon its uptake by neurons and glia [122]. Moreover, prolonged exposure of neurons to glutamate, such as that resulting from brain ischemia and anoxia [123-125], ultimately leads to neurotoxicity and cell death [126], mediated by increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration [127]. Therefore, a reduced entry of Ca<sup>2+</sup> in neurons, achieved by means of agents impairing neurotransmitter receptor-regulated ionotropic channels and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-channels, such as animal toxins, represents a promising therapeutic strategy for brain ischemia [128, 129]. Grippingly, PhTx3 (1  $\mu$ g/mL) indeed conferred virtually complete neuroprotection to hippocampal slices subjected to ischemia induced by oxygen deprivation and low glucose (ODLG) insult [121]. Moreover, PnTx3-3 and PnTx3-4 inhibited an *in vitro* increase of glutamate release, neuronal death and loss of neurotransmission in hippocampus resulting from ischemia. A protective effect upon cell death could also be observed when these toxins were applied after ischemic injury. Yet, preliminary examination of *in vivo* efficacy of the neuroprotection elicited by PnTx3-4, showed

<sup>1</sup>The radicals "PnTx" (or Tx) are interchangeably used in the literature for the designation of purified toxins from *Phoneutria nigriventer*. In this review, the radical "PnTx" is adopted, despite its designation may differ in literature. Nonetheless, the Arabic numerals used for the specific designation of toxin families and isotoxins have been preserved. The radical "PhTx" is used for the designation of semi-purified fractions from the *Phoneutria nigriventer* venom.

that rats treated with this toxin had partial recovery of locomotor activity [120], suggesting the usefulness of PnTx3-3 and PnTx3-4 as leads for the development of agents to be used in the treatment of pathologies, such as stroke.

PnTx3-6 (alternatively named as  $\omega$ -PnTx3-6) also inhibits  $K^+$ -evoked increase in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and the  $Ca^{2+}$ -dependent glutamate release [130]. Moreover, PnTx3-6 shows significant inhibitory effects on N-type calcium current (channel  $Ca_v2.2$ ) [131]. This fact highlights the therapeutic potential and importance of this toxin as a tool in pain investigation, since the voltage-gated calcium channels (VGCCs) are involved in the control of neurotransmitter release and neuronal excitability, being the N-type channels associated with the etiology of medically important pain states, including chronic/neuropathic pain [132]. Despite the progress in the study of analgesia, effective agents targeting chronic abnormal pain are still scarce. In addition, side effects and tolerance development are common shortcomings as for some drugs currently used for treating pain. Therefore, the elucidation of mechanisms generating pain with the aim to select new targets and design of novel analgesic drugs is of great interest [133]. Animal venoms and toxins have been investigated as lead compounds for the development of such agents [134].

Despite the compelling nature of facts described in the previous paragraphs, the adverse effects associated with the use of ion-channel modulators have, in most cases, precluded their clinical uses [133]. Moreover, using peptides as therapeutic agents is challenged by their usually poor bioavailability and pharmacokinetics as well as their low stability in plasma [135].

## CONCLUDING REMARKS

A growing number of toxins from arachnid venoms, and from the venom of other animal groups as well, have been shown to be potential models for the development of new drugs. Although posing promising vistas, the diversity of molecules in venoms is still puzzling. For instance, the presence of hundreds of molecular entities has been reported in the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* [136, 137]. However, the systematic assessment of the peptide (800 – 3000 Da) diversity in that venom has shown that many of the identified molecules were, in fact, fragments and/or truncated forms of larger venom toxins and peptides [138]. Although their biological significance is still unclear, the structure minimization studies of *Tityus serrulatus* hypotensins [139] discussed above are an exciting indication of its pharmacological relevance, as well as the biotechnological potential embodied by the observed peptide diversity.

Considering these remarks, pharmacological studies must be developed in order to explore and validate broad possibilities of producing derived pharmaceuticals. A selection of molecules from Brazilian medically important arachnids that have been subjected to structure-activity investigation and present possible uses in medicine or that may be potential models to design new drugs were discussed in this review. Despite that this review focuses on the molecules from a rather small group of venomous species, a

significant number of applications were depicted thus illustrating open opportunities in the field of toxinology.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research work was funded by FAPEMIG, CAPES, CNPq and INCTTOX-Fapesp.

## REFERENCES

- [1] Theakston, R.D.; Warrell, D.A.; Griffiths, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, **2003**, *41*(5), 541-557.
- [2] Schottler, W.H. Supplementary list of books on poisonous animals published during the years 1863 to 1946. *Mem. Inst. Butantan*, **1954**, *26*, 7-73.
- [3] Theakston, R.D.; Kamiguti, A.S. A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. *Toxicon*, **2002**, *40*(5), 579-651.
- [4] Pimenta, A.M.; De Lima, M.E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *J. Pept. Sci.*, **2005**, *11*(11), 670-676.
- [5] Verano-Braga, T.; de Lima, M.E.; Pimenta, A.M.C. From bradykinin-potentiating peptides to Hypotensins: More than four decades of research. In *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, 1 ed.; de Lima, M. E.; Pimenta, A. M. C.; Martin-Eauclaire, M.; Zingalli, R.; Rochat, H., Eds. Ed. UFMG, Belo Horizonte, **2009**; pp. 235-247.
- [6] Cestele, S.; Catterall, W.A. Toxins targeting mammalian sodium channels. In *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, de Lima, M. E.; Pimenta, A. M. C.; Martin-Eauclaire, M.; Zingalli, R.; Rochat, H., Eds. UFMG, Belo Horizonte, **2009**; pp. 99-121.
- [7] de la Vega, R.C.; Barraza, O.; Restano-Cassulini, R.; Possani, L.D. Toxins active on hERG channel. In *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, de Lima, M. E.; Pimenta, A. M. C.; Martin-Eauclaire, M.; Zingalli, R.; Rochat, H., Eds. UFMG, Belo Horizonte, **2009**; pp. 193-204.
- [8] Sanchez, E.F. Snake venom proteinases that affect coagulation and fibrinolysis. In *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, de Lima, M. E.; Pimenta, A. M. C.; Martin-Eauclaire, M.; Zingalli, R.; Rochat, H., Eds. UFMG, Belo Horizonte, **2009**; pp. 575-588.
- [9] Gutiérrez, J.M.; León, G. Snake antivenoms. In *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, de Lima, M. E.; Pimenta, A. M. C.; Martin-Eauclaire, M.; Zingalli, R.; Rochat, H., Eds. UFMG, Belo Horizonte, **2009**; pp. 393-422.
- [10] Kearney, P.M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Munter, P.; Whelton, P.K.; He, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, **2005**, *365*(9455), 217-223.
- [11] Bohm, M.; Werner, C.; Jakobsen, A.; Heroys, J.; Ralph, A.; Rees, T.; Shaw, M. Treating to protect: current cardiovascular treatment approaches and remaining needs. *Medscape. J. Med.*, **2008**, *10*( Suppl), S3.
- [12] Ferreira, S.H. A Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present in the Venom of Bothrops Jararaca. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **1965**, *24*, 163-169.
- [13] Ferreira, S.H.; Bartelt, D.C.; Greene, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. *Biochemistry*, **1970**, *9*(13), 2583-2593.
- [14] Soffer, R.L. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annu. Rev. Biochem.*, **1976**, *45*, 73-94.
- [15] Cushman, D.W.; Cheung, H.S.; Sabo, E.F.; Rubin, B.; Ondetti, M.A. Development of specific inhibitors of angiotensin I converting enzyme (kininase II). *Fed. Proc.*, **1979**, *38*(13), 2778-2782.
- [16] Cushman, D.W.; Ondetti, M.A. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Prog. Med. Chem.*, **1980**, *17*, 41-104.
- [17] Ondetti, M.A.; Rubin, B.; Cushman, D.W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, **1977**, *196*(4288), 441-444.
- [18] Gomes, C.L.; Konno, K.; Conceicao, I.M.; Ianzer, D.; Yamanoue, N.; Prezoto, B.C.; Assakura, M.T.; Radis-Baptista, G.; Yamane, T.; Santos, R.A.; de Camargo, A.C.; Hayashi, M.A. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a

- rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. *Biochem. Pharmacol.*, **2007**, *74*(9), 1350-1360.
- [19] Ianzer, D.; Konno, K.; Marques-Porto, R.; Vieira Portaro, F.C.; Stocklin, R.; Martins de Camargo, A.C.; Pimenta, D.C. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from Bothrops jararaca crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides*, **2004**, *25*(7), 1085-1092.
- [20] Jia, Y.H.; Li, D.S.; Zhu, S.W.; Zhang, L.Y.; Ding, L.S.; Wang, W.Y.; Xiong, Y.L. Characterization of a new bradykinin-potentiating peptide (TmF) from *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, **2003**, *35*(7), 619-623.
- [21] Menin, L.; Perchuc, A.; Favreau, P.; Perret, F.; Michalet, S.; Schoni, R.; Wilmer, M.; Stocklin, R. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in Bothrops moojeni snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicol.*, **2008**, *51*(7), 1288-1302.
- [22] Ondetti, M.A.; Williams, N.J.; Sabo, E.F.; Pluscec, J.; Weaver, E.R.; Kocoy, O. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of Bothrops jararaca. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry*, **1971**, *10*(22), 4033-4039.
- [23] Ferreira, L.A.; Alves, E.W.; Henriques, O.B. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicol.*, **1993**, *31*(8), 941-947.
- [24] Ferreira, L.A.; Alves, W.E.; Lucas, M.S.; Habermehl, G.G. Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide (BPP-S) isolated from *Scaptocosa raptoria* venom. *Toxicol.*, **1996**, *34*(5), 599-603.
- [25] Meki, A.R.; Nassar, A.Y.; Rochat, H. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides*, **1995**, *16*(8), 1359-1365.
- [26] Sosnina, N.A.; Golubenko, Z.; Akhunov, A.A.; Kugaevskaia, E.V.; Elisheva Iu, E.; Orekhovich, V.N. Bradykinin-potentiating peptides from the spider *Latrodectus tredecimguttatus*-inhibitors of carboxycathepsin and of a preparation of karakurt venom kinase. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **1990**, *315*(1), 236-239.
- [27] Verano-Braga, T.; Rocha-Resende, C.; Silva, D.M.; Ianzer, D.; Martin-Eauclaire, M.F.; Bougis, P.E.; de Lima, M.E.; Santos, R.A.; Pimenta, A.M. *Tityus serrulatus* Hypotensin: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2008**, *371*(3), 515-520.
- [28] Verano-Braga, T.; Figueiredo-Rezende, F.; Melo, M.N.; Lautner, R.Q.; Gomes, E.R.; Mata-Machado, L.T.; Murari, A.; Rocha-Resende, C.; Elena de Lima, M.; Guatimosim, S.; Santos, R.A.; Pimenta, A.M. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B(2) kinin receptor. *Toxicol.*, **2010**, *56*(7), 1162-1171.
- [29] Ianzer, D.; Santos, R.A.; Etelvino, G.M.; Xavier, C.H.; de Almeida Santos, J.; Mendes, E.P.; Machado, L.T.; Prezoto, B.C.; Dive, V.; de Camargo, A.C. Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? new insights from proline-rich peptides of Bothrops jararaca. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2007**, *322*(2), 795-805.
- [30] Houben, A.J.; Kroon, A.A.; de Haan, C.H.; Fuss-Lejeune, M.J.; de Leeuw, P.W. Quinaprilat-induced vasodilatation in forearm vasculature of patients with essential hypertension: comparison with enalaprilat. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2000**, *14*(6), 657-663.
- [31] Mittra, S.; Singh, M. Possible mechanism of captopril induced endothelium-dependent relaxation in isolated rabbit aorta. *Mol. Cell Biochem.*, **1998**, *183*(1-2), 63-67.
- [32] Cologna, C.T.; Marcussi, S.; Giglio, J.R.; Soares, A.M.; Arantes, E.C. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein. Pept. Lett.*, **2009**, *16*(8), 920-932.
- [33] Lewis, R.J.; Garcia, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug Dis.*, **2003**, *2*(10), 790-802.
- [34] Pimenta, A.M.; Mansuelle, P.; Diniz, C.R.; Martin-Eauclaire, M.F. Covalent structure and some pharmacological features of native and cleaved alpha-KTx12-1, a four disulfide-bridged toxin from *Tityus serrulatus* venom. *J. Pept. Sci.*, **2003**, *9*(2), 132-140.
- [35] Varga, Z.; Hajdu, P.; Panyi, G. Ion channels in T lymphocytes: an update on facts, mechanisms and therapeutic targeting in autoimmune diseases. *Immunol. Lett.*, **2010**, *130*(1-2), 19-25.
- [36] Chandry, K.G.; Wulff, H.; Beeton, C.; Pennington, M.; Gutman, G.A.; Cahalan, M.D. K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2004**, *25*(5), 280-289.
- [37] Cahalan, M.D.; Chandry, K.G. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol Rev.*, **2009**, *231*(1), 59-87.
- [38] Shieh, C.C.; Coghlan, M.; Sullivan, J.P.; Gopalakrishnan, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol. Rev.*, **2000**, *52*(4), 557-594.
- [39] Zelezetsky, I.; Pag, U.; Antcheva, N.; Sahl, H.G.; Tossi, A. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. *Arch Biochem. Biophys.*, **2005**, *434*(2), 358-364.
- [40] Hernández-Ledesma, B.; Recio, I.; Amigo, R.  $\beta$ -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*, **2008**, *35*(2), 257-265.
- [41] Kastin, A.J. *Handbook of biologically active peptides*. Academic Press: Amsterdam, 2006; p 1640.
- [42] Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **2002**, *415*(6870), 389-395.
- [43] Miranda, A.; Miranda, M.T.M.; Jouvansal, L.; Vovelle, F.; Bulet, P.; Daffre, S. Gomesin. A powerful antimicrobial peptide isolated from the Brazilian tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. In *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, de Lima, M. E.; Pimenta, A. M. C.; Martin-Eauclaire, M. F.; Zingalli, R.; Rochat, H., Eds. UFMG, Belo Horizonte, **2009**; pp. 227-247.
- [44] Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, **2005**, *3*(3), 238-250.
- [45] Bechinger, B. Structure and function of membrane-lytic peptides. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **2004**, *23*(3), 1-22.
- [46] Andreu, D.; Rivas, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, **1998**, *47*(6), 415-433.
- [47] Boman, H.G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **1995**, *13*, 61-92.
- [48] Langham, A.A.; Ahmad, A.S.; Kaznessis, Y.N. On the nature of antimicrobial activity: a model for protegrin-1 pores. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*(13), 4338-4346.
- [49] Duclouier, H. Bilayer lipid composition modulates the activity of dermaseptins, polycationic antimicrobial peptides. *Eur. Biophys. J.*, **2006**, *35*(5), 401-409.
- [50] Arcisio-Miranda, M.; dos Santos Cabrera, M.P.; Konno, K.; Rangel, M.; Procopio, J. Effects of the cationic antimicrobial peptide eumenitin from the venom of solitary wasp *Eumenes rubronotatus* in planar lipid bilayers: surface charge and pore formation activity. *Toxicol.*, **2008**, *51*(5), 736-745.
- [51] Vaz Gomes, A.; de Waal, A.; Berden, J.A.; Westerhoff, H.V. Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes. *Biochemistry*, **1993**, *32*(20), 5365-5372.
- [52] Hale, J.D.; Hancock, R.E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, **2007**, *5*(6), 951-959.
- [53] Kuhn-Nentwig, L. Cytolytic and antimicrobial peptides in the venom of scorpions and spiders. In *Animal Toxins: state of the art. Perspectives in health and biotechnology*, 1 ed.; de Lima, M. E.; Pimenta, A. M. C.; Martin-Eauclaire, M. F.; Zingalli, R.; Rochat, H., Eds. Ed. UFMG, Belo Horizonte, **2009**; pp 153-172.
- [54] Xu, K.; Ji, Y.; Qu, X. Purification and characterization of an antibacterial peptide from venom of *Lycosa singoriensis*. *Acta Zool. Sinica.*, **1989**, *35*, 300-305.
- [55] Budnik, B.A.; Olsen, J.V.; Egorov, T.A.; Anisimova, V.E.; Galkina, T.G.; Musolyamov, A.K.; Grishin, E.V.; Zubarev, R.A. De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. *J. Mass Spectrom.*, **2004**, *39*(2), 193-201.
- [56] Yan, L.; Adams, M.E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*(4), 2059-2066.
- [57] Santos, D.M.; Verly, R.M.; Pilo-Veloso, D.; de Maria, M.; de Carvalho, M.A.; Cisalpino, P.S.; Soares, B.M.; Diniz, C.G.; Farias, L.M.; Moreira, D.F.; Frezard, F.; Bemquerer, M.P.; Pimenta, A.M.; de Lima, M.E. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Amino Acids*, **2010**, *39*(1), 135-144.
- [58] Takeuchi, K.; Takahashi, H.; Sugai, M.; Iwai, H.; Kohno, T.; Sekimizu, K.; Natori, S.; Shimada, I. Channel-forming membrane permeabilization by an antibacterial protein, sapecin: determination of membrane-buried and oligomerization surfaces by NMR. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*(6), 4981-4987.
- [59] Conde, R.; Zamudio, F.Z.; Rodriguez, M.H.; Possani, L.D. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.*, **2000**, *471*(2-3), 165-168.
- [60] Diego-Garcia, E.; Abdel-Mottaleb, Y.; Schwartz, E.F.; de la Vega, R.C.; Tytgat, J.; Possani, L.D. Cytolytic and K<sup>+</sup> channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cell Mol. Life Sci.*, **2008**, *65*(1), 187-200.

- [61] Schwartz, E.F.; Camargos, T.S.; Zamudio, F.Z.; Silva, L.P.; Bloch, C., Jr.; Caixeta, F.; Schwartz, C.A.; Possani, L.D. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon*, **2008**, *51*(8), 1499-1508.
- [62] Zhu, S.; Tytgat, J. The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cell Mol. Life Sci.*, **2004**, *61*(14), 1751-1763.
- [63] Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, J.L.; Hoffmann, D. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, **1999**, *23*(4-5), 329-344.
- [64] van 't Hof, W.; Veerman, E.C.; Helmerhorst, E.J.; Amerongen, A.V. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol. Chem.*, **2001**, *382*(4), 597-619.
- [65] Hancock, R.E.; Sahl, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.*, **2006**, *24*(12), 1551-1557.
- [66] Montague, D.K.; Jarow, J.; Broderick, G.A.; Dmochowski, R.R.; Heaton, J.P.; Lue, T.F.; Nehra, A.; Sharlip, I.D. American Urological Association guideline on the management of priapism. *J. Urol.*, **2003**, *170*(4 Pt 1), 1318-1324.
- [67] Amitai, Y. Clinical manifestations and management of scorpion envenomation. *Public Health Rev.*, **1998**, *26*(3), 257-263.
- [68] Quan, D.; Ruha, A.M. Priapism associated with *Latrodectus mactans* envenomation. *Am. J. Emerg. Med.*, **2009**, *27*(6), 759 e751-752.
- [69] Priviero, F.B.; Leite, R.; Webb, R.C.; Teixeira, C.E. Neurophysiological basis of penile erection. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2007**, *28*(6), 751-755.
- [70] Couto, A.S.; Moraes-Santos, T.; Azevedo, A.D.; Almeida, A.P.; Freire-Maia, L. Effects of toxin Ts-gamma, purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom, on the isolated rat atria. *Toxicon*, **1992**, *30*(3), 339-343.
- [71] Cunha-Melo, J.R.; Almeida, A.P.; Gonzaga, H.M.; Gomez, M.V.; Freire-Maia, L. Effect of scorpion toxin on gastric histamine and acetylcholine content in the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **1987**, *20*(3-4), 393-401.
- [72] Borges, A.; Alfonso, M.J.; Garcia, C.C.; Winand, N.J.; Leipold, E.; Heinemann, S.H. Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel beta-toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon*, **2004**, *43*(6), 671-684.
- [73] Gomez, M.V.; Kalapothakis, E.; Guatimosim, C.; Prado, M.A. Phoneytria nigriventer venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol. Neurobiol.*, **2002**, *22*(5-6), 579-588.
- [74] Matos, I.M.; Teixeira, M.M.; Leite, R.; Freire-Maia, L. Pharmacological evidence that neuropeptides mediate part of the actions of scorpion venom on the guinea pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, **1999**, *368*(2-3), 231-236.
- [75] Christ, G.J.; Wang, H.Z.; Venkateswarlu, K.; Zhao, W.; Day, N.S. Ion Channels and Gap Junctions: Their Role in Erectile Physiology, Dysfunction, and Future Therapy. *Mol. Urol.*, **1999**, *3*(2), 61-73.
- [76] Lee, S.W. Physiological roles and properties of potassium channels in corporal smooth muscle. *Drugs Today (Barc)*, **2000**, *36*(2-3), 147-154.
- [77] Bucarechi, F.; Deus Reinaldo, C.R.; Hyslop, S.; Madureira, P.R.; De Capitani, E.M.; Vieira, R.J. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.*, **2000**, *42*(1), 17-21.
- [78] Bivalacqua, T.J.; Champion, H.C.; Hellstrom, W.J.; Kadowitz, P.J. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2000**, *21*(12), 484-489.
- [79] Giuliano, F.A.; Rampin, O.; Benoit, G.; Jardin, A. Neural control of penile erection. *Urol. Clin. North Am.*, **1995**, *22*(4), 747-766.
- [80] Andersson, K.E. Pharmacology of Penile Erection. *Pharmacol. Rev.*, **2001**, *53*(3), 417-450.
- [81] Lue, T.F.; Lee, K.L. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. *Chin. Med. J. (Engl)*, **2000**, *113*(4), 291-298.
- [82] Toda, N.; Ayajiki, K.; Okamura, T. Nitric oxide and penile erection function. *Pharmacol. Ther.*, **2005**, *106*(2), 233-266.
- [83] Ignarro, L.J.; Bush, P.A.; Buga, G.M.; Wood, K.S.; Fukuto, J.M.; Rajfer, J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1990**, *170*(2), 843-850.
- [84] Burnett, A.L.; Lowenstein, C.J.; Bredt, D.S.; Chang, T.S.; Snyder, S.H. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*, **1992**, *257*(5068), 401-403.
- [85] Rosselli, M.; Keller, P.J.; Dubey, R.K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum. Reprod. Update*, **1998**, *4*(1), 3-24.
- [86] Prieto, D. Physiological regulation of penile arteries and veins. *Int. J. Impot. Res.*, **2008**, *20*(1), 17-29.
- [87] Rajfer, J.; Aronson, W.J.; Bush, P.A.; Dorey, F.J.; Ignarro, L.J. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N. Engl. J. Med.*, **1992**, *326*(2), 90-94.
- [88] Stief, C.G.; Noack, T.; Andersson, K.E. Signal transduction in cavernous smooth muscle. *World J. Urol.*, **1997**, *15*(1), 27-31.
- [89] Moreland, R.B.; Goldstein, I.; Kim, N.N.; Traish, A. Sildenafil citrate, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor: Research and clinical implications in erectile dysfunction. *Trends Endocrinol. Metab.*, **1999**, *10*(3), 97-104.
- [90] Lee, M.R.; Li, L.; Kitazawa, T. Cyclic GMP causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*(8), 5063-5068.
- [91] Lizza, E.F.; Rosen, R.C. Definition and classification of erectile dysfunction: report of the Nomenclature Committee of the International Society of Impotence Research. *Int. J. Impot. Res.*, **1999**, *11*(3), 141-143.
- [92] Benet, A.E.; Melman, A. The epidemiology of erectile dysfunction. *Urol. Clin. North Am.*, **1995**, *22*(4), 699-709.
- [93] Bivalacqua, T.J.; Usta, M.F.; Champion, H.C.; Kadowitz, P.J.; Hellstrom, W.J. Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease. *J. Androl.*, **2003**, *24*(6 Suppl), S17-37.
- [94] Eardley, I.; Fisher, W.; Rosen, R.C.; Niederberger, C.; Nadel, A.; Sand, M. The multinational Men's Attitudes to Life Events and Sexuality study: the influence of diabetes on self-reported erectile function, attitudes and treatment-seeking patterns in men with erectile dysfunction. *Int. J. Clin. Pract.*, **2007**, *61*(9), 1446-1453.
- [95] Leite, R.; Giachini, F.R.; Carneiro, F.S.; Nunes, K.P.; Tostes, R.C.; Webb, R.C. Targets for the treatment of erectile dysfunction: is NO/cGMP still the answer? *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.*, **2007**, *2*(2), 119-132.
- [96] Lewis, R.W.; Fugl-Meyer, K.S.; Bosch, R.; Fugl-Meyer, A.R.; Laumann, E.O.; Lizza, E.; Martin-Morales, A. Definitions, classification, and epidemiology of sexual dysfunction. In *Sexual Medicine. Sexual Dysfunction in Men and Women*, Lue, T. F.; Basson, R.; Rosen, R.; Giuliano, F.; Khoury, S.; Montorsi, F., Eds. International for Sexual Medicine, Paris, **2004**; pp. 39-72.
- [97] Muller, A.; Mulhall, J.P. Cardiovascular disease, metabolic syndrome and erectile dysfunction. *Curr. Opin. Urol.*, **2006**, *16*(6), 435-443.
- [98] Nunes, K.P.; Cardoso, F.L.; Cardoso Jr, H.C.; Pimenta, A.M.C.; de Lima, M.E. Animal toxins as potential pharmacological tools for treatment of erectile dysfunction. In *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology.*, de Lima, M. E.; Pimenta, A. M. C.; Martin-Eauclaire, M.; Zingalli, R.; Rochat, H., Eds. UFMG, Belo Horizonte, **2009**; pp. 313-322.
- [99] Teixeira, C.E.; de Oliveira, J.F.; Baracat, J.S.; Priviero, F.B.; Okuyama, C.E.; Rodrigues Netto, N., Jr.; Fregonesi, A.; Antunes, E.; De Nucci, G. Nitric oxide release from human corpus cavernosum induced by a purified scorpion toxin. *Urology*, **2004**, *63*(1), 184-189.
- [100] Andrade, E.; Villanova, F.; Borra, P.; Leite, K.; Troncone, L.; Cortez, I.; Messina, L.; Paranhos, M.; Claro, J.; Strougi, M. Penile erection induced *in vivo* by a purified toxin from the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer*. *BJU Int.*, **2008**, *102*(7), 835-837.
- [101] Yonamine, C.M.; Troncone, L.R.; Camillo, M.A. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal *Phoneutria nigriventer* spider toxin. *Toxicon*, **2004**, *44*(2), 169-172.
- [102] Teixeira, C.E.; Bento, A.C.; Lopes-Martins, R.A.; Teixeira, S.A.; von Eickstedt, V.; Muscara, M.N.; Arantes, E.C.; Giglio, J.R.; Antunes, E.; de Nucci, G. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitrergic nerve fibres. *Br. J. Pharmacol.*, **1998**, *123*(3), 435-442.
- [103] Fernandes de Oliveira, J.; Teixeira, C.E.; Arantes, E.C.; de Nucci, G.; Antunes, E. Relaxation of rabbit corpus cavernosum by selective activators of voltage-gated sodium channels: role of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Urology*, **2003**, *62*(3), 581-588.
- [104] Teixeira, C.E.; Teixeira, S.A.; Antunes, E.; De Nucci, G. The role of nitric oxide on the relaxations of rabbit corpus cavernosum induced by *Androctonus australis* and *Buthotus jubaicus* scorpion venoms. *Toxicon*, **2001**, *39*(5), 633-639.
- [105] Peterson, M.E. Black widow spider envenomation. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, **2006**, *21*(4), 187-190.
- [106] Lopes-Martins, R.A.; Antunes, E.; Oliva, M.L.; Sampaio, C.A.; Burton, J.; de Nucci, G. Pharmacological characterization of rabbit corpus

- cavernosum relaxation mediated by the tissue kallikrein-kinin system. *Br. J. Pharmacol.*, **1994**, *113*(1), 81-86.
- [107] Nunes, K.P.; Costa-Goncalves, A.; Lanza, L.F.; Cortes, S.F.; Cordeiro, M.N.; Richardson, M.; Pimenta, A.M.; Webb, R.C.; Leite, R.; De Lima, M.E. Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function. *Toxicon*, **2008**, *51*(7), 1197-1206.
- [108] 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.*, **1993**, *347*(2), 205-208.
- [109] Matavel, A.; Fleury, C.; Oliveira, L.C.; Molina, F.; de Lima, M.E.; Cruz, J.S.; Cordeiro, M.N.; Richardson, M.; Ramos, C.H.; Beirao, P.S. Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics. *Biochemistry*, **2009**, *48*(14), 3078-3088.
- [110] Nunes, K.P.; Cordeiro, M.N.; Richardson, M.; Borges, M.N.; Diniz, S.O.; Cardoso, V.N.; Tostes, R.; De Lima, M.E.; Webb, R.C.; Leite, R. Nitric Oxide-Induced Vasorelaxation in Response to PnTx2-6 Toxin from Phoneutria nigriventer Spider in Rat Cavernosal Tissue. *J. Sex Med.*, **7**(12), 3879-3888.
- [111] Yonamine, C.M.; Costa, H.; Silva, J.A.A.; Muramoto, E.; Rogero, J.R.; Troncone, L.R.P.; Camillo, M.A.P. Biodistribution studies of bee venom and spider toxin using radiotracers. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, **2005**, *11*(1), 39-50.
- [112] Villanova, F.E.; Andrade, E.; Leal, E.; Andrade, P.M.; Borra, R.C.; Troncone, L.R.; Magalhaes, L.; Leite, K.R.; Paranhos, M.; Claro, J.; Srougi, M. Erection induced by Tx2-6 toxin of Phoneutria nigriventer spider: Expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice. *Toxicon*, **2009**.
- [113] Cordeiro Mdo, N.; de Figueiredo, S.G.; Valentim Ado, C.; Diniz, C.R.; von Eickstedt, V.R.; Gilroy, J.; Richardson, M. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider Phoneutria nigriventer (Keys). *Toxicon*, **1993**, *31*(1), 35-42.
- [114] Prado, M.A.; Guatimosim, C.; Gomez, M.V.; Diniz, C.R.; Cordeiro, M.N.; Romano-Silva, M.A. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider Phoneutria nigriventer. *Biochem. J.*, **1996**, *314* ( Pt 1), 145-150.
- [115] Leao, R.M.; Cruz, J.S.; Diniz, C.R.; Cordeiro, M.N.; Beirao, P.S. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology*, **2000**, *39*(10), 1756-1767.
- [116] Guatimosim, C.; Romano-Silva, M.A.; Cruz, J.S.; Beirao, P.S.; Kalapothakis, E.; Moraes-Santos, T.; Cordeiro, M.N.; Diniz, C.R.; Gomez, M.V.; Prado, M.A. A toxin from the spider Phoneutria nigriventer that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br. J. Pharmacol.*, **1997**, *122*(3), 591-597.
- [117] de Castro Junior, C.J.; Pinheiro, A.C.; Guatimosim, C.; Cordeiro, M.N.; Souza, A.H.; Richardson, M.; Romano-Silva, M.A.; Prado, M.A.; Gomez, M.V. Tx3-4 a toxin from the venom of spider Phoneutria nigriventer blocks calcium channels associated with exocytosis. *Neurosci. Lett.*, **2008**, *439*(2), 170-172.
- [118] Miranda, D.M.; Romano-Silva, M.A.; Kalapothakis, E.; Diniz, C.R.; Cordeiro, M.N.; Moraes-Santos, T.; De Marco, L.; Prado, M.A.; Gomez, M.V. Spider neurotoxins block the beta scorpion toxin-induced calcium uptake in rat brain cortical synaptosomes. *Brain Res. Bull.*, **2001**, *54*(5), 533-536.
- [119] Reis, H.J.; Prado, M.A.; Kalapothakis, E.; Cordeiro, M.N.; Diniz, C.R.; De Marco, L.A.; Gomez, M.V.; Romano-Silva, M.A. Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider Phoneutria nigriventer. *Biochem. J.*, **1999**, *343* Pt 2, 413-418.
- [120] Pinheiro, A.C.; da Silva, A.J.; Prado, M.A.; Cordeiro, M.D.; Richardson, M.; Batista, M.C.; de Castro Junior, C.J.; Massensini, A.R.; Guatimosim, C.; Romano-Silva, M.A.; Kushmerick, C.; Gomez, M.V. Phoneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus*, **2009**.
- [121] Pinheiro, A.C.; Gomez, R.S.; Massensini, A.R.; Cordeiro, M.N.; Richardson, M.; Romano-Silva, M.A.; Prado, M.A.; De Marco, L.; Gomez, M.V. Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider Phoneutria nigriventer. *Neurochem. Int.*, **2006**, *49*(5), 543-547.
- [122] Robinson, M.B.; Dowd, L.A. Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. *Adv. Pharmacol.*, **1997**, *37*, 69-115.
- [123] Siesjo, B.K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J. Neurosurg.*, **1992**, *77*(3), 337-354.
- [124] Siesjo, B.K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J. Neurosurg.*, **1992**, *77*(2), 169-184.
- [125] Milusheva, E.A.; Doda, M.; Baranyi, M.; Vizi, E.S. Effect of hypoxia and glucose deprivation on ATP level, adenylate energy charge and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>-dependent and independent release of [3H]dopamine in rat striatal slices. *Neurochem. Int.*, **1996**, *28*(5-6), 501-507.
- [126] Choi, D.W.; Maulucci-Gedde, M.; Kriegstein, A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.*, **1987**, *7*(2), 357-368.
- [127] Choi, D.W. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.*, **1992**, *23*(9), 1261-1276.
- [128] Choi, D.W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.*, **1995**, *18*(2), 58-60.
- [129] Miljanich, G.P.; Ramachandran, J. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1995**, *35*, 707-734.
- [130] Vieira, L.B.; Kushmerick, C.; Reis, H.J.; Diniz, C.R.; Cordeiro, M.N.; Prado, M.A.; Kalapothakis, E.; Romano-Silva, M.A.; Gomez, M.V. PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K<sup>+</sup>-evoked increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in synaptosomes. *Neurochem. Int.*, **2003**, *42*(4), 277-282.
- [131] Vieira, L.B.; Kushmerick, C.; Hildebrand, M.E.; Garcia, E.; Stea, A.; Cordeiro, M.N.; Richardson, M.; Gomez, M.V.; Snutch, T.P. Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2005**, *314*(3), 1370-1377.
- [132] Gribkoff, V.K. The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **2006**, *17*(5), 555-564.
- [133] Cury, Y.; Picolo, G. Are animal toxins good models for analgesics? In *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, 1 ed.; de Lima, M. E.; Pimenta, A. M. C.; Martin-Eauclaire, M.; Zingalli, R.; Rochat, H., Eds. Ed. UFMG, Belo Horizonte, **2009**; pp. 661-678.
- [134] Bailey, P.; Wilce, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. *Emerg. Med. (Fremantle)*, **2001**, *13*(1), 28-36.
- [135] Hogg, R.C. Novel approaches to pain relief using venom-derived peptides. *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*(26), 3191-3201.
- [136] Pimenta, A.M.; Stocklin, R.; Favreau, P.; Bougis, P.E.; Martin-Eauclaire, M.F. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of Tityus serrulatus (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, *15*(17), 1562-1572.
- [137] Nascimento, D.G.; Rates, B.; Santos, D.M.; Verano-Braga, T.; Barbosa-Silva, A.; Dutra, A.A.; Biondi, I.; Martin-Eauclaire, M.F.; De Lima, M.E.; Pimenta, A.M. Moving pieces in a taxonomic puzzle: venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon*, **2006**, *47*(6), 628-639.
- [138] Rates, B.; Ferraz, K.K.; Borges, M.H.; Richardson, M.; De Lima, M.E.; Pimenta, A.M. Tityus serrulatus venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. *Toxicon*, **2008**, *52*(5), 611-618.
- [139] Verano-Braga, T. *Minimização da estrutura primária do peptídeo TsHpt-I: identificação dos resíduos de aminoácidos cruciais e da estrutura peptídica mínima para a manutenção de seus efeitos antihipertensivos*. Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte, **2009**.

**APÊNDICE B** - *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing  
venom peptide diversity

RATES, B. *et al.* *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity.  
*Toxicon* [S.I.], v. 52, n. 5, p. 611-8, 2008.

## B1. Informações complementares

Posteriormente à publicação do estudo, as seqüências nele obtidas foram depositadas no banco de dados UniProt Knowledgebase. A tabela abaixo lista os nomes e números de acesso tal qual constam no UniProt Knowledgebase.

**Tabela B.1. Nomes e números de acesso no banco de dados UniProt Knowledgebase dos peptídeos seqüenciados em Rates, Ferraz *et al.*, 2008.**

Nº de acesso	Nome	Seqüência(s)
<a href="#">P86821</a>	Pape peptide	KQLLKEALAPEPAPEPAPEPAPEAAPEAAPEPAAAAPE KQLLKEALAPEPAPEP EPAPEPAPEPAPEAAPEAAPEPAAAA APEPAPEAAPEAAPEPA APEPAEPAAPEA APEAAPEPAAAAPE
<a href="#">P86822</a>	Potassium channel toxin beta-Ktx 2	KDKMKAGWER
<a href="#">P86823</a>	Beta-Ktx-like propeptide	GKGKEILGKIKE KIKEKLIEA
<a href="#">P86824</a>	Hypotensin-like peptide	ADVDFGTGIADSIK
<a href="#">P86825</a>	Venom peptide 1	KHFGKDSNFPFGT
	Venom peptide 2	KHFGKDSNFPF
	Venom peptide 3	YDRYEVVYR
<a href="#">P86826</a>	Venom peptide 4	YDRYEVVY
	Venom peptides 5	YDRYEVV
<a href="#">P86827</a>	Venom peptide 6	FGVLNFF
<a href="#">P86828</a>	Venom peptide 7	RLRSKGKK GLREKHVQ GLREKH LIPNDQLR LIPNDQLRS LIPNDQLRSILK LIPNDQLRSILKA VALIPNDQLRSIL KLVALIPNDQLRSIL KLVALIPNDQLRSILK KLVALIPNDQLRSILKAVVH IPNDQLRSILKAVVH SILKAVVH
<a href="#">P69940</a>	Potassium channel toxin TsTXK-beta; Potassium channel toxin beta-KTx 1; TSK2; Tityustoxin K-beta; TsTX K beta; TsTX-K beta; TsTXKbeta	
<a href="#">P84189</a>	Hypotensin-1	AEIDFSGIPEDIKQI

Foram omitidas as ambigüidades de seqüência e modificações pós-traducionais indicadas em Rates, Ferraz *et al.*, 2008.



As idéias expostas primeiro e sexto parágrafos da página 616 do artigo podem ser complementadas com as Tabelas B.2 e B.3, respectivamente.

**Tabela B.2.** Alinhamento *Hypotensin-like peptide*, seqüenciado por Rates, Ferraz *et al.*, 2008, com hipotensinas seqüenciadas previamente.

Nome	Nº de acesso	Seqüência
TsHpt-II	<a href="#">P84190</a>	AEIDFSGIPEDIIKEIKETNAKPPA
TsHpt-IV		AEIDFSGIPEDIIKEIKETNAKPP-
TsHpt-I	<a href="#">P84189</a>	AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA
TsHpt-III		AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPP-
Hypotensin-like peptide	<a href="#">P86824</a>	ADVDFGTGIADSIK-----
Consenso	N.A.	*::**:**.:.***

A diferenciação dos resíduos Ile/Leu e Lys/Gln no *Hypotensin-like peptide* foi baseada em sua similaridade com as hipotensinas previamente seqüenciadas. Alinhamento múltiplo de seqüências foi gerado por meio do *software* ClustalW 2.0.12 [vide (Rates, Silva *et al.*, 2011)], onde espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. N.A.: não-aplicável. As notações do consenso, nomeadamente, ‘\*’, ‘.’ e ‘:’, significam que os resíduos em uma dada coluna são idênticos em todas as seqüências, que substituições conservadas foram observadas e que substituições semi-conservadas foram observadas, respectivamente.

**Tabela B.3.** Alinhamento do fragmento do *Beta-Ktx-like propeptide*, seqüenciado por Rates, Ferraz *et al.*, 2008, com *Ponericin-L1* e *L2*.

Nome	Nº de acesso	Seqüência
Ponericin L1	<a href="#">P82421</a>	LLKELWTKMKGAGKAVLGKIKGLL
Ponericin L1	<a href="#">P82422</a>	LLKELWTKIKGAGKAVLGKIKGLL
Beta-Ktx-like propeptide	<a href="#">P86823</a>	-----GKGKEILGKIKE--
Consenso	N.A.	* ** :*****

A diferenciação dos resíduos Ile/Leu e Lys/Gln no *Beta-Ktx-like propeptide* foi baseada em sua similaridade com as toxinas TtrKIK (*Tityus trivitatus*) e TdiKIK (*Tityus discrepans*) previamente seqüenciadas. Alinhamento múltiplo de seqüências foi gerado por meio do *software* ClustalW 2.0.12 [vide (Rates, Silva *et al.*, 2011)], onde espaços (-) foram introduzidos para maximizar o alinhamento. N.A.: não-aplicável. As notações do consenso, nomeadamente, ‘\*’, ‘.’ e ‘:’, significam que os resíduos em uma dada coluna são idênticos em todas as seqüências, que substituições conservadas foram observadas e que substituições semi-conservadas foram observadas, respectivamente.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicol

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicol](http://www.elsevier.com/locate/toxicol)

## *Tityus serrulatus* venom peptidomics: Assessing venom peptide diversity

Breno Rates<sup>a,b</sup>, Karla K.F. Ferraz<sup>a,b</sup>, Márcia H. Borges<sup>c</sup>, Michael Richardson<sup>c</sup>,  
 Maria Elena De Lima<sup>a,b</sup>, Adriano M.C. Pimenta<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, Bloco O4, Sala 125, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>b</sup> Núcleo de Estudo de Estrutura e Função de Biomoléculas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>c</sup> Centro de Pesquisa Professor Carlos R. Diniz, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro 80, 30550-010, Belo Horizonte, MG, Brasil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 June 2008

Received in revised form 17 July 2008

Accepted 22 July 2008

Available online 31 July 2008

#### Keywords:

*Tityus serrulatus*

Venom

MALDI-TOF-TOF

*De novo* sequencing

### ABSTRACT

MALDI-TOF-TOF and *de novo* sequencing were employed to assess the *Tityus serrulatus* venom peptide diversity. Previous works has shown the cornucopia of molecular masses, ranging from 800 to 3000 Da, present in the venom from this and other scorpions species. This work reports the identification/sequencing of several of these peptides. The majority of the peptides found were fragments of larger venom toxins. For instance, 28 peptides could be identified as fragments from Pape proteins, 10 peptides corresponded to N-terminal fragments of the TsK $\beta$  (scorpine-like) toxin and fragments of potassium channel toxins (other than the k-beta) were sequenced as well. N-terminal fragments from the *T. serrulatus* hypotensins-I and II and a novel hypotensin-like peptide could also be found. This work also reports the sequencing of novel peptides without sequence similarities to other known molecules.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The classical approaches for the identification and characterization of bioactive components in scorpion venoms were based on function-to-structure studies which were directed by the ability of the toxins in inducing conspicuous pharmacological effects (Pimenta et al., 2001). Such approaches have successfully built a solid knowledge on the physiological effects and on the structure of several scorpion toxins (Possani et al., 2000; Pimenta et al., 2001; Rodriguez de la Vega and Possani, 2004, 2005; De Lima et al., 2007b). Most scorpion toxins contain three or four disulfide-bridges and can recognize and specifically

interact with ion channels including Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels (DeBin et al., 1993; Tytgat et al., 1999; Possani et al., 2000; Zeng et al., 2001; Goudet et al., 2002; Rodriguez de la Vega and Possani, 2004, 2005; De Lima et al., 2007b). Several hundred ion channel-targeting peptides have been isolated and characterized from nearly 20 species of scorpion (Zeng et al., 2005).

Recently, proteomic approaches have been employed in the assessment of scorpion (Pimenta et al., 2001; Goudet et al., 2002; Pimenta et al., 2003; Chen et al., 2005; Barona et al., 2006; Batista et al., 2006; Batista et al., 2007; Borges and Rojas-Runjaic, 2007; Schwartz et al., 2007; Bringans et al., 2008), other invertebrates (Escoubas et al., 2002; Machado et al., 2005; Pimenta et al., 2005; Favreau et al., 2006; Richardson et al., 2006; Liao et al., 2007; Rates et al., 2007) and vertebrates (Steinborner et al., 1997; Wabnitz et al., 1999; Fry et al., 2002; Fry et al., 2003; Li et al., 2004; Brinkworth et al., 2005; Calvete et al., 2007; Yanes et al., 2007; Olamendi-Portugal et al., 2008) toxin diversity. These modern structure-to-function approaches are conceptually

\* Corresponding author. Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, Bloco O4, Sala 125, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Tel.: +55 313499 2638.

E-mail address: [apimenta@icb.ufmg.br](mailto:apimenta@icb.ufmg.br) (A.M.C. Pimenta).

distinct from the above mentioned ‘classical’ approaches, once sequence similarities are used to direct the pharmacological characterization efforts.

Scorpion venoms also contain enzymes, nucleotides, lipids, biogenic amines, and other unidentified components (Almeida et al., 2002; Batista et al., 2006). Small and non-reticulated (without disulfide-bridges) peptides are also present in these venoms although only a limited number of sequences have been determined thus far (Pimenta and De Lima, 2005; Zeng et al., 2005). Such molecules may present a wide range of biological activities, such as bradykinin potentiating, antimicrobial, hemolytic, immune-modulating (Pimenta and De Lima, 2005; Zeng et al., 2005) and hormone-like activities (Pimenta and De Lima, 2005; Pimenta et al., 2005; Verano-Braga et al., 2008).

Due to the development of microscale analytical techniques, such as mass spectrometry, studies focused on peptides in the 800–3000 Da molecular mass range are becoming increasingly abundant. However, when compared to well-established state-of-the-art ion channel-targeting toxins, the structural and biological activity characterizations of small peptides from arthropod venoms are in their early stages (Pimenta and De Lima, 2005).

The scorpion *Tityus serrulatus* is the organism from its group (Scorpionidae) whose venom has been most extensively studied (De Lima and Martin-Eauclaire, 1995; Pimenta et al., 2001). Despite that, no studies have focused on the systematic sequence determination of small (800–3000 Da) un-reticulated peptides. This report, therefore, focuses on the *de novo* sequencing of such molecules through MALDI-TOF-TOF tandem mass spectrometry.

## 2. Materials and methods

All reagents and chemicals were analytical or spectroscopic grade.

### 2.1. Animals and venom extraction

Venom was extracted from several individuals by electrical stimulation directly on the hindmost abdominal segment. The venom was transferred to chilled acidified water (0.1% aqueous trifluoroacetic acid) and centrifuged (15,000 rpm for 5 min) to remove cellular debris and a mucous pellet. The supernatant fractions were lyophilized and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until required.

### 2.2. Liquid chromatography

Venom fractionation was performed using two different experimental setups. In the first setup, *T. serrulatus* pooled venom (5 mg) was applied to a Superdex Peptide 10/300 GL gel filtration column and eluted with 100 mM ammonium acetate buffer using a 0.5 mL/min flow rate. Elution was monitored by absorbance readings at 280 nm. The obtained fractions were further separated using reverse phase chromatographies (RPC), which were performed by using a Chromolith Performance RP-18 100/4.6 mm column

(Merck), with a 4.0 mL/min flow rate. Elution was monitored by absorbance readings at 214 nm.

In the second setup, *T. serrulatus* venom (250 mg) was applied to a Sephadex G-50 (Superfine) column and eluted with 0.15 M ammonium formate buffer, pH 6.5 using a 0.7 mL/min flow rate. Obtained fractions were pooled according to the chromatographic profile and then lyophilized. These fractions were further separated by high performance liquid chromatography (HPLC) in a preparative C4 reverse phase column (Vydac, USA) (flow rate 1.0 mL/min). These sub-fractions obtained were eluted in a second HPLC separation, using the analytical C4 reverse phase column (Vydac) (flow rate 1.0 mL/min) or were separated in a C18 reverse phase column (Vydac) (flow rate 1.0 mL/min). In this fractionation setup, elution was monitored by absorbance readings at 214 nm.

For all RPC analysis (in both setups) columns were previously equilibrated with 0.1% aqueous trifluoroacetic acid, and the compounds were eluted by a linear gradient 0.1% TFA in acetonitrile. The fractions eluted from the RPC column were subjected to MALDI-TOF-TOF analyses.

### 2.3. Mass spectrometry and data analyses

MS and tandem MS analysis were performed using a MALDI-TOF-TOF AutoFlex III<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics) instrument in positive/reflector mode controlled by the FlexControl<sup>TM</sup> software. Instrument calibration was achieved by using Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics) as reference and  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid was used as matrix. Samples were spotted to MTP AnchorChip<sup>TM</sup> 400/384 (Bruker Daltonics) targets using standard protocols for the dried droplet method.

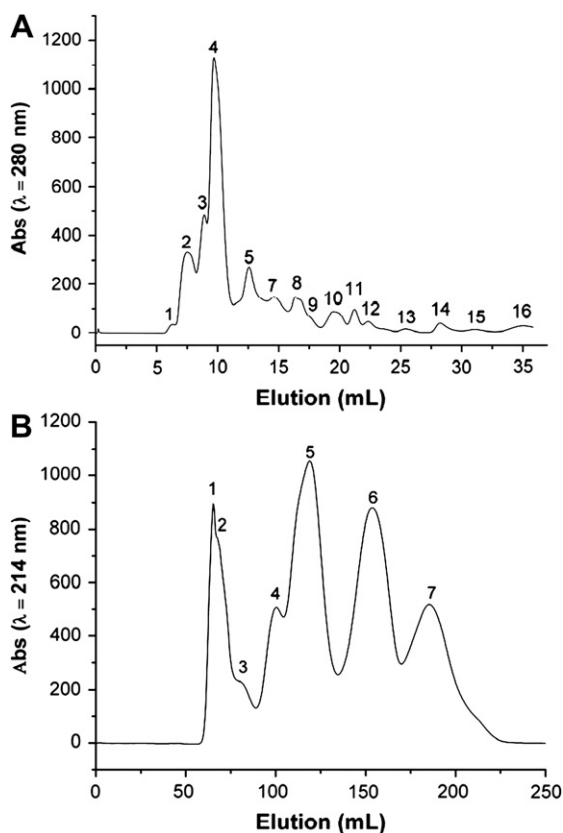
MS data analysis was performed by using the FlexAnalysis<sup>TM</sup> software (Bruker Daltonics). Peptide *de novo* sequencing was performed using a combination of manual and automatic data interpretation using the softwares FlexAnalysis<sup>TM</sup> and BioTools<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics). Alternatively, MS/MS data were exported as \*.txt files and then converted to the \*.dta extension. Then such files were imported into \*.psq files which are recognizable by the PepSeq<sup>TM</sup> (Micromass, UK) software which was also used for manual *de novo* sequencing.

Similarity searches were performed with the obtained sequences using the Fasta3 tool against the Swiss-Prot data Bank, as previously described (Pearson, 1990).

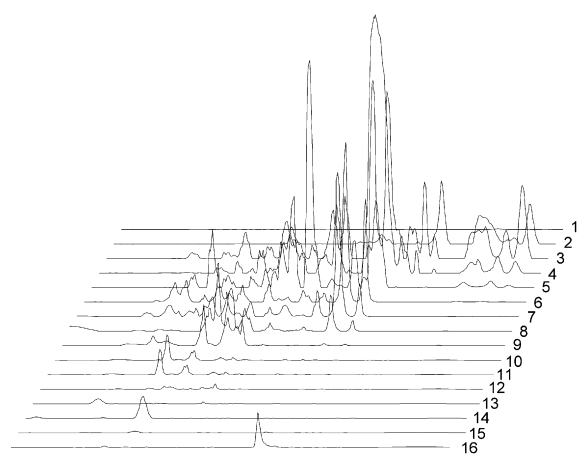
## 3. Results and discussion

### 3.1. Venom fractionation

The gel filtration step of the first venom fractionation setup yielded 16 fractions (Fig. 1A), which were further purified by RPC (Fig. 2). The gel filtration step of the second fractionation setup yielded 7 fractions (Fig. 1B) which were, also, further purified by RPC (data not shown). RPC fractions from both setups were submitted to MALDI-TOF-TOF analysis. Ions with sufficient signal intensities were submitted to MS/MS analyses.



**Fig. 1.** *Tityus serrulatus* venom fractionation through gel filtration. (A) Venom (5 mg) was applied to a gel filtration column (Superdex Peptide 10/300 GL) and eluted with 100 mM ammonium acetate buffer (0.5 mL/min flow rate). Fraction numbers are indicated. Elution was monitored by absorbance readings at 280 nm. (B) Venom (250 mg) was applied to a Sephadex G-50 (Superfine) column and eluted with 0.15 M ammonium formate buffer, pH 6.5 (0.7 mL/min flow rate). Elution was monitored by absorbance readings at 214 nm.



**Fig. 2.** Reverse phase chromatography (RPC) of *Tityus serrulatus* venom fractions obtained through in the gel filtration step (Superdex Peptide 10/300 GL). Column (Chromolith Performance RP-18 100/4.6 mm column) was equilibrated with 0.1% aqueous trifluoroacetic acid, and the compounds were eluted by a linear gradient 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile (4.0 mL/min flow rate). Elution was monitored at 214 nm. Fractions from gel filtration are numbered.

### 3.2. Peptide de novo sequencing and similarity searches

Through the above mentioned approach 29 peptides could be successfully sequenced. Table 1 depicts the obtained sequences. Some peptides display overlapping sequences.

The residues Leu/Ile and Gln/Lys could not be distinguished through the MS/MS data. However, such assignments could be suggested through similarity searches. Table 1 depicts the residues which received no differentiation.

The peptide K/QHFGK/QDSNFPPF displayed a C-terminal amidation. This was evidenced by a difference of 146 Da between ion b-10 and b-11 (b-max) and by the presence of the ion y-1 (165 Th) which corresponds to an amidated Phe. This fact could be further confirmed by the presence of a related peptide (K/QHFGK/QDSNFPPFGT) containing two additional C-terminal aminoacids, Gly-Thr. However, in this case, the difference between ions b-10 and b-11 and the difference between ions y-2 and y-3 corresponded to 147 Da. Fig. 3 illustrates the MS/MS spectra interpretation and the detailed ion interpretation relative to these peptides.

C-terminal amidation in scorpion venom peptides have been reported by several authors (Kuhn-Nentwig, 2003; Batista et al., 2004; Diego-Garcia et al., 2005; Zeng et al., 2005; Barona et al., 2006). The only enzyme known to catalyze this important modification is peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM): a (bifunctional) zymogen, giving rise to a monooxygenase (PHM) and a lyase (PAL) (Fan et al., 2000). Usually, PAM requires a Gly residue followed by a basic residue in order to catalyze the  $\alpha$ -amidation. However, it's been suggested that the presence of basic residues at the C-terminal of scorpion toxins may not be needed for the amidation process (Martin-Eauclaire et al., 1992). In light of these facts, two hypotheses arise: (i) either the peptide K/QHFGK/QDSNFPPF-NH<sub>2</sub> is matured through an unusual  $\alpha$ -amidation reaction carried out in the peptide K/QHFGK/QDSNFPPFGT or (ii) the propeptide of the peptide embodies a mutation (K13T or R13T) which enables it to 'escape' the amidating process.

The peptides K/QHFGK/QDSNFPPF-NH<sub>2</sub> and K/QHFGK/QDSNFPPFGT showed no similarity to other known sequences. Table 1 also depicts other novel peptides. The peptide YDRYEVVYR displayed two smaller variants lacking the C-terminal residues Arg and Arg-Tyr, respectively. The observed peptides FGVL/INFF and RL/IRSK/QGK/QK/Q, did not display sequence similarities to any other known proteins/peptides, hence the residues Leu/Ile and Lys/Gln could not be differentiated as for the other peptides sequenced in this study.

Table 1 depicts peptides which are clearly fragments from the Pape venom protein, despite the fact that database search renders no sequence similarities to other known peptides. The Pape protein was firstly reported in the venom from *Tityus stigmurus* (Batista et al., 2007). In this protein, the PAPE sequence, i.e. a tetrapeptide sequence (Pro-Ala-Pro-Glu), iteratively appears in the sequence from the position 16–31. Additionally, there are three proline-containing motifs (PEPAP, AAPE and PEPAAAAPE), thus, rendering 15 proline residues in a 42-residue molecule (Table 2). The partial sequencing of a Pape peptide has also



Table 1

Peptide sequences obtained from *Tityus serrulatus* venom

Peptide sequences obtained from <i>Tityus serrulatus</i> venom								
Sequence	[M+H] <sup>+</sup>	MW obs.	MW calc.	Δ	Identification	LC Setup*	GF retention (mL)	RPC retention (%ACN)
KDKMKAGWER	1.248,99	1.247,99	1.247,64	-0,35	β-KTx-like fragment	2	155	24
GKGKETILGKIKE	1.300,02	1.299,02	1.298,79	-0,23	β-KTx-like propeptide fragment	2	155	24
KIKEKLEIA	1.072,03	1.071,03	1.070,67	-0,36	β-KTx-like propeptide fragment	1	13	22
GLREKHVQ	966,83	965,83	965,54	-0,29	TsTX-Kβ propeptide	1	15	16
GLREKH	739,37	738,37	738,41	0,05	TsTX-Kβ propeptide fragment	1	15	16
LIPNDQLR	968,75	967,75	967,57	-0,18	TsTX-Kβ fragment	1	9	22
LIPNDQLRS	1.055,81	1.054,81	1.054,51	-0,30	TsTX-Kβ fragment	1	9	22
LIPNDQLRSILK	1.410,22	1.409,22	1.408,84	-0,38	TsTX-Kβ fragment	2	120	29
LIPNDQLRSILKA	1.481,32	1.480,32	1.479,88	-0,44	TsTX-Kβ fragment	2	120	30
VALIPNDQLRSIL	1.452,14	1.451,14	1.450,85	-0,29	TsTX-Kβ fragment	1	9	32
KLVALIPNDQLRSIL	1.693,34	1.692,34	1.692,03	-0,31	TsTX-Kβ fragment	1	9	32
KLVALIPNDQLRSILK	1.821,43	1.820,43	1.820,12	-0,31	TsTX-Kβ fragment	1	9	32
KLVALIPNDQLRSILKAVVH	2.227,65	2.226,65	2.226,35	-0,30	TsTX-Kβ fragment	2	65	60
IPNDQLRSILKAVVH	1.703,48	1.702,48	1.701,99	-0,49	TsTX-Kβ fragment	2	120	34
SILKAVVH	866,50	865,50	865,54	0,04	TsTX-Kβ fragment	2	65	45
ADVDFTGIADSIK	1.465,02	1.464,02	1.463,75	-0,27	Hypotensin-like (novel)	2	155	33
AEIDFSGIPEDIKQI	1.788,41	1.787,41	1.786,93	-0,48	Hypotensin-1	1	13	57
QQLLKEALAPEPAPEP	1.731,54	1.730,54	1.729,96	-0,58	Pape fragment	2	9	26
EPAPEPAPEPAPEAAPEPAPEAAAA	2.054,27	2.053,27	2.052,96	-0,31	Pape fragment	1	9	21
APEPAPEAAPEAAPEPA	1.615,25	1.614,25	1.613,76	-0,50	Pape fragment	1	10	19
APEPAPEAAPEA	1.149,72	1.148,72	1.148,53	-0,19	Pape fragment	1	9	19
APEAAPEPAPEAAPE	1.291,82	1.290,82	1.290,61	-0,21	Pape fragment	1	9	19
<b>KHFGKDSNFFP-NH<sub>2</sub></b>	1.322,80	1.321,80	1.321,62	-0,18	Novel (no hits)	2	6	33
<b>KHFGKDSNFFPFGT</b>	1.481,97	1.480,97	1.480,67	-0,30	Novel (no hits)	2	155	32
<b>YDRYEVV</b>	943,42	942,42	942,44	0,02	Novel (no hits)	1	18	22
<b>YDRYEVVY</b>	1.106,57	1.105,57	1.105,47	-0,10	Novel (no hits)	1	18	23
<b>YDRYEVVYR</b>	1.262,60	1.261,60	1.261,55	-0,05	Novel (no hits)	1	18	9
<b>FGVLNFF</b>	843,46	842,46	842,43	-0,02	Novel (no hits)	1	20	39
<b>RLRSKGKK</b>	972,46	971,46	971,51	0,05	Novel (no hits)	2	186	26

Bold letters stand for undifferentiated Lys/Gln or Leu/Ile residues. \*LC Setup 1: Gel filtration with Superdex Peptide 10/300 GL column followed by RPC with Chromolith Performance RP-18 column. LC Setup 2: Gel filtration with Sephadex G-5 column followed by RPC with RPC C4 or C18 column.

been determined by Edman degradation, although containing a K15E mutation (See Table 2).

The C-terminal (residues 33–49) region of the peptide Tco 36.14-2 from the venom of the scorpion *Tityus costatus* is also related to the Pape peptides, presenting the repeating PEPAA motif in the region stretching from residues 20–49. Tco 36.14-2 was reported as a 'non-toxic' component, and its first 24 N-terminal amino acid residues display similarities with BmKbpp, a bradykinin-potentiating peptide (BPP) from the scorpion *Buthus martensii* and with an antimicrobial peptide named parabutoporin, from the scorpion *Parabuthus schlechteri* (Diego-Garcia et al., 2005). Interestingly, BmKbpp has a C-terminal segment containing the motif PEEAAPEA (Zeng et al., 2005) and it displays sequence similarities with the BPP K12 from *Buthus occitanus* (Meki et al., 1995) (see Table 2).

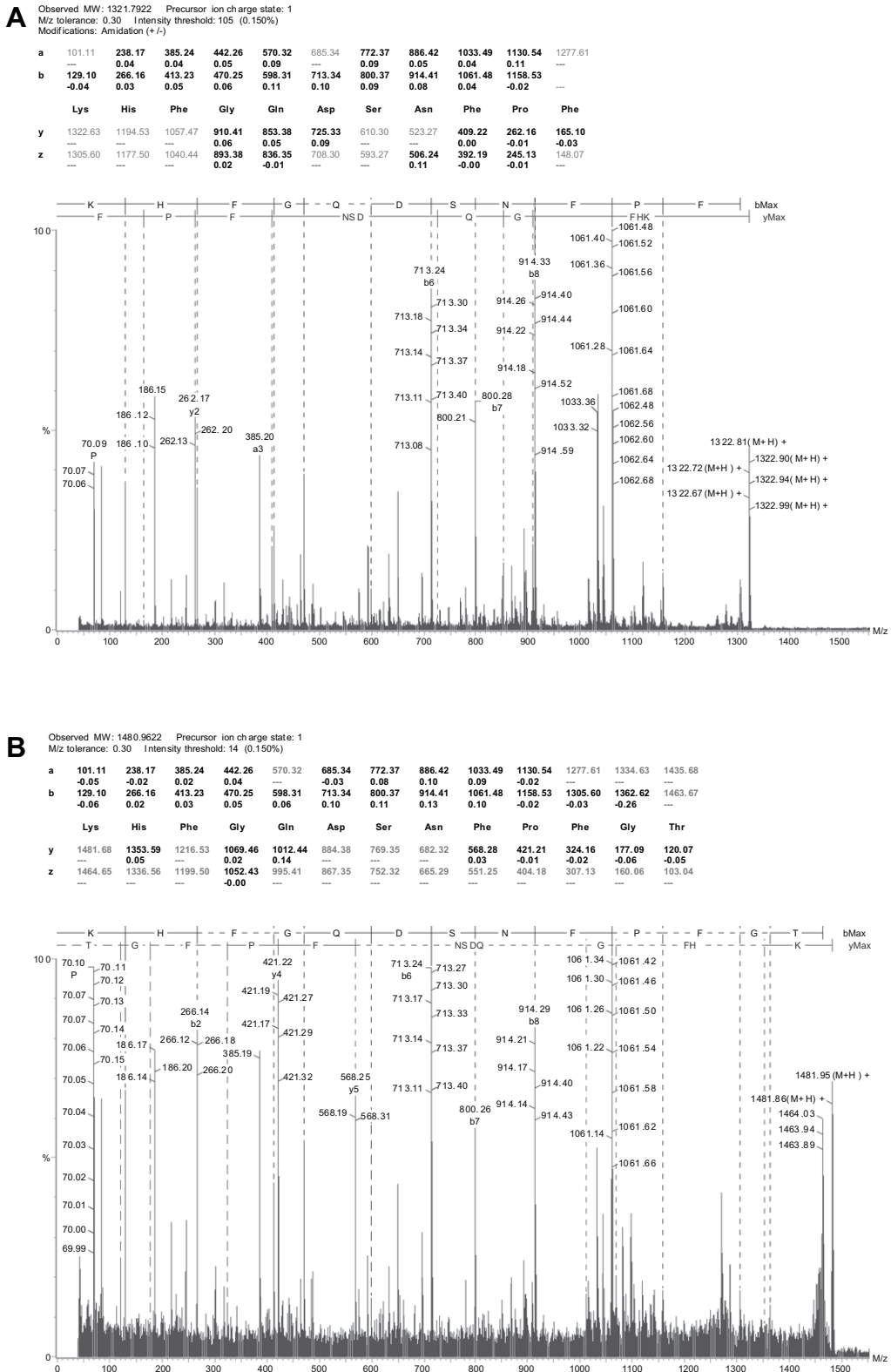
Another group of BPPs from scorpion venoms includes the *T. serrulatus* hypotensins (TsHpt). These peptides promote strong and long-lasting hypotension when administered to rats, via bradykinin potentiation (De Lima et al., 2003; De Lima et al., 2007a; Verano-Braga et al., 2008). A possible mechanism is the direct activation of bradykinin receptors, leading to a NO release is also being investigated. As previously noted by other authors (Pimenta and De Lima, 2005), the TsHpts and peptide K12 from *B. occitanus* share a common structural feature, the presence of a C-terminal PPA motif (Table 3). Additionally, structure minimization studies from the TsHpts, conducted by our group (Verano-Braga, unpublished results) have shown that the C-terminal portion of TsHpts, which

contains the PPA motif, is important to reproduce some of the pharmacological effects observed for the native TsHpts.

Through our MS/MS data it was possible to identify 23 Pape-related peptides, besides those depicted in Table 1. The presence of the ions 169 [Pro + Ala + H]<sup>+</sup>, 227 [Pro + Glu + H]<sup>+</sup>, 298 [Pro + Glu + Ala + H]<sup>+</sup>, 369 [Pro + Glu + (2 × Ala) + H]<sup>+</sup>, 382 [Pro + (4 × Ala) + H]<sup>+</sup> and 395 [(2 × Pro) + (Glu + Ala) + H]<sup>+</sup> could be noticed as MS/MS signatures of these peptides (Table 3). These peptides displayed a great number of internal fragments, generating several sequence possibilities, thus, rendering the *de novo* sequence interpretation a cumbersome task. The mass difference between adjacent ions usually corresponded to Pro, Ala and/or Glu residues, thus providing an additional evidence of the relationship of these peptides to Pape.

The biological relevance of the presence of these Pape-fragments remains an open question. It has been suggested that proline residues may promote the appearance artifact ions due to fragmentations during MS analysis (Batista et al., 2004). However, for the MS analyses performed in this study, laser was set to the minimal intensity required to promote sample ionization. Additionally, Pape-fragments could be observed in different fractions and in different fractionations setups (see Table 3).

Complementarily to these findings, we have sequenced an N-terminal fragment (AEIDFSGIPEDIKQI) from TsHpt-II and TsHpt-III (TsHpt-III is identical to TsHpt-II without the C-terminal Ala residue). The complementary C-terminal fragment could not be observed although it is reasonable to think that this peptide may be present in the venom. The



**Fig. 3.** MS/MS spectra interpretation for peptides K/QHFGK/QDSNFPF-NH<sub>2</sub> (A) and K/QHFGK/QDSNFPFGT (B). Calculated values for a, b, y and z ions are shown. Observed ions and their mass differences are depicted in bold. Observed MW: 1321.79 Da (A) and 1480.96 (B). Precursor charge state: 1. *m/z* Tolerance 0.3. Intensity threshold: 0.15%. Lys/Gln residues were not differentiated.

**Table 2**  
PAPE, bradykinin potentiating and hypotensive peptides from Buthid venoms

Species	Name	Sequence	Reference
<i>Tityus stigmurus</i>	Pape	KQLLKEALAPEPAKPAPEPAPEAAPEAAPEAAAAPEAAPE	Batista et al., 2007
<i>Tityus serrulatus</i>	Ts4-11-5	KQLLKEALAPEPAPEPAPEAAPEAAPEAAAAAP...	Original result
<i>Tityus costatus</i>	Tco36.14-2	KRFWRSKLVRRLRAKGGKQLLNEALAPEPKPEAAPEAAPEAAPEAA	Diego-Garcia et al., 2005
<i>Buthus martensii</i>	BmKbpp	RFGSFLKVKVWKSCLKAKLRSGKQLLKDYANKVLNGPEEEAAAPAE	Zeng et al., 2000
<i>Tityus serrulatus</i>	TsHpt-I	AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA	Verano-Braga et al., 2008
<i>Tityus serrulatus</i>	TsHpt-II	AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA	Verano-Braga et al., 2008
<i>Tityus serrulatus</i>	TsHpt-III	AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPP	Verano-Braga et al., 2008
<i>Tityus serrulatus</i>	TsHpt-IV	AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPP	Verano-Braga et al., 2008
<i>Buthus occitanus</i>	K12	LRDYANRVINGGVPVEAAGPPA	Meki et al., 1995

peptide ADVDFGTGIADSIK is highly similar to the N-terminal region of the TsHpt family (see Table 1). It may be suggested that it is a fragment from a novel TsHpt isoform.

Another group of peptides that preponderantly contribute to the peptide diversity in the *T. serrulatus* venom is the one composed by the N-terminal fragments of the scorpine-like potassium channel toxin TsTX-K $\beta$ . Ten isoforms of such peptides could be sequenced (Table 1). The scorpine-like and their close relatives  $\beta$ -KTx peptides are widely distributed within the Buthidae family and their presence has also been reported in the venoms of scorpions from the family Iuridae (Diego-Garcia et al., 2007). These toxins are characterized by an extended non-reticulated N-terminal segment followed by a Cys-rich domain which resembles the invertebrate defensin peptides. The biological actions of these chimerical peptides consist of simultaneous cytolytic/antimicrobial and K $^+$  channel blocking activity. It has been

proposed that the N-terminal domain is responsible for the cytolytic/antimicrobial activity whilst the C-terminal is responsible for the K $^+$  channel blocking effect (Diego-Garcia et al., 2008). Therefore one can hypothesize that some of the observed N-terminal fragments of TsTX-K $\beta$  may retain the cytolytic/antimicrobial activities of the native toxin.

It is noteworthy the fact that peptide GLREKHVQ corresponds to the pro-peptide of TsTX-K $\beta$ . A smaller fragment of this TsTX-K $\beta$  pro-peptide could also be found (GLREKH). It is worth investigating whether these peptides are only the product of TsTX-K $\beta$  posttranslational maturation process or they embody some other biological activity of their own.

Similarly, we found the overlapping peptides GKGKEILGKIKE and KIKEKLIEA which are likely to be fragments from the pro-peptide region of a  $\beta$ -KTx-like peptide, similar to toxins TtrKIK (from *Tityus trivittatus*) and TdiKIK (from *Tityus discrepans*). Additionally, the peptide KDKMKAGWER is similar to the very N-terminal region from TtrKIK. Fig. 4 illustrates the facts described above.

GKGKEILGKIKE also displays similarities with the peptides Ponericin-L1 and Ponericin-L2, from the venom of the ponerine ant *Pachycondyla goeldii*. These peptides have both insecticidal and antimicrobial activities (Orivel et al., 2001), which reinforces the assumption that these toxin pro-peptide fragments may have some other interesting biological activities.

#### 4. Conclusions

This work represents a further step towards the comprehension of *T. serrulatus* venom peptide diversity and venom biology. Fortunately, the nature of the molecules targeted in this study is favorable to their chemical synthesis which eliminates the need for time consuming purification of native molecules for their pharmacological characterization. Some of the peptides shown in this article are being addressed by means of solid-phase synthesis to

**Table 3**  
Non-sequenced Pape-fragments from *Tityus serrulatus* venom

[M + H] $^+$	LC setup <sup>a</sup>	GF retention (mL)	RPC retention (%ACN)
929.58	2	72	23
942.68	1	10	19
968.55	2	72	23
994.54	2	65	43
1042.97	1	13	22
1055.58	2	72	23
1149.72	1	9	19
1207.73	2	72	13
1242.03	1	10	19
1248.97	1	10	19
1291.82	1	9	19
1474.76	2	65	13
1570.27	1	10	19
1615.25	1	10	19
1660.29	1	10	19
1704.83	2	72	13
1731.54	2	120	26
1801.85	2	72	1
1868.74	2	187	26
1921.92	2	65	43
1963.89	2	72	1
2011.49	1	10	19
2054.27	1	9	21
2237.11	2	65	45
2467.18	2	72	1
2493.21	2	65	13
2493.21	2	65	45
2978.17	1	10	23

<sup>a</sup> LC setup 1: gel filtration with Superdex Peptide 10/300 GL column followed by RPC with Chromolith Performance RP-18 column. LC setup 2: gel filtration with Sephadex G-5 column followed by RPC with RPC C4 or C18 column.

```

Ts frag      -----KIKEKLIEA
Ts frag      GKGKEILGKIKE-----
Ts frag      -----KDKMKAGWER
TtrKIK      VHSLTEAGKGKEILGKIKDKLIEAKDKIKSGWER
Consensus   GKGKEILGKIK.KLIEAKDK.K.GWER

```

**Fig. 4.** Alignment of *Tityus serrulatus* peptide fragments (Ts frag) with the potassium channel toxin TtrKIK precursor from *Tityus trivittatus*. Bold letters indicates the signal peptide, underlining indicates the propeptide.

assess their biological functions and the results will be published elsewhere.

Molecules from the *T. serrulatus* venom have already been used as leads in the development of new drugs (De Lima et al., 2003; De Lima et al., 2007a). Nonetheless, the molecules here characterized open new possibilities for the biotechnological application of animal toxins.

## Acknowledgements

This work was funded by FINEP/FAPEMIG (Rede Proteoma Nacional), CAPES, FAPEMIG/PRONEX and CNPq.

## Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

- Almeida, F.M., Pimenta, A.M., De Figueiredo, S.G., Santoro, M.M., Martin-Eauclaire, M.F., Diniz, C.R., De Lima, M.E., 2002. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon* 40 (7), 1041–1045.
- Barona, J., Batista, C.V., Zamudio, F.Z., Gomez-Lagunas, F., Wanke, E., Otero, R., Possani, L.D., 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1764 (1), 76–84.
- Batista, C.V., D'Suza, G., Gomez-Lagunas, F., Zamudio, F.Z., Encarnacion, S., Sevcik, C., Possani, L.D., 2006. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics* 6 (12), 3718–3727.
- Batista, C.V., Roman-Gonzalez, S.A., Salas-Castillo, S.P., Zamudio, F.Z., Gomez-Lagunas, F., Possani, L.D., 2007. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146 (1–2), 147–157.
- Batista, C.V.F., del Pozo, L., Zamudio, F.Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E., Possani, L.D., 2004. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J. Chromatogr. B* 803 (1), 55–66.
- Borges, A., Rojas-Runjaic, F.J., 2007. *Tityus perijanensis* Gonzalez-Sponga (Scorpiones, Buthidae): molecular assessment of its geographical distribution and venom lethality of Venezuelan populations. *Toxicon* 50 (7), 1005–1010.
- Bringans, S., Eriksen, S., Kendrick, T., Gopalakrishnakone, P., Livk, A., Lock, R., Lipscombe, R., 2008. Proteomic analysis of the venom of *Heterometrus longimanus* (Asian black scorpion). *Proteomics* 8 (5), 1081–1096.
- Brinkworth, C.S., Bowie, J.H., Bilusich, D., Tyler, M.J., 2005. The rothein peptides from the skin secretion of Roth's tree frog *Litoria rothii*. Sequence determination using positive and negative ion electrospray mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 19 (18), 2716–2724.
- Calvete, J.J., Marcinkiewicz, C., Sanz, L., 2007. Snake venomomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabinon-1 and bitisgabinon-2. *J. Proteome Res.* 6, 326–336.
- Chen, T., Walker, B., Zhou, M., Shaw, C., 2005. Molecular cloning of a novel putative potassium channel-blocking neurotoxin from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi*. *Peptides* 26 (5), 731–736.
- De Lima, M.E., Diniz, C.R., Diniz, M.C.R., Dos Santos, A.S., Bougis, P.E., Eauclaire, M.F., Pimenta, A.M., 2007a. Synthesis, modification and reduction of primary structure of hypotensive peptides present in scorpion venom for optimizing their use as a hypotensive medication. USPTO, 20070275901.
- De Lima, M.E., Diniz, C.R., Dos Santos, R.A.S., Bougis, P.E., Eauclaire, M.F., Pimenta, A.M.C., 2003. Scorpion peptide as hypotensive agent. Organization, W.I.P., PCT/BR2003/000073.
- De Lima, M.E., Figueiredo, S.G., Pimenta, A.M., Santos, D.M., Borges, M.H., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Oliveira, L.C., Stankiewicz, M., Pelhate, M., 2007b. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146 (1–2), 264–279.
- De Lima, M.E., Martin-Eauclaire, M.-F., 1995. The toxins purified from *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello) venom. *Toxin Rev.* 14, 457–481.
- DeBin, J.A., Maggio, J.E., Strichartz, G.R., 1993. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol.* 264 (2 Pt 1), C361–C369.
- Diego-Garcia, E., Abdel-Mottaleb, Y., Schwartz, E.F., de la Vega, R.C., Tytgat, J., Possani, L.D., 2008. Cytolytic and K<sup>+</sup> channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cell. Mol. Life. Sci.* 65 (1), 187–200.
- Diego-Garcia, E., Batista, C.V.F., Garcia-Gomez, B.I., Lucas, S., Candido, D.M., Gomez-Lagunas, F., Possani, L.D., 2005. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon* 45 (3), 273–283.
- Diego-Garcia, E., Schwartz, E.F., D'Suza, G., Gonzalez, S.A.R., Batista, C.V.F., Garcia, B.I., de la Vega, R.C.R., Possani, L.D., 2007. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain [beta]-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. *Peptides* 28 (1), 31–37.
- Escoubas, P., Corzo, G., Whiteley, B.J., Celerier, M.L., Nakajima, T., 2002. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 16 (5), 403–413.
- Fan, X., Spijker, S., Akalal, D.B., Nagle, G.T., 2000. Neuropeptide amidation: cloning of a bifunctional alpha-amidating enzyme from *Aplysia*. *Brain Res.* 82 (1–2), 25–34.
- Favreau, P., Menin, L., Michalet, S., Perret, F., Cheneval, O., Stocklin, M., Bulet, P., Stocklin, R., 2006. Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: case applications with single arthropod specimen. *Toxicon* 47 (6), 676–687.
- Fry, B.G., Wickramaratna, J.C., Hodgson, W.C., Alewood, P.F., Kini, R.M., Ho, H., Wuster, W., 2002. Electrospray liquid chromatography/mass spectrometry fingerprinting of *Acanthophis* (death adder) venoms: taxonomic and toxicological implications. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 16 (6), 600–608.
- Fry, B.G., Wuster, W., Ryan Ramjan, S.F., Jackson, T., Martelli, P., Kini, R.M., 2003. Analysis of *Colubroidea* snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxicological implications. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 17 (18), 2047–2062.
- Goudet, C., Chi, C.W., Tytgat, J., 2002. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 40, 1239–1258.
- Kuhn-Nentwig, L., 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell. Mol. Life. Sci.* 60 (12), 2651–2668.
- Li, S., Wang, J., Zhang, X., Ren, Y., Wang, N., Zhao, K., Chen, X., Zhao, C., Li, X., Shao, J., Yin, J., West, M.B., Xu, N., Liu, S., 2004. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. *Biochem. J.* 384 (Pt 1), 119–127.
- Liao, Z., Cao, J., Li, S., Yan, X., Hu, W., He, Q., Chen, J., Tang, J., Xie, J., Liang, S., 2007. Proteomic and peptidomic analysis of the venom from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Proteomics* 7 (11), 1892–1907.
- Machado, L.F., Laugesen, S., Botelho, E.D., Ricart, C.A., Fontes, W., Barbaro, K.C., Roepstorff, P., Sousa, M.V., 2005. Proteomic analysis of brown spider venom: identification of lox necrogin isoforms in *Loxoseles gaucho* venom. *Proteomics* 5 (8), 2167–2176.
- Martin-Eauclaire, M.F., Ceard, B., Ribeiro, A.M., Diniz, C.R., Rochat, H., Bougis, P.E., 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS Lett.* 302 (3), 220–222.
- Meki, A.R., Nassar, A.Y., Rochat, H., 1995. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides* 16 (8), 1359–1365.
- Olamendi-Portugal, T., Batista, C.V., Restano-Cassulini, R., Pando, V., Villahernandez, O., Zavaleta-Martinez-Vargas, A., Salas-Arruz, M.C., de la Vega, R.C., Becerril, B., Possani, L.D., 2008. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*.
- Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J.P., Krier, F., Revol-Junelles, A.M., Longeon, A., Chaffotte, A., Dejean, A., Rossier, J., 2001. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *J. Biol. Chem.* 276 (21), 17823–17829.



- Pearson, W.R., 1990. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Meth. Enzymol.* 183, 63–98.
- Pimenta, A.M., De Lima, M.E., 2005. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *J. Pept. Sci.* 11, 670–676.
- Pimenta, A.M., De Marco Almeida, F., de Lima, M.E., Martin-Eauclaire, M.F., Bougis, P.E., 2003. Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 17 (5), 413–418.
- Pimenta, A.M., Rates, B., Bloch Jr., C., Gomes, P.C., Santoro, M.M., de Lima, M.E., Richardson, M., Cordeiro M do, N., 2005. Electrospray ionization quadrupole time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometric analyses to solve micro-heterogeneity in post-translationally modified peptides from *Phoneutria nigriventris* (Aranea, Ctenidae) venom. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 19 (1), 31–37.
- Pimenta, A.M., Stocklin, R., Favreau, P., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F., 2001. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 15 (17), 1562–1572.
- Possani, L.D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., Becerril, B., 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 82 (9–10), 861–868.
- Rates, B., Bemquerer, M.P., Richardson, M., Borges, M.H., Morales, R.A., De Lima, M.E., Pimenta, A.M., 2007. Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha): shedding light on venoms from a neglected group. *Toxicon* 49 (6), 810–826.
- Richardson, M., Pimenta, A.M., Bemquerer, M.P., Santoro, M.M., Beirao, P.S., Lima, M.E., Figueiredo, S.G., Bloch Jr., C., Vasconcelos, E.A., Campos, F.A., Gomes, P.C., Cordeiro, M.N., 2006. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 142 (3–4), 173–187.
- Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2004. Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup>-channels. *Toxicon* 43 (8), 865–875.
- Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon* 46 (8), 831–844.
- Schwartz, E.F., Diego-Garcia, E., Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2007. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC Genomics* 8, 119.
- Steinborner, S.T., Waugh, R.J., Bowie, J.H., Tyler, M.J., 1997. New caerin antibacterial peptides from the skin glands of the Australian tree frog *Litoria xanthomera*. Part 2. Sequence determination using mass spectrometry and associated techniques. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 11 (9), 997–1000.
- Tytgat, J., Chandy, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., Martin-Eauclaire, M.F., van der Walt, J.J., Possani, L.D., 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends. Pharmacol. Sci.* 20 (11), 444–447.
- Verano-Braga, T., Rocha-Resende, C., Silva, D.M., Ianzer, D., Martin-Eauclaire, M.F., Bougis, P.E., De Lima, M.E., Santos, R.A.S., Pimenta, A.M.C., 2008. *Tityus serrulatus* hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371 (3), 515–520.
- Wabnitz, P.A., Bowie, J.H., Tyler, M.J., 1999. Caerulein-like peptides from the skin glands of the Australian Blue Mountains tree frog *Litoria citropa*. Part 1. Sequence determination using electrospray mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 13 (24), 2498–2502.
- Yanes, O., Aviles, F.X., Wenzel, R., Nazabal, A., Zenobi, R., Calvete, J.J., 2007. Proteomic profiling of a snake venom using high mass detection MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 18 (4), 600–606.
- Zeng, X.C., Li, W.X., Peng, F., Zhu, Z.H., 2000. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *IUBMB life* 49 (3), 207–210.
- Zeng, X.C., Corzo, G., Hahin, R., 2005. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life* 57 (1), 13–21.
- Zeng, X.C., Peng, F., Luo, F., Zhu, S.Y., Liu, H., Li, W.X., 2001. Molecular cloning and characterization of four scorpion K(+) toxin-like peptides: a new subfamily of venom peptides (alpha-KTx14) and genomic analysis of a member. *Biochimie* 83 (9), 883–889.

**APÊNDICE C** - Peptidomic dissection of the skin secretion of  
*Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae,  
Phyllomedusinae)

RATES, B. *et al.* Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). *Toxicon* [S.I.], v. 57, n. 1, p. 35-52, 2011.

## C1. Errata

Na legenda das Tabelas 6 e 7 de Rates, Silva *et al.*, 2011 lê-se “*Underlining indicates sequence confirmation by Edman degradation*”. No entanto, no corpo dessas tabelas, a formatação sublinhada foi erroneamente perdida na versão final do artigo. Abaixo encontram-se as tabelas em sua formatação originalmente pretendida.

**Tabela C.1. Table 6 de Rates, Silva *et al.*, 2011 com formatação original**

**Table 6 - Amino acid sequence alignment and molecular mass of the *Phasmahyla jandaia* Phylloseptins (PLS-J) and their identified truncated forms**

peptide name	sequence	experimental mass (Da)	theoretical mass (Da)	accession number
Full length peptides				
PLS-J1	FLSLIPHAINAISAIA <sup>a</sup> NHFa	2047.2	2047.1	P86614
PLS-J2	FLSLIPHAINAISAIA <sup>a</sup> DHFa	2048.1	2048.1	P86615
PLS-J3	FLSLIPHAINAISAIA <sup>a</sup> NHLa	2013.2	2013.2	P86616
PLS-J4	FLSLIPHAINAISAIA <sup>a</sup> HHLa	2036.1	2036.2	P86617
PLS-J5	<u>FLSLIPH<sup>a</sup>SAISAIA<sup>a</sup>HHLa</u>	2009.3	2009.2	P86618
PLS-J6	FLSLIPH <sup>a</sup> SAISAIA <sup>a</sup> NHLa	1986.3	1986.1	P86619
PLS-J7	FLSLIPH <sup>a</sup> SAISAIA <sup>a</sup> DHLa	1987.1	1987.1	P86620
Consensus	*****.*****.*:	N.A.	N.A.	N.A.
Truncated forms				
PLS-J1[1-12]	FLSLIPHAINAI-----	1307.8	1307.8	N.A.
PLS-J5[1-12]	FLSLIPH <sup>a</sup> SAI-----	1280.7	1280.7	N.A.
PLS-J5[1-14]	FLSLIPH <sup>a</sup> SAISA-----	1438.7	1438.8	N.A.
PLS-J3[3-19]	--SLIPHAINAISAIA <sup>a</sup> NHLa	1752.8	1753.0	N.A.
PLS-J4[3-19]	--SLIPHAINAISAIA <sup>a</sup> HHLa	1776.1	1776.0	N.A.
PLS-J5[3-19]	--SLIPH <sup>a</sup> SAISAIA <sup>a</sup> HHLa	1748.9	1749.0	N.A.
PLS-J6[3-19]	--SLIPH <sup>a</sup> SAISAIA <sup>a</sup> NHLa	1726.0	1726.0	N.A.
PLS-J1[4-19]	---LIPHAINAISAIA <sup>a</sup> NHFa	1699.8	1700.0	N.A.
PLS-J1[5-19]	----IPHAINAISAIA <sup>a</sup> NHFa	1586.9	1586.9	N.A.
PLS-J5[5-19]	----IPH <sup>a</sup> SAISAIA <sup>a</sup> HHLa	1548.9	1548.9	N.A.

Underlining indicates sequence confirmation by Edman degradation. The identity of the C-terminal Leu residue in PLS-J4[3-19] and PLS-J6[3-19] was determined by the verification of its corresponding  $w_{al}$  ion in high-resolution MSMS spectrum. The identity of the C-terminal Leu residue in PLS-J3 to PLS-J7, and in their truncated forms, was suggested based on its correspondence to PLS-J4[3-19] and PLS-J6[3-19]. Differentiation of the remaining Ile/Leu residues in PLS-J1 to PLS-J4, PLS-J6 and PLS-J7 was based upon similarity to PLS-J5. Lower case ‘a’ indicates C-terminal amidation. Multiple sequence alignment of full-length peptides generated using ClustalW 2.0.12. ‘N.A.’ stands for non-applicable. Consensus symbols, namely ‘\*’, ‘.’ and ‘:’, means that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment, that conserved substitutions have been observed, and that semi-conserved substitutions are observed, respectively.

Tabela C.2. Table 7 de Rates, Silva *et al.*, 2011 com formatação originalTable 7 - Amino acid sequence alignment and molecular mass of the *Phasmahyla jandaia* Dermaseptins (DRS-J) and Dermatoxins (DRT-J) and their identified truncated forms

peptide name	sequence	exp. mass (Da)	theor. mass (Da)	Accession number
<b>Dermaseptins</b>				
DRS-J1	GLWKNMLSGIGKLAGQAALGAVKTLVa	2594.3	2594.5	P86635
DRS-J2	GLWKNMLSGIGKLAGQAALGAVKTLVa	2595.4	2595.5	P86636
DRS-J3	ALWKNMLSGIGKLAGQAALGAVKTLVa	2608.4	2608.5	P86637
DRS-J4	ALWKDMLSGIGKLAGQAALGAVKTLVa	2609.3	2609.5	P86638
DRS-J5	GLWSKIKEAGKAAVKAAGKAALGAVANSVa	2764.4	2764.6	P86683
DRS-J6	GLWSKIKEAGKAAVKAAGKAALGAVADSVa	2765.4	2765.6	P86684
DRS-J7	GLWSKIKAAGKEAAKAAKAAGKAALNAVSEAVa	3149.9	3149.8	P86639
DRS-J8	GLWKSLLKNVGKAAGKAALNAVTDVMVnQA	2967.5	2967.6	P86640
DRS-J9	GLWKSLLKNVGKAAGKAALNAVTDVMVnQS	2983.5	2983.6	P86641
DRS-J10	<u>ALWKSLLKGAGQLVGGVVQHFMGSQGQPES</u>	3108.6	3108.6	P86642
<b>Truncated forms</b>				
DRS-J7[3-33]	--WSKIKAAGKEAAKAAKAAGKAALNAVSEAVa	2980.0	2979.7	N.A.
<b>Dermatoxins</b>				
DRT-J1	SLGGFLKGVGKALAGVGKVVADQFGNLLQAGQa	3098.0	3097.7	P86621
DRT-J2	SLGGFLKGVGKALAGVGKVVADQFGNLLQAGQa	3129.6	3129.7	P86622
DRT-J3	SLGGFLKGVGKVLAVGKVVADQFGNLLQAGQa	3126.9	3126.8	P86623
Consensus	***** . ***** ; ***** ; ***	N.A.	N.A.	N.A.

Underlining indicates sequence confirmation by Edman degradation. Differentiation of Ile/Leu and Lys/Gln residues in DRS-J1, DRS-J2, DRS-J3 and DRS-J4 was based upon similarity to [P84926](#); in DRS-J5 and DRS-J6, based upon similarity to [Q90ZK5](#) and [AAB24271.1](#); in DRS-J7, based upon similarity to [P83638](#); in DRS-J8 and DRS-J9, based upon similarity to [CAI99866](#); in DRT-J1, DRT-J2 and DRT-J3, based upon similarity to [Q9PT75](#) and [O93221](#). Lower case 'a' indicates C-terminal amidation. Multiple sequence alignment of dermatotoxin peptides generated using ClustalW 2.0.12. 'N.A.' stands for non-applicable. Consensus symbols, namely '\*', '.', and ';', means that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment, that conserved substitutions have been observed, and that semi-conserved substitutions are observed, respectively.



## Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae)

Breno Rates<sup>a,b</sup>, Luciano P. Silva<sup>c</sup>, Ivanildce C. Ireno<sup>a,b</sup>, Felipe S.F. Leite<sup>d</sup>, Márcia H. Borges<sup>e</sup>, Carlos Bloch, Jr.<sup>c</sup>, Maria Elena De Lima<sup>a,b</sup>, Adriano M.C. Pimenta<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>b</sup> Núcleo de Estudo de Estrutura e Função de Biomoléculas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Espectrometria de Massa–LEM, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil

<sup>d</sup> Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>e</sup> Centro de Pesquisa Professor Carlos R. Diniz, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 August 2010

Received in revised form 22 September 2010

Accepted 24 September 2010

Available online 12 October 2010

#### Keywords:

*Phasmahyla jandaia*

Skin secretion

MALDI-TOF/TOF

ESI-Q-TOF

*de novo* sequencing

### ABSTRACT

The systematic investigation of the peptidic composition of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia*, a phyllomedusine anuran endemic to the southern region of the *Espinhaço* range in Brazil, is herein reported. By means of *de novo* interpretation of *tandem* mass spectrometric data, Edman N-terminal sequencing and similarity searches, 57 peptides - including phylloseptins, dermaseptins *stricto sensu*, dermatoxins, hyposins, tryptophyllins, caerulein-related, bradykinin-related, bradykinin potentiating, tyrosine-rich, and opioid peptides - were sequenced. Moreover, five peptide families without significant similarity to other known molecules were verified. Differently from most Phyllomedusinae genera, the molecular diversity in the skin of representatives of *Phasmahyla* remained unprospected until now. Therefore, besides disclosing novel natural variants of number of bioactive peptides, the present study contributes to the understanding of the evolution of biochemical characters of the phyllomedusines.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The anuran skin secretion is widely recognized by its diversity of biologically active peptides. These molecules have been subjected to intense investigation due to their potential applications in biophysical research, biochemical taxonomy, and as a guide for the development of new therapeutic agents (Chen et al., 2004; Conlon et al., 2004, 2009a, 2009b; Amiche et al., 2008; Nicolas and El Amri, 2009; Faivovich et al., 2010).

Evidencing such diversity, within the dermaseptin superfamily of antimicrobial peptides, which is present in the skin of Hylidae frogs, the inter- and intra- specific variety is such that only rare examples of peptides from one species being found with an identical primary structure in other organisms have been reported. Moreover, these differences in amino acid sequences often imply in differential biological activity (Nicolas and El Amri, 2009; Faivovich et al., 2010).

Notwithstanding, it is worth mentioning that despite extensive investigation of their properties *in vitro*, the precise biological roles of the skin peptides remain unclear (Conlon et al., 2009a). Moreover, the growing knowledge pertaining to amphibian species and to their molecular repertoire diversity is coincident with a massive and global decline in amphibian populations due to factors including, *inter alia*:

\* Corresponding author. LVTA, Bloco O4, Sala 125. ICB/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Tel.: +55 31 3499 2638.

E-mail address: [apimenta@icb.ufmg.br](mailto:apimenta@icb.ufmg.br) (A.M.C. Pimenta).

habitat loss and fragmentation; global environmental changes; and emerging infectious diseases (Donnelly and Crump, 1998; Alford and Richards, 1999; Houlihan et al., 2000; Young et al., 2001; Blaustein and Kiesecker, 2002; Collins and Storer, 2003; Licht, 2003; Stuart et al., 2004; Green, 2005; Halliday, 2005; Frost et al., 2006). Therefore, additional studies on the evolution and diversity of frog skin peptides may help reveal biochemical features which may lead to the elucidation of their *in vitro* activity and their physiological and ecological roles, besides securing the potential loss of invaluable biological information.

Amongst anuran groups, the Phyllomedusinae<sup>1</sup> subfamily (Hylidae) has been previously highlighted as displaying the greatest variety and abundance of active peptides described to date (Erspamer et al., 1986). Phyllomedusines occur in Latin America, from México to Argentina. Its 59 species (Frost, 2010) are distributed into 5 genera (Faivovich et al., 2010), including *Phasmahyla* Cruz, 1991.

*Phasmahyla* is endemic to the Brazilian Atlantic Forest Domain (Ab'Saber, 1977; Cruz, 1991; Carvalho-e-Silva et al., 2009). It currently includes the 7 following species (Frost, 2010): *P. cruzi* Carvalho-e-Silva, Silva, and Carvalho-e-Silva, 2009; *P. spectabilis* Cruz, Feio, and Nascimento, 2008; *P. timbo* Cruz, Napoli, and Fonseca, 2008; *P. cochranae* (Bokermann, 1966); *P. exilis* (Cruz, 1980); *P. guttata* (Lutz, 1924); and *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978). *P. jandaia* is endemic to the *Espinhaço* range in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil, where it is known from few localities (Leite et al., 2008a). It is worthy mentioning that the *Espinhaço* range has been deemed as of 'special biological importance'<sup>2</sup> for amphibian conservation in the state of Minas Gerais (Drummond et al., 2005) (Fig. 1). Moreover, differently from other Phyllomedusinae genera, *Phasmahyla* has not been subjected to investigations dedicated to the prospection and characterization of bioactive peptides in its skin secretion up until the date of conclusion of the present study, as evidenced by a search using the term "*Phasmahyla*" in the PubMed and ISI Web of Knowledge databases (last accessed in 7/06/2010) and further supported by Faivovich et al. (2010).

In light of the facts presented, the aim of the present study was the systematic sequencing/identification of peptides present in skin secretion of *P. jandaia*, by means of one- and two-dimensional high performance chromatography (HPLC), MALDI-TOF/TOF and ESI-Q-TOF mass spectrometry and *de novo* interpretation of peptide fragmentation spectra.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and extraction of skin secretion

Two *P. jandaia* specimens, one adult male and one juvenile whose sex was not determined, were collected in

the municipality of Itabirito (WGS84, 20°09'59.87"S, 43°35'25.43"W, Elevation ca.1190 m), state of Minas Gerais, Brazil, within a region known as *Quadrilátero Ferrífero* in the southernmost portion of the *Espinhaço* range (Fig. 1). The specimens used in this study were deposited in the Herpetological Collection of the Biological Sciences Institute of the Federal University of Minas Gerais (*Coleção de Herpetologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais*) (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) under the following registration numbers: UFMG 1573 and UFMG 1574.

The skin secretion was obtained by means of mild electric stimulation applied on multiple sites on the frogs' dorsal region, as previously described (Tyler et al., 1992). The secretion was washed out from the animals' skin with chilled deionized water. The material was pooled and promptly frozen and lyophilized. The dried secretion was stored in freezer (−20 °C) until its use.

### 2.2. Fractionation of skin secretion

Fractionation of the skin secretion of *P. jandaia* was performed employing an ÄKTA Explorer 100 HPLC platform (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), controlled by the UNICORN 4.11 software. Fractions were collected by an automated fraction collector Frac920 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Elution was monitored by absorbance readings at 214 and 280 nm. Solutions used in the chromatographic separations were degassed (reversed-phase and cation-exchange chromatographies) and filtered (cation-exchange) using 0.45 µm nylon membranes (Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA).

#### 2.2.1. One-dimensional chromatography

One-dimensional chromatography consisted in the fractionation of the skin secretion by means of reversed-phase chromatography (RPC). A sample of the skin secretion of *P. jandaia* (dried weight, ca. 1.5 mg) was dissolved in 0.1% TFA in deionized water (2.0 mL), centrifuged (9500 RCF, during 10 min at 5 °C). The supernatant fraction was filtered in 0.22 µm nylon membranes (Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA) and was loaded onto a monolithic RPC column (Chromolith Performance RP-18 100 mm × 4.6 mm - Merck - Darmstadt, Germany), which was previously equilibrated with 0.1% TFA in deionized water. Elution was achieved by means of a linear gradient (0–70%) of 0.1% TFA in acetonitrile, in 5 min. RPC analysis were carried out using a 4.0 mL/min flow.

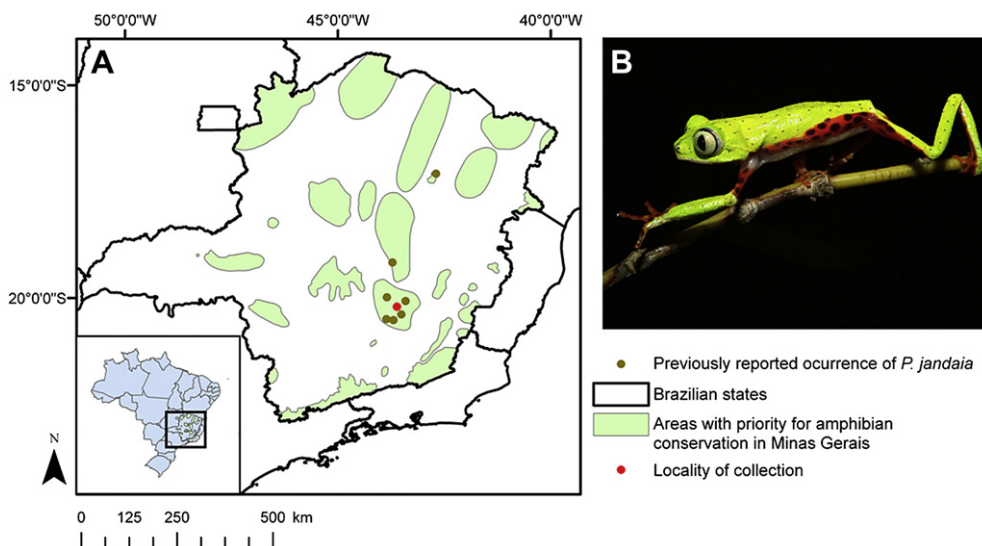
#### 2.2.2. Two-dimensional chromatography

Two-dimensional chromatography consisted in the fractionation of the skin secretion by means of cation-exchange chromatography (CIEX) followed by further separations of fractions obtained in the previous step by RPC.

A sample of the skin secretion of *P. jandaia* (dried weight, ca. 1.5 mg) was dissolved in 50 mM sodium-acetate buffer (pH = 5.0) (2.0 mL) and centrifuged (9500 RCF, during 10 min at 5 °C). The supernatant fraction was filtered in 0.22 µm nylon membranes (Millipore, Bedford, USA) and the CIEX step was carried out as previously

<sup>1</sup> Species names depicted in the present study are in accordance with Frost, 2010. Only currently valid names are used. Therefore, names may differ from synonyms adopted in the cited literature.

<sup>2</sup> "Areas of special biological importance: areas bearing species with distribution restricted to the region in question or bearing environments unique to the state of Minas Gerais" (Drummond et al., 2005). 47.



**Fig. 1.** Geographic range of *Phasmahyla jandaia*. (A) Geographic distribution of *P. jandaia*, which is endemic to the Espinhaço range in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. The distribution of *P. jandaia* is depicted as the seat of the municipalities where it is known to occur, namely: Santana do Riacho, Leme do Prado, Catas Altas, Congonhas, Nova Lima, Ouro Branco, and Ouro Preto (Leite et al., 2008a). Its distribution range is coincident with a number of regions deemed as having priority for amphibian conservation. Data sources: Brazilian states 'shapefile' downloaded from the Centro de Sensoriamento Remoto (Remote Sensing Center - CSR) of the Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (Brazilian Environment Institute - IBAMA) (available at <http://siscom.ibama.gov.br/shapes/>, last accessed in 20/05/2010); Areas with priority with amphibian conservation in the state of Minas Gerais 'shapefile' downloaded from Fundação Biodiversitas (available at <http://www.biodiversitas.org.br/atlas/repteis.asp>, last accessed in 20/05/2010) and; Seat of municipalities of Minas Gerais 'shapefile' downloaded from the Programa Integrado de Uso da Tecnologia de Geoprocessamento pelos Órgãos do Estado de Minas Gerais (Integrated Program for the Use of Geoprocessing Technology by the Bodies of the State of Minas Gerais - GEOMINAS) (available at <http://www.geominas.mg.gov.br/>, last accessed in 20/05/2010). Map datum: WGS84. Map generated in the software ArcMap 9.2. (B) Unvoucher adult specimen of *P. jandaia* (photo: Leite, F. S. F.).

described (Rates et al., 2007). The fractions obtained in the CIEX step were further separated by means RPC as described above (Item 2.2.1).

### 2.3. Mass spectrometry

RPC fractions obtained after one- and two-dimensional chromatography were submitted to mass spectrometric analyses, which were carried using an AutoFlex III or Ultraflex III MALDI-TOF/TOF mass spectrometers (Bruker Daltonics, Billerica, USA), both controlled by the FlexControl 3.0 software (Bruker Daltonics, Billerica, USA).

RPC fractions were mixed with  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution (1:1, v/v) directly into a MTP AnchorChip 400/384 or 800/384 MALDI target plates (Bruker Daltonics, Billerica, USA) and dried at room temperature. For increasing signal, some fractions were submitted to concentration by means of vacuum centrifugation prior to mass spectrometric analysis. Protein average masses were obtained in linear mode with external calibration, using the Protein Calibration Standard (Bruker Daltonics, Billerica, USA). The peptide monoisotopic masses were obtained in reflector mode with external calibration, using the Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics, Billerica, USA). Peptide MS/MS spectra were obtained by means of LIFT fragmentation. The software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, USA) and PepSeq (Waters, Manchester, UK) were used for mass spectrometric data analysis. Peptide primary structures were inferred by

means of the manual *de novo* interpretation of fragmentation spectra.

Alternatively, high-resolution tandem mass spectrometric spectra of a selection of peptides were obtained by means of ESI-Q-TOF, in a SYNAPT HDMS™ (Waters, Manchester, UK) instrument equipped with a nano Z-spray electrospray ionization (ESI) source. The electrospray capillary was operated at a voltage of 1.6 kV. MSMS data were acquired in the continuum and V-modes.

### 2.4. Peptide N-terminal sequencing

N-terminal sequencing of selected native peptides was performed by means of Edman degradation using an automated PPSQ-21A protein sequencer (Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled to reversed-phase separation of PTH-amino acids on a WAKOSIL-PTH (4.6 × 250 mm) column (Wako, Osaka, Japan).

### 2.5. Sequence analysis

The search for similar sequences was performed with the FASTA3 program (Pearson, 1990), tool using the Swiss-Prot database (Bairoch and Apweiler, 2000). Alternatively, the BLASTP 2.2.23+ (Altschul et al., 1997) was employed, using the Swiss-Prot database with or without taxonomy filter for the Hylidae family (Taxon identity: 8418). Multiple sequence alignments were performed by means of the ClustalW 2.0.12 software (Thompson et al., 1994; Larkin et al., 2007).



Secondary structure prediction was performed by means of the SOPMA program (Geourjon and Deléage, 1995). Schiffer-Edmunson wheel projections (Schiffer and Edmunson, 1967) were plotted using the Pepwheel program.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Fractionation and mass profiling of skin secretion

Direct fractionation of the skin secretion of *P. jandaia* by means of RPC (one-dimensional chromatography) yielded 18 fractions (Fig. 2). In order to increase the resolution, the skin secretion of *P. jandaia* was also fractionated by two-dimensional chromatography. In the former strategy, the CIEX step yielded 23 fractions, which were individually submitted to RPC (Fig. 3(A)). After the RPC of the fractions obtained in the CIEX step, the skin secretion of *P. jandaia* was resolved in 88 fractions (B). Fractions obtained after RPC in both one- and two-dimensional chromatographies were submitted to mass spectrometric analyses.

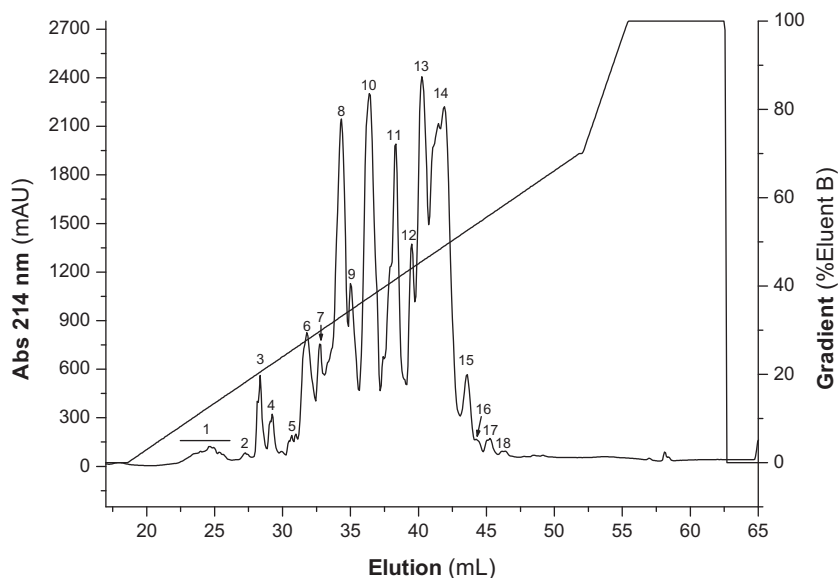
A total of 203 molecular components were found: 71 signals (35%) exclusively detected after one-dimensional chromatography; 103 signals (51%) exclusively detected after two-dimensional chromatography; and 29 signals (14%) detected after both chromatographic strategies. This rather small intersection of the sets of molecules detected after the chromatographic strategies herein employed may be possibly attributable to MALDI signal suppression due to lower resolution in one-dimensional chromatography (more abundant components suppressing the signal of co-eluting lower abundant molecules) or to sample concentration effects (Kratzer et al., 1998; Pimenta et al., 2001; Annesley, 2003). It is noteworthy that the differences in the sets of molecules detected in the distinct chromatographic strategies are not attributable differences in the employed mass spectrometric instrumentation, since the

results depicted in this section were obtained in an Autoflex III instrument whereas the employment of Ultraflex III and Synapt instrumentation in this study was restricted to the attainment of higher resolution MS/MS spectra of a selected number of peptides. Moreover, these differences are also not attributable to natural (seasonal or intra-specific) variations in the composition of the skin secretion, since the samples used in the different chromatographic strategies proceeded from the same pool, nonetheless *in vitro* sample degradation effects at some extent may not be discarded.

The masses of the detected molecular components ranged from 802.23 to 13,631.3 Da. Fig. 4 shows the histogram of the molecular masses of the components detected in the skin of *P. jandaia*. By analyzing this figure, one notices the preponderance of molecules within the 800–3500 Da range (87% of the total of molecular components detected). Ions within that scope and having sufficient signal intensities were systematically submitted to MS/MS analyses. Additionally, those peptides found to be in homogeneous state were also submitted to N-terminal sequencing by automated Edman's degradation.

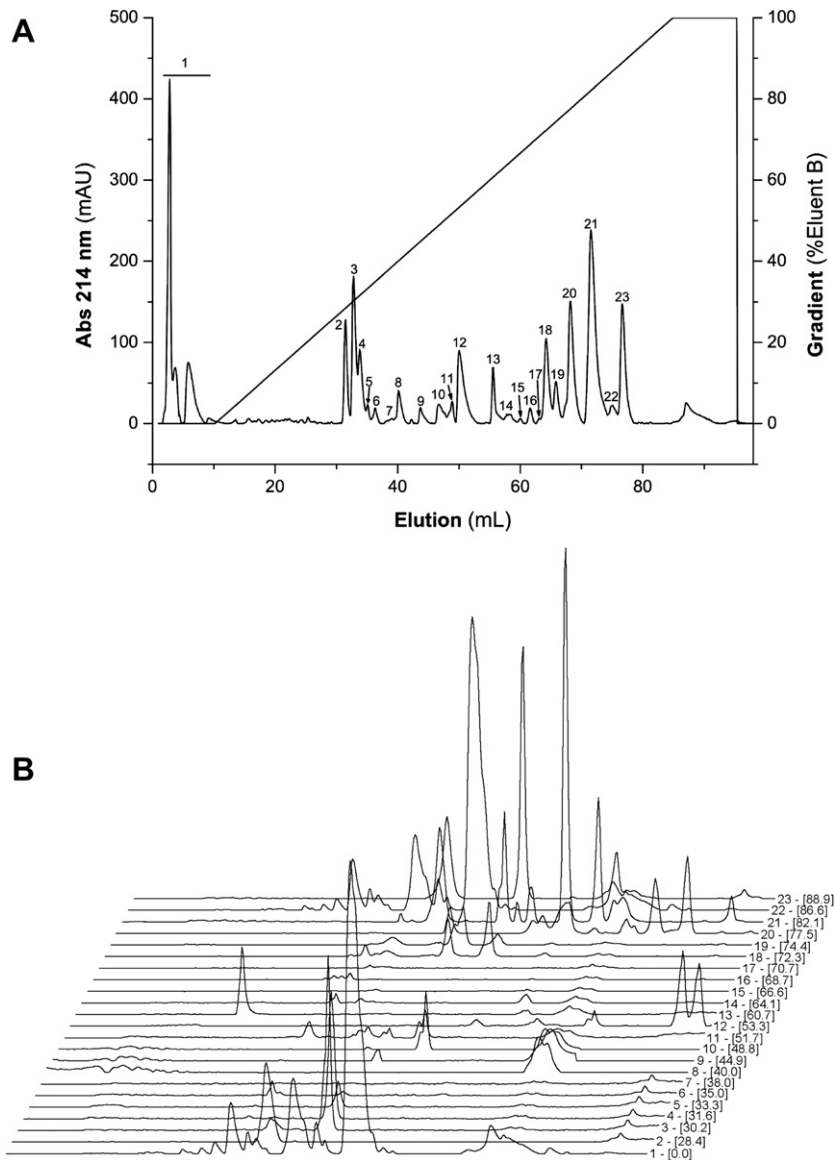
#### 3.2. Peptide sequencing and sequence analyses

In total, 57 peptides, or approximately 28% of the total number of detected ions, could be successfully sequenced/identified. The residues Leu/Ile and Gln/Lys that could not be distinguished by means of the MALDI-TOF-TOF *tandem* mass spectrometric data, whenever possible, were suggested based upon similarity with homologous Hylidae sequences or based upon similarity with related *P. jandaia* molecules whose N-terminal sequences could be undoubtedly determined by Edman degradation. Alternatively, Leu/Ile residues were assigned by means of high-resolution *tandem* mass spectrometric data acquired by means of Synapt ESI-Q-TOF instrumentation. The peptide



**Fig. 2.** One-dimensional chromatography of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia*. Sample was loaded onto the RPC column (Chromolith Performance RP-18 100 mm × 4.6 mm) previously equilibrated with 0.1% TFA in deionized water (Eluent A) and elution was achieved by means of a linear gradient (0–70%) of 0.1% TFA in acetonitrile in 5 min (Eluent B). Flow rate: 4.0 mL/min. Readings at 214 nm (left vertical axis) and Eluent B gradient (right vertical axis) are shown.



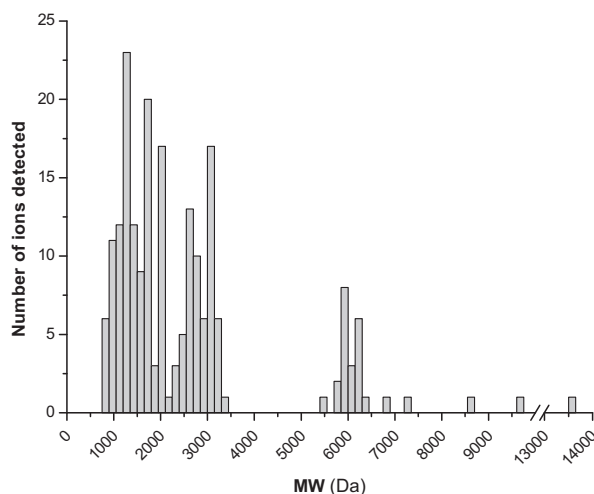


**Fig. 3.** Two-dimensional chromatography of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia*. A) Cation-exchange chromatography (CIEX). Sample was loaded onto the CIEX column (TSK-Gels CM-SW, 15 cm × 4.6 mm) previously equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer (pH = 5) (Eluent A). A linear salt gradient (0–1 M [NaCl] at a 10 mM/min rate) was completed by increasing the concentration of 50 mM sodium acetate buffer (pH = 5) with 1 M NaCl (Eluent B). Flow rate: 0.75 mL/min. Readings at 214 nm (left vertical axis) and Eluent B gradient (right vertical axis) are shown. B) Reversed-phase chromatography (RPC). CIEX fractions were loaded onto the RPC column (Chromolith Performance RP-18 100 mm × 4.6 mm) previously equilibrated with 0.1% TFA in deionized water (Eluent A) and elution was achieved by means of a linear gradient (0–70%) of 0.1% TFA in acetonitrile (Eluent B) in 5 min. Flow rate: 4.0 mL/min. The number of the CIEX fractions and their respective [NaCl] (mM) elution are depicted. Readings at 214 nm are shown.

sequence data reported in this paper will appear in the UniProt Knowledgebase under the accession numbers depicted in Tables 1–7.

Phylloseptins, dermaseptins *stricto sensu*, dermatoxins, hyposins, tryptophyllin, caerulein-related, bradykinin-related, bradykinin potentiating, tyrosine-rich, and opioid peptides could be identified in the skin secretion of *P. jandaia*. Moreover, five peptide families without significant similarity to other known molecules could be verified. Novel phylloseptin, dermatoxin, dermaseptin, and hyposin peptides were named as per the most recent proposed

nomenclature (Amiche et al., 2008). The novel tryptophyllin-related peptides and the tyrosine-rich peptide were named according to their structural class and species of origin, as previously suggested (Chen et al., 2004; Thompson et al., 2007a, 2007b). Peptides not displaying similarity with other known molecules were generically named as *P. jandaia* Peptide **x**-**y** (PjPx-*y*, for short), where 'x' denotes the Arabic numeral arbitrarily attributed to a given peptide family and 'y' denotes the Arabic numeral attributed to a given peptide within a family 'x' according to the increasing order of its molecular mass (Table 1).



**Fig. 4.** Histogram of the molecular masses of components detected in the skin secretion of *Phasmahyla jandaia*. Components detected after one- and two-dimensional chromatographies are depicted without double-counting. Horizontal axis is broken between 10,000 and 13,000 Da for better visualization. Bin size: 150 Da.

### 3.2.1. Bradykinin (BK), bradykinin-related (BRP) and bradykinin potentiating (BPP) peptides

BK and seven analogs (BRPs) could be identified in the skin secretion of *P. jandaia* (Table 2). The presence of such peptides in the amphibian skin is widely reported. For instance, over 60 results are displayed after a search with the terms “bradykinin”, “amphibian” and “skin” in the PubMed database (Accession date: 20/05/2010). It has been suggested that BRPs play a defensive role rather than possessing endogenous hormonal activity such as their counterparts in other vertebrate groups (Conlon, 1999). This hypothesis is supported by the apparent lack of a kallikrein–kinin system in amphibians (Conlon, 1999). In that sense, BK and its analogs might stimulate gastric and esophageal motility in predators, possibly stimulating emetic reflex resulting in the ejection of the prey (Conlon, 2006). Therefore, the current understanding is that the diversity of BRPs in the skin secretion of this and other anurans reflects the range of coexistent predators (Conlon, 1999). In line with that statement, the biological significance of the presence of BK variants (i.e. primary structure changes modulating specificity) may be illustrated by the fact that BK preferentially binds B<sub>2</sub> receptors, whereas the C-terminally truncated peptide des[Arg]<sup>9</sup>-bradykinin has a high affinity to B<sub>1</sub> receptors (Regoli et al., 1993).

**Table 1**

Amino acid sequence and molecular mass of peptides detected in the secretion of *P. jandaia* without detectable similarity to other known molecules.

Peptide name	Sequence	Experimental mass (Da)	Theoretical mass (Da)	Accession number
PjP1-1	kPEEDWGHk	1124.5	1124.5	P86602
PjP1-2	kPEEDWGHR	1152.6	1152.5	P86603
PjP1-3	kPEEDWGRES	1231.6	1.231.5	P86604
PjP1-4	kPEEDWDRTD	1289.6	1289.6	P86605
PjP2-1	GPPJJPPJJP	899.4	899.5	P86606
PjP3-1	JFFkGEkkJ	1108.7	1108.7	P86607
PjP4-1	kPENENEEAJHE	1437.6	1437.6	P86608
PjP5-1	JLGMIPVAISAINJMkJa	1795.2	1795.1	P86609

Lower case ‘a’ indicates C-terminal amidation. Lower case ‘k’ indicates undifferentiated Lys/Gln residues. ‘J’ indicates undifferentiated Ile/Leu. Theoretical masses calculated assuming Lys in the dubious Lys/Gln residues.

Amongst the BRPs herein reported figure phyllokinin and [Thr]<sup>6</sup>-phyllokinin (Table 2). These molecules have been previously identified in the skin of other Phyllomedusinae members and display a [Tyr]<sup>11</sup> sulfonation (Erspamer et al., 1985; Mignogna et al., 1997; Chen and Shaw, 2003; Brand et al., 2006a; Chen et al., 2006). The loss of 80 Da in MS/MS spectra of the 1415.7 and 1429.8 Da molecules is consistent with the previous reports of sulfonation in these peptides, which were also detected in de-sulfonated form.

The bradykinin potentiating peptide (BPP) Phypo Xa, featuring an N-terminal pyroglutamate modification, was identified amongst the molecules secreted in the skin of *P. jandaia* (Table 2). Phypo Xa, originally identified in the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*, potentiates bradykinin activities *in vivo* and *in vitro*, and is a competitive inhibitor of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) (Conceição et al., 2007). In light of these observations, synergic effects between BK/BRPs and Phypo Xa have been suggested (Conceição et al., 2007).

### 3.2.2. Caerulein-like peptide

One may also mention the presence of the novel phyllocaerulein variant, [Arg]<sup>4</sup>-phyllocaerulein (Table 2). Phyllocaerulein, originally detected in the skin of *P. sauvagii*, displays an N-terminal pyroglutamic acid, [Tyr]<sup>3</sup> sulfonation and C-terminal amidation (Anastasi et al., 1969), whereas [Arg]<sup>4</sup>-phyllocaerulein was only detected in de-sulfonated form (the mass corresponding to its sulfonated form – 1293.5 Da – was not observed).

Tyr sulfation is catalyzed by tyrosylprotein sulfotransferase enzymes (TPSTs), which are located in the trans-Golgi network (Lee and Huttner, 1983; Baeuerle and Huttner, 1987). Such location enables the access of the TPSTs to secreted and membrane-bound proteins (Kehoe and Bertozzi, 2000). To date, there is not a defined sequence motif for Tyr sulfation, although the occurrence of acidic residues in the vicinity of the sulfation site is evidently preponderant (Kehoe and Bertozzi, 2000; Moore, 2003). Hence, this observation may be related to the fact that the sulfated form of [Arg]<sup>4</sup>-phyllocaerulein was not detected.

Previous study has shown that the pharmacological effects elicited by phyllocaerulein and caerulein were identical in the models evaluated. Amongst the observed effects of phyllocaerulein one could mention prolonged blood pressure fall *in vivo* (Anastasi et al., 1969), making possible to speculate that [Arg]<sup>4</sup>-phyllocaerulein, which may also possess such pharmacological activity, could act

**Table 2**Amino acid sequence and molecular mass of known peptides identified in the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* and of [Arg]<sup>4</sup>-Phyllocaerulein.

Peptide name	Sequence	Experimental mass (Da)	Theoretical mass (Da)	Accession number
Bradykinin and related peptides				
Bradykinin	RPPGFSPFR	1059.5	1059.6	P86627
des[Arg] <sup>9</sup> -bradykinin	RPPGFSPF	903.4	903.5	P86628
[Thr] <sup>6</sup> -bradykinin	RPPGFTPFR	1073.6	1073.6	P86629
des[Arg] <sup>9</sup> -[Thr] <sup>6</sup> -bradykinin	RPPGFTPF	917.4	917.5	P86630
Phyllokinin de-sulfonated	RPPGFSPFR <sub>Y</sub>	1335.7	1335.7	P86631
Phyllokinin	RPPGFSPFR <sub>Y</sub> <sub>S03</sub>	1415.7	1415.7	
[Thr] <sup>6</sup> -phyllokinin de-sulfonated	RPPGFTPFR <sub>Y</sub>	1349.8	1349.7	P86632
[Thr] <sup>6</sup> -phyllokinin	RPPGFTPFR <sub>Y</sub> <sub>S03</sub>	1429.8	1429.7	
Bradykinin potentiating peptide				
Phypo Xa	qFRPSYQIPP	1214.9	1214.6	P86643
Caerulein-like peptide				
[Arg] <sup>4</sup> -phyllocaerulein	qEYRGWMDFa	1212.4	1212.5	P86625
Opioid peptides				
Dermorphin	YAFGYPSa	802.2	802.4	P86633
Deltorphin (D-Met <sup>2</sup> -delt)	YMFHLM <sub>Da</sub>	954.4	954.4	P86634
[Met(Ox)] <sup>6</sup> -Deltorphin	YMFHLM <sub>ox</sub> Da	970.4	970.4	

Y<sub>S03</sub> indicates sulfonated tyrosine residue. M<sub>ox</sub> indicates an oxidated methionine residue. Lower case 'q' stands for pyroglutamic acid. Lower case 'a' indicates C-terminal amidation.

synergistically with BK, BRPs and Phypo Xa. Moreover, considering that caerulein is a potent analgesic (100–700 times more potent than morphine) (Bowie and Tyler, 2006), a synergic action of [Arg]<sup>4</sup>-phyllocaerulein with the opioid peptides dermorphins and deltorphins (discussed below) may also be speculated. Nonetheless, it is noteworthy that the bioactivity of caerulein is significantly diminished if the sulfate group is hydrolyzed (Bowie and Tyler, 2006) as observed for phyllokinin (Anastasi et al., 1966).

### 3.2.3. Tryptophyllins

Another peptide family, the tryptophyllins, are herein represented by the so-called *P. jandaia* T3 tryptophyllins (Pj-T3-1 to Pj-T3-3) (Table 3). Tryptophyllins constitute a numerous and structurally diverse group of molecules, which are divided into the sub-groups tryptophyllin-1 (T-1), tryptophyllin-2 (T-2) and tryptophyllin-3 (T-3) based upon their sequence similarities (Chen et al., 2004). The sub-group T-1 includes hepta- or octapeptides possessing an N-terminal basic amino acid residue and an internal PW or PPW motif. Most members of the sub-group T-2, which is constituted of peptides with variable lengths

containing an internal PW-doublet, are C-terminally amidated. The sub-group T-3, the most highly conserved amongst the tryptophyllin sub-groups, consists of peptides with an internal PPPIY motif (Chen et al., 2004; Thompson et al., 2007a).

Despite the tridecapeptides Pj-T3-1, Pj-T3-2 and Pj-T3-3 being similar to the tryptophyllins belonging to the T-3 sub-group, as shown in Table 3, the sequenced *P. jandaia* tryptophyllins display the internal motif SPPIY or DPPIY, instead of the 'classical' PPPIY motif. *P. jandaia* tryptophyllins feature a N-terminal pyroglutamate as determined for their counterparts in *Phyllomedusa rohdei* (Montecucchi et al., 1985), *P. bicolor* (Erspamer et al., 1985), *P. sauvagii* (Erspamer et al., 1985), and *Phyllomedusa azurea* (Thompson et al., 2007a). By analyzing the sequence of Pj-T3 peptides along with the previously described peptides, one can notice the consensus KP-doublet prior to the doublet of aromatic residues in the T-3 tryptophyllins (Table 3).

The biological activity of T-3 tryptophyllins remains elusive (Erspamer et al., 1985, 1986; Montecucchi, 1985; Chen et al., 2004) although effects on liver protein synthesis and body weight have been reported for Tryptophyllin-13 from

**Table 3**Amino acid sequence and molecular mass of the *Phasmahyla jandaia* T-3 tryptophyllin-1 (Pj-T3-1) and its alignment with previously sequenced T-3 tryptophyllins.

Peptide name	Species	Sequence	Exp. mass (Da)	Theor. mass (Da)	Accession number
Pj-T3-1	<i>P. jandaia</i>	qDKPFWSPPPIYPV-	1555.9	1555.8	P86610
Pj-T3-2	<i>P. jandaia</i>	qDKPFWSPPPIYPH-	1593.6	1593.8	P86611
Pj-T3-3	<i>P. jandaia</i>	qDKPFWDPPPIYPV-	1583.7	1583.8	P86612
Un-named	<i>P. sauvagii</i>	qDKPFWPPPIYPV-	N.A.	1565.8	-
Pha-T3-1	<i>P. azurea</i>	qDKPFWPPPIYIM-	N.A.	1613.8	P84949
Pha-T3-2	<i>P. azurea</i>	qDKPFWPPPIYPM-	N.A.	1597.8	P84950
Tryptophyllin-13	<i>P. rohdei</i>	qEKPYWPPPIYPM-	N.A.	1627.8	P04096
Un-named	<i>P. bicolor</i>	qEKPFYPPPIYPV-	N.A.	1556.8	-
GM-14	<i>B. variegata</i>	-GKPFYPPPIYPEDM	N.A.	1649.8	P84215
Consensus	N/A	** : : ****	N.A.	N.A.	N.A.

Differentiation of Leu/Ile and Lys/Gln residues in Pj-T3-1 was based upon similarity to previously sequenced tryptophyllins. Multiple sequence alignment generated using ClustalW 2.0.12, where gaps (-) were introduced to maximize alignment. Lower case 'q' stands for pyroglutamic acid. 'N.A.' stands for non-applicable. Consensus symbols, namely ':', ':' and ':', means that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment, that conserved substitutions have been observed, and that semi-conserved substitutions are observed, respectively.

**Table 4**

Amino acid sequence and molecular masses of Hyposin-J1 and its alignment with previously sequenced hyposins and related peptides.

Peptide name	Species	Sequence	Exp. mass (Da)	Theor. mass (Da)	Accession number
HPS-J1	<i>P. jandaia</i>	FRPAJIVRTRKGGK-a	1383.8	1383.9	P86613
HPS-H4	<i>P. azurea</i>	FRPAJIVRTRKGGTRJa	N.A.	1626.0	P84957
HPS-H3	<i>P. azurea</i>	LRPAVIVRTRKGGK-a	N.A.	1335.9	P84956
Sauvatide	<i>P. sauvagii</i>	LRPAILVTRTK—a	N.A.	1164.8	CAX48601
AMP-1	<i>P. hypochondrialis</i>	LRPAVIVRTRKAJ—	N.A.	1335.9	P84524
HPS-H1	<i>P. azurea</i>	LRPAVI—RPKGGK-a	N.A.	1232.8	P84954
HPS-H2	<i>P. azurea</i>	LRPAFI—RPKGGK-a	N.A.	1280.8	P84955
Consensus	N/A	:***.:*.*	N.A.	N.A.	N.A.

Differentiation of Leu/Ile or Lys/Gln residues in Hyposin-J1 was based upon similarity to Hyposin-H3 and Hyposin-H4. Lower case 'a' indicates C-terminal amidation. 'J' indicates undifferentiated Ile/Leu. Multiple sequence alignment generated using ClustalW 2.0.12, where gaps (—) were introduced to maximize alignment. Hyposin-H5 (P84958) was not included in this table due to an inconsistency between its experimental mass (1514.0 Da) and the mass calculated for its reported sequence (1588.0 Da). 'N.A.' stands for non-applicable. Consensus symbols, namely '\*\*\*', ':', and '.', means that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment, that conserved substitutions have been observed, and that semi-conserved substitutions are observed, respectively.

*P. rohdei* (Montecucchi, 1985), which is consistent with a more recent report of insulin-releasing activity for GM-14 from *Bombina variegata* (Marenah et al., 2004).

Moreover, the presence of the PP, PPP, and KP motifs in T-3 tryptophyllins allows the speculation that these peptides could act upon the vascular system as hypotensive agents. This assumption is based on the studies recently developed by our group on the so-called Hypotensins (TsHpt), a family of BPPs present in the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Verano-Braga et al., 2008, 2009; Verano-Braga, 2009). Structure minimization assessment of TsHpt-I, have demonstrated that the tripeptide KPP consistently reproduces all vascular effects of the 25 amino acid-long native TsHpt-I (i.e. BK-potential, transient BK-independent hypotension in rats, and NO-dependent vasodilatation in aortic rings preparations) (Verano-Braga, 2009). Moreover, the dipeptide KP reproduces the transient BK-independent hypotension, whereas BK-dependent hypotension elicited by TsHpt-I was reproduced by the dipeptide PP (Verano-Braga, 2009).

### 3.2.4. Opioid peptides

The opioid-peptides dermorphin and deltorphin (D-Met<sup>2</sup>-Deltorphin) could also be identified in the skin secretion of *P. jandaia*. The pharmacological properties of these peptides and their analogs have been extensively reviewed elsewhere (Erspamer et al., 1989; Melchiorri and Negri, 1996; Amiche et al., 1998; Lazarus et al., 1999; Negri et al., 2000; Negri and Melchiorri, 2006). Briefly, dermorphin, a selective and potent  $\mu$ -opioid receptor agonist (100 times more potent than morphine in guinea pig ileum preparation), produces antinociception, catalepsy, respiratory depression, constipation, tolerance and depression

(Negri and Melchiorri, 2006). Differently, deltorphin has higher selectivity and affinity for  $\delta$ -opioid receptor (Negri and Melchiorri, 2006). It is noteworthy that the intensity of the analgesia induced by  $\delta$ -agonists depends on the co-activation of  $\mu$ -opioid receptor by endogenous or exogenous molecules (Negri and Melchiorri, 2006). Injection of deltorphins in rats (0.06–3.8 nmol/animal *i.c.v.*) increases locomotor activity and induces stereotyped behaviour (Negri and Melchiorri, 2006). Yet, deltorphin improves memory consolidation in a passive avoidance test in mice (Negri and Melchiorri, 2006).

Importantly, the post-translational modifications in these opiate peptides include C-terminal amidation and the presence of dextrorotatory residues (D-Ala or D-Met), both playing roles in the augmentation of the potency and stability of the molecules by which they are borne (Broccardo et al., 1981; Negri et al., 2000). Such modifications were assigned to the opioid-peptides herein identified based upon the information available from the molecules previously characterized in other phylomedusines. This was due to the fact that an amidated Asp residue is quasi isobaric to a Asn residue (114.02 versus 114.04, respectively), and that dextrorotatory and levorotatory residues are not readily distinguishable by MALDI-TOF/TOF (Sachon et al., 2009).

Moreover, deltorphin was also identified in a form bearing an oxidation in [Met]<sup>6</sup>. The oxidized methionine residue was distinguished from a quasi isobaric phenylalanine residue (147.04 versus 147.07 Da, respectively) by means of the verification of the loss of CH<sub>3</sub>SOH (64 Da) from the parent (y<sub>7</sub>), y<sub>3-6</sub> and b<sub>6</sub> ions in the MS/MS spectrum of the so-called [Met<sub>(ox)</sub>]<sup>6</sup>-deltorphin (Fig. 5) (Jagannadham, 2009).

**Table 5**

Amino acid sequence and molecular masses of Tyrosine-Rich Peptide-J1 and its alignment with previously sequenced peptides.

Peptide name	Species	Sequence	Exp. mass (Da)	Theor. mass (Da)	Accession number
TRP-J1	<i>P. jandaia</i>	LMYYTLPRPVa	1250.7	1250.7	P86709
Un-named	<i>P. sauvagii</i>	LMYYTLPRPVa	N.A.	1250.7	—
TRP-HA1	<i>P. azurea</i>	VMYYSLPRPVa	1222.7	1222.7	P84960
Consensus	N/A	:***:*****	N.A.	N.A.	N.A.

Differentiation of Leu/Ile residues in TRP-J1 was based upon similarity to its un-named counterpart in *P. sauvagii* and TRP-HA1. Lower case 'a' indicates C-terminal amidation. Multiple sequence alignment generated using ClustalW 2.0.12. 'N.A.' stands for non-applicable. Consensus symbols, namely '\*\*\*', ':', and '.', means that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment, that conserved substitutions have been observed, and that semi-conserved substitutions are observed, respectively.

**Table 6**Amino acid sequence alignment and molecular mass of the *Phasmahyla jandaia* Phylloseptins (PLS-J) and their identified truncated forms.

Peptide name	Sequence	Experimental mass (Da)	Theoretical mass (Da)	Accession number
<b>Full length peptides</b>				
PLS-J1	FLSLIPHAINAISAIANHF <sub>a</sub>	2047.2	2047.1	P86614
PLS-J2	FLSLIPHAINAISAIADHF <sub>a</sub>	2048.1	2048.1	P86615
PLS-J3	FLSLIPHAINAISAIANHL <sub>a</sub>	2013.2	2013.2	P86616
PLS-J4	FLSLIPHAINAISAIANHL <sub>a</sub>	2036.1	2036.2	P86617
PLS-J5	FLSLIPHAINAISAIANHL <sub>a</sub>	2009.3	2009.2	P86618
PLS-J6	FLSLIPHAINAISAIANHL <sub>a</sub>	1986.3	1986.1	P86619
PLS-J7	FLSLIPHAINAISAIADHL <sub>a</sub>	1987.1	1987.1	P86620
Consensus	*****.*****.;	N.A.	N.A.	N.A.
<b>Truncated forms</b>				
PLS-J1[1–12]	FLSLIPHAINAI—	1307.8	1307.8	N.A.
PLS-J5[1–12]	FLSLIPHAINAI—	1280.7	1280.7	N.A.
PLS-J5[1–14]	FLSLIPHAINAISAI—	1438.7	1438.8	N.A.
PLS-J3[3–19]	—SLIPHAINAISAIANHL <sub>a</sub>	1752.8	1753.0	N.A.
PLS-J4[3–19]	—SLIPHAINAISAIANHL <sub>a</sub>	1776.1	1776.0	N.A.
PLS-J5[3–19]	—SLIPHAINAISAIANHL <sub>a</sub>	1748.9	1749.0	N.A.
PLS-J6[3–19]	—SLIPHAINAISAIANHL <sub>a</sub>	1726.0	1726.0	N.A.
PLS-J1[4–19]	—LIPHAINAISAIANHF <sub>a</sub>	1699.8	1700.0	N.A.
PLS-J1[5–19]	—IPHAINAISAIANHF <sub>a</sub>	1586.9	1586.9	N.A.
PLS-J5[5–19]	—IPHAINAISAIANHL <sub>a</sub>	1548.9	1548.9	N.A.

Underlining indicates sequence confirmation by Edman degradation. The identity of the C-terminal Leu residue in PLS-J4[3–19] and PLS-J6[3–19] was determined by the verification of its corresponding  $w_{01}$  ion in high-resolution MS/MS spectrum. The identity of the C-terminal Leu residue in PLS-J3 to PLS-J7, and in their truncated forms, was suggested based on its correspondence to PLS-J4[3–19] and PLS-J6[3–19]. Differentiation of the remaining Leu/Ile residues in PLS-J1 to PLS-J4, PLS-J6 and PLS-J7 was based upon similarity to PLS-J5. Lower case 'a' indicates C-terminal amidation. Multiple sequence alignment of full-length peptides generated using ClustalW 2.0.12. 'N.A.' stands for non-applicable. Consensus symbols, namely '\*', ':' and '.', means that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment, that conserved substitutions have been observed, and that semi-conserved substitutions are observed, respectively.

### 3.2.5. Hyposin

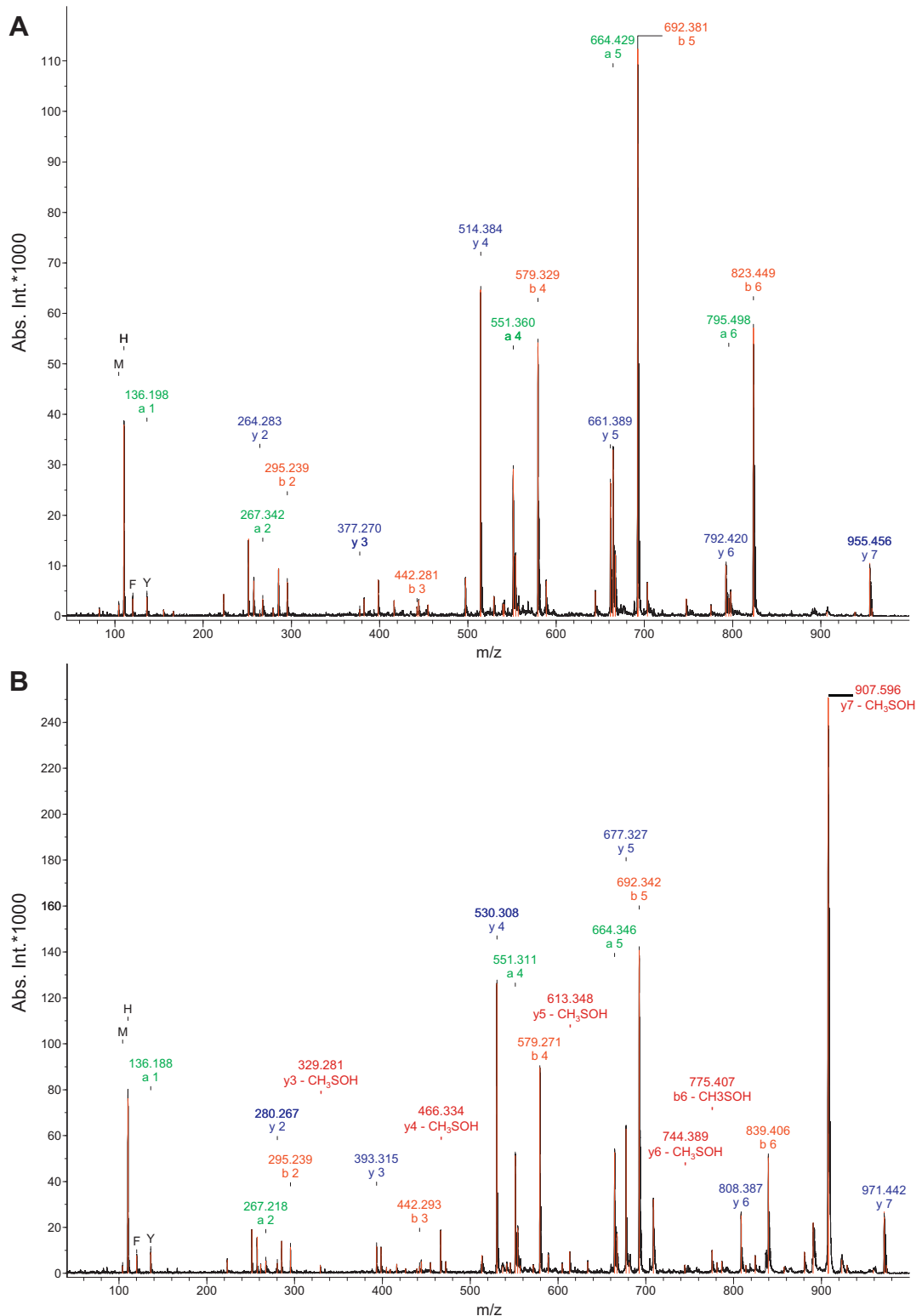
The sequenced molecules also include the so-called hyposin-J1 (HPS-1), which bears a C-terminal amidation Table 4. The hyposins, identified in the skin secretion of *P. azurea*, consist of a family of five peptides with lengths spanning from 11 to 15 residues (Thompson et al., 2007a).

The sequences of hyposin-H1 to 5 (Table 4) were determined by Q-TOF MS/MS analysis, which did not distinguish Ile/Leu residues. However, the structure of hyposin-H1 (formerly, hyposin-HA1) was validated by cDNA sequencing, confirming the identity of [Ile]<sup>6</sup> and allowing the assumption that the corresponding position of hyposin-H2 to 5 also

**Table 7**Amino acid sequence alignment and molecular mass of the *Phasmahyla jandaia* Dermaseptins (DRS-J) and Dermatoxins (DRT-J) and their identified truncated forms.

Peptide name	Sequence	Exp. mass (Da)	Theor. mass (Da)	Accession number
<b>Dermaseptins</b>				
DRS-J1	GLWKNM <sub>L</sub> SGIGKLAGQAALGAVKTLV <sub>a</sub>	2594.3	2594.5	P86635
DRS-J2	GLWKNM <sub>L</sub> SGIGKLAGQAALGAVKTLV <sub>a</sub>	2595.4	2595.5	P86636
DRS-J3	ALWKNM <sub>L</sub> SGIGKLAGQAALGAVKTLV <sub>a</sub>	2608.4	2608.5	P86637
DRS-J4	ALWKM <sub>L</sub> SGIGKLAGQAALGAVKTLV <sub>a</sub>	2609.3	2609.5	P86638
DRS-J5	GLWSKI <sub>K</sub> EAGKA <sub>A</sub> AVKAAGKAALGAVANSV <sub>a</sub>	2764.4	2764.6	P86683
DRS-J6	GLWSKI <sub>K</sub> EAGKA <sub>A</sub> AVKAAGKAALGAVADSV <sub>a</sub>	2765.4	2765.6	P86684
DRS-J7	GLWSKI <sub>K</sub> AAGKEA <sub>A</sub> KA <sub>A</sub> AAKAAAGKAALNAVSEAV <sub>a</sub>	3149.9	3149.8	P86639
DRS-J8	GLWKS <sub>L</sub> LLKNV <sub>G</sub> KAAGKAALNAV <sub>T</sub> DMVNQ <sub>A</sub>	2967.5	2967.6	P86640
DRS-J9	GLWKS <sub>L</sub> LLKNV <sub>G</sub> KAAGKAALNAV <sub>T</sub> DMVNQ <sub>S</sub>	2983.5	2983.6	P86641
DRS-J10	ALWKS <sub>L</sub> LLK <sub>G</sub> AGQ <sub>L</sub> V <sub>G</sub> GVV <sub>Q</sub> HFMGSQ <sub>Q</sub> PES	3108.6	3108.6	P86642
<b>Truncated forms</b>				
DRS-J7[3–33]	—WSKI <sub>K</sub> AAGKEA <sub>A</sub> KA <sub>A</sub> AAKAAAGKAALNAVSEAV <sub>a</sub>	2980.0	2979.7	N.A.
<b>Dermatoxins</b>				
DRT-J1	SLGGFLK <sub>G</sub> V <sub>G</sub> KALAGV <sub>G</sub> KVVADQ <sub>F</sub> GNLLQAGQ <sub>a</sub>	3098.0	3097.7	P86621
DRT-J2	SLGGFLK <sub>G</sub> V <sub>G</sub> KALAGV <sub>G</sub> KMVADQ <sub>F</sub> GNLLQAGQ <sub>a</sub>	3129.6	3129.7	P86622
DRT-J3	SLGGFLK <sub>G</sub> V <sub>G</sub> KVLAGV <sub>G</sub> KVVADQ <sub>F</sub> GNLLQAGQ <sub>a</sub>	3126.9	3126.8	P86623
Consensus	*****.*****.*****.***	N.A.	N.A.	N.A.

Underlining indicates sequence confirmation by Edman degradation. Differentiation of Leu/Ile and Lys/Gln residues in DRS-J1, DRS-J2, DRS-J3 and DRS-J4 was based upon similarity to P84926; in DRS-J5 and DRS-J6, based upon similarity to Q90ZK5 and AAB24271.1; in DRS-J7, based upon similarity to P83638; in DRS-J8 and DRS-J9, based upon similarity to CAI99866; in DRT-J1, DRT-J2 and DRT-J3, based upon similarity to Q9PT75 and O93221. Lower case 'a' indicates C-terminal amidation. Multiple sequence alignment of dermatotoxin peptides generated using ClustalW 2.0.12. 'N.A.' stands for non-applicable. Consensus symbols, namely '\*', ':' and '.', means that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment, that conserved substitutions have been observed, and that semi-conserved substitutions are observed, respectively.



**Fig. 5.** MS/MS spectra interpretation for Deltorphin (A) and  $[\text{Met}_{(\text{ox})}]^6$ -Deltorphin (B). Observed MW: 954.44 Da (Deltorphin) and 970.44 Da ( $[\text{Met}_{(\text{ox})}]^6$ -Deltorphin). Observed ions are depicted in bold. Leu/Ile, and C-terminal Asn/Asp- $\text{NH}_2$  residues were differentiated based upon information available pertaining to molecules previously identified in other Phyllomedusinae species. The loss of  $\text{CH}_3\text{SOH}$  (64 Da) from the ions  $y_{3-6}$  and  $b_6$ , indicating the oxidation of  $[\text{Met}]^6$  is depicted. Precursor charge state: 1. Tolerance: 0.3 Th.



contain an Ile residue. The Ile/Leu residues in position 5 of hyposin-H4 and 5 and in the C-terminal of hyposin-H4 remain undifferentiated (Thompson et al., 2007a).

The biological activities of the hyposins are yet undetermined (Thompson et al., 2007a). However, sauvatide, a peptide identified in the skin secretion of *P. sauvagii* similar to hyposin-H3 (Table 4), was found to be a potent contractile agent upon the rat urinary bladder ( $EC_{50} = 2.2$  nM) (Wang et al., 2009). Although sauvatide failed to demonstrate activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* at concentrations up to 250  $\mu$ M (Wang et al., 2009), a similar peptide from *P. hypochondrialis* (AMP-1) (Table 4) was reported to possess antimicrobial activity against the gram-positive bacterium *Micrococcus luteus*, even though further details on the potency and spectrum of this molecule were not disclosed (Thompson et al., unpublished results).

The sauvatide precursor displays the characteristic structural arrangement of the dermaseptin superfamily, with a signal peptide followed by an acidic spacer (Nicolas and El Amri, 2009; Wang et al., 2009). Contrastingly, previous attempts of cloning hyposins by means of the employment of primers targeting conserved dermaseptin signal peptide have failed (Thompson et al., 2007a). The incipient knowledge pertaining to the structural diversity and biological activity of the hyposins and related peptides poses these molecules as promising investigation subjects.

### 3.2.6. Tyrosine-rich peptide

The molecular repertoire of the skin secretion of *P. jandaia* includes the tyrosine-rich peptide TRP-J1, which was found to be identical to its un-named counterpart in the skin secretion of *P. sauvagii* (Erspamer et al., 1986) (Table 5). A similar peptide (TRP-HA1), which possesses conservative substitutions (V1L and S5T), has also been detected in *P. azurea* (Thompson et al., 2007b). The abovementioned molecules bear C-terminal amidation and lack information pertaining to their biological actions.

The MSMS spectrum of TRP-J1 was obtained in Synapt instrumentation, which rendered high-resolution mass-spectral data. Nonetheless, a search for *w* and *d* ions aiming the mass-spectral assignment of Ile/Leu residues was inconclusive. Hence, Ile/Leu assignments were performed as per the similarity with the previously sequenced molecules.

### 3.2.7. Phylloseptins, stricto sensu dermaseptins, and dermatoxins

The most numerous peptides sequenced in the skin secretion of *P. jandaia* were those belonging to the dermaseptin superfamily, which is defined as a group of host-defense peptides present in the skin of Hylidae and Ranidae frogs (Nicolas and El Amri, 2009). The peptides in this superfamily are genetically related and possess conserved signal sequences and intervening segments in their pre-proforms although having diverged into structurally and functionally distinct families (Nicolas and El Amri, 2009).

Grippingly, preprodermaseptins-encoding peptides also include neuropeptides such as the opioid peptides (*P. sauvagii* and *P. bicolor*), [Thr]<sup>6</sup>-phyllokinin (*P. sauvagii*) and tryptophyllin-1 (*Agalychnis dacnicolor*) (Nicolas and El Amri, 2009). The conserved intervening segments or 'acidic propieces' carry negative charges that may interact

with the cationic lytic peptides, thus possibly preventing the host cell from self-inflicted damage (Michaelson et al., 1992; Tennessen, 2005). Accordingly, a number of peptides detected in our analysis (2318.1, 2553.3, 2664.32, 2682.3 and 2767.5 Da) are likely to represent fragments of dermaseptin acidic propieces. However, due to the repetitive nature of their primary structure, which bear numerous Asp and, most preponderantly, Glu residues, and due to the general poor ion abundance of their MS/MS spectra, their amino acid sequences could not be undoubtedly resolved.

In the skin of *P. jandaia*, dermaseptin *stricto sensu* (DRS), dermatoxin (DRT) and phylloseptin (PLS) families represented the dermaseptin superfamily (Table 6 and Table 7). Table 6 lists the sequenced *P. jandaia* PLS peptides and their detected truncated forms. In total, 7 full-length peptides were sequenced, in addition to 3 C-terminally and 7 N-terminally truncated forms. Truncated forms of PLS peptides have been reported previously (Thompson et al., 2007a). The peptide PLS-J5 was submitted to Edman N-terminal sequencing, by means of which it was possible to confirm the identity of its residues [Leu]<sup>2:4</sup> and [Ile]<sup>5:9;12:15</sup>. The identity of the Leu/Ile residues in the remaining PLS-J peptides, and in their truncated forms, was suggested based upon the identity of the residues assigned to PLS-J5 in their corresponding positions.

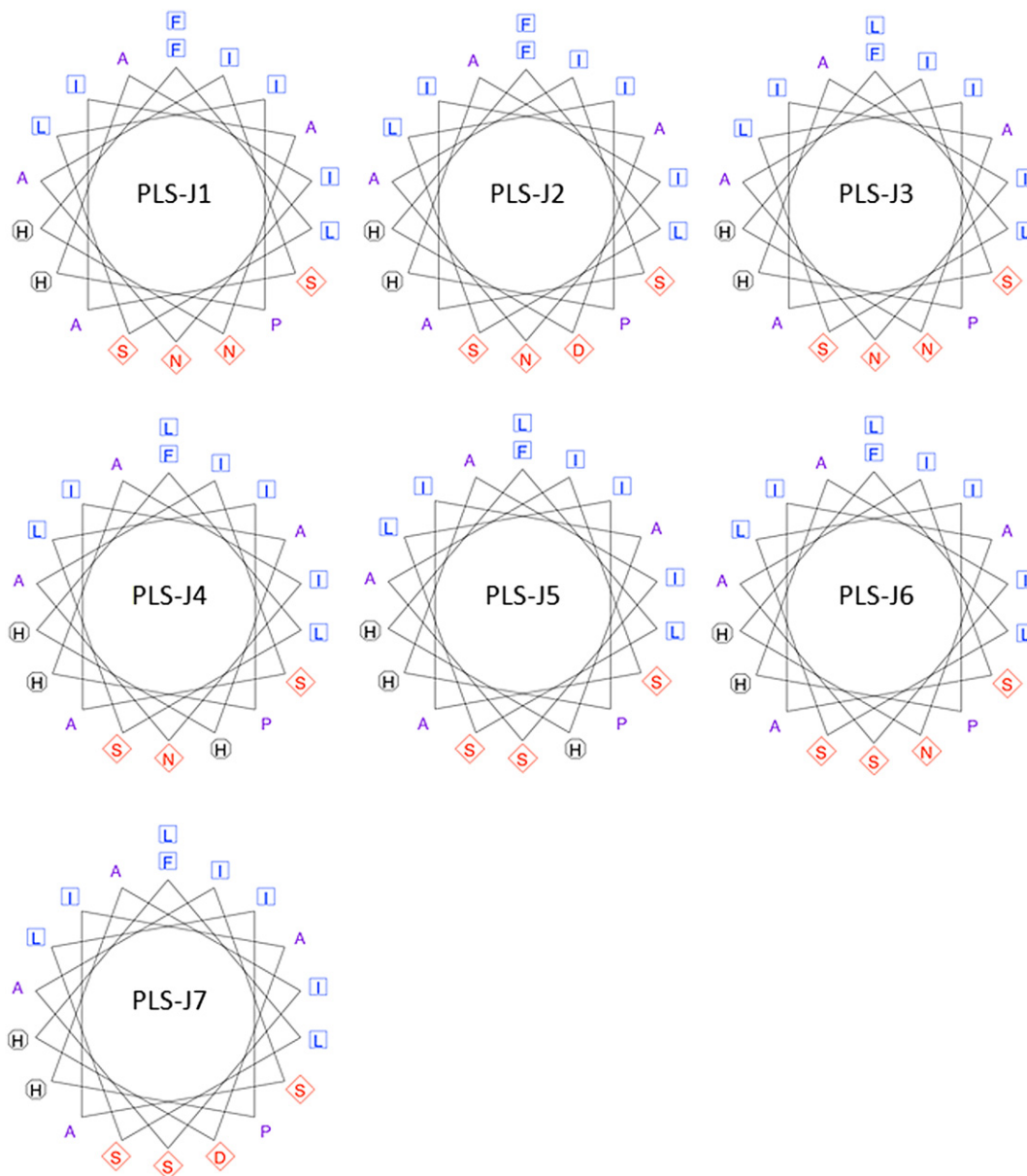
The MSMS spectrum of the truncated peptides PLS-J4 [3–19] and PLS-J6 [3–19] was also obtained in Synapt instrumentation, by which it was possible to notice the presence of the 72.09 *m/z*<sub>obs.</sub> (*w*<sub>a1</sub>) ion in both spectra (data not shown). This suggests that a Leu residue occupies the C-terminal position in both peptides. It should also be noticed that *w* (86.03 and 100.08 *m/z*) and *d* (1653.94 and 1667.90 *m/z*) ions corresponding to an Ile residue in the C-terminal were not detected in both peptides. In light of this, the identity of the C-terminal Leu residue was assigned to PLS-J3 to PLS-J7, and to their truncated forms. Moreover, in PLS-J4 [3–19] the identity of the [Ile]<sup>3:7;10</sup> residues, previously suggested based on its correspondence with PLS-J5, was supported by means of the verification of the ions *d*<sub>a3</sub> (258.10 *m/z*<sub>obs.</sub>), *d*<sub>b10</sub> (988.54 *m/z*<sub>obs.</sub>), *w*<sub>a7</sub> (815.44 *m/z*<sub>obs.</sub>) and *w*<sub>a11</sub> (1113.64 *m/z*<sub>obs.</sub>) (data not shown).

An N-terminally extended form of PLS-J4 (observed mass: 2220.2 Da) was also verified (not shown). The poor abundance of low-range *b* ions and high-range *y* ions in the obtained MS/MS spectrum of this molecule resulted in the impossibility of the confident assignment of its N-terminal extension, which may be constituted by an AL- or VP-doublet.

PLSs were originally characterized in the skin of *P. hypochondrialis* and *Phyllomedusa oreades* (Leite et al., 2005), although their presence has also been registered in other members of the *Phyllomedusa* genus such as *P. burmeisteri*, *Phyllomedusa distincta*, *P. rohdei*, *P. tarsius* and *P. tomopterna* (Leite et al., 2005), *P. azurea* (Thompson et al., 2007b; Kuckelhaus et al., 2009) and *Agalychnis lemur* (Conlon et al., 2007; Abdel-Wahab et al., 2008). These 19–21 amino acid-long antibacterial and anti-protozoan peptides, feature a conserved N-terminal region and a C-terminal amidation (as observed for the *P. jandaia* PLSs - Table 6). CD and NMR investigations revealed that the *P. hypochondrialis* peptides PLS-H1, PLS-H2 and PLS-H3

(formerly PS-1, PS-2 and PS-3, respectively) exhibit random coil conformation in aqueous solution and continuous helix conformation in membrane-mimetic media (Resende et al., 2008). Yet, the helical structures of these peptides exhibit an amphipathic character (Resende et al., 2008), which allows the efficient partition into the membrane interface, resulting in their membrane-destabilizing and pore-forming activities (Shai, 1999; Zasloff, 2002; Bechinger, 2005). It has been also found that the electrostatic interactions between the cationic side chains of residues in position 16 (PLS-H1 and PLS-H2) and 17 (PLS-H1, PLS-H2 and PLS-H3) with the negative end of the helix dipole stabilize and promote the helical conformation at the C-terminal (Resende et al., 2008).

The prediction of secondary structure of *P. jandaia* PLSs indicated that the  $\alpha$ -helix content of these peptides ranges from 74% to 100% (not shown). Moreover, when plotted in Schiffer-Edmunson wheel projections, the amphipathic nature of their cylindrical surfaces is evidenced (Fig. 6). However, it is worthy to notice the presence of the residue [Asp]<sup>16</sup> in PLS-J2 and PLS-J7. An acidic residue in proximity to the negative end of the helix dipole could destabilize the helical conformation, with possible implications to the biological actions of the peptides. For instance, PLS-L2 (FLSLIPHVISALSSL-NH<sub>2</sub>), present in the skin of *A. lemur*, does not feature basic residues next to the negative end of the helix dipole (Abdel-Wahab et al., 2008). Interestingly, PLS-L2 was found to possess *in vitro* and *in vivo* insulin



**Fig. 6.**  $\alpha$ -helical (Schiffer-Edmunson) wheel plots of *Phasmahyla jandaia* phylloseptins. Hydrophobic residues marked by squares. Hydrophilic residues marked by diamonds. Positive residues marked by octagons. The amphiphilic structure prediction of the peptides showed. Plot created by the pepwheel software.



releasing activity, but was inactive against *E. coli* and weakly active towards *S. aureus* (MIC = 50  $\mu$ M) (Abdel-Wahab et al., 2008). Contrastingly, PLS-L1 (LLGMIPLAISAI-SALSKL-NH<sub>2</sub>), embodying a [Lys]<sup>17</sup>, is devoid of insulin releasing activity and is highly active against *S. aureus* (MIC = 8  $\mu$ M) (Conlon et al., 2007). Moreover, it has been demonstrated that there is an inverse relationship between cationicity and insulin-releasing activity in peptides belonging to the temporin family (Abdel-Wahab et al., 2007) and pseudin-2 (Abdel-Wahab et al., 2005). Therefore, the investigation of the structure and function of the variants PLS-J2 and PLS-J7 could lead to insightful information. Yet, one may mention the similarity of the peptide PjP5-1 with the phylloseptins as evidenced in Fig. 7. The projection of PjP5-1 into a Schiffer-Edmunson wheel (not shown) fails to evidence an amphipathic structure, which suggests some distinct function for it.

Eleven *stricto sensu* dermaseptins (including a truncated form) and three dermatoxins were sequenced (Table 7). The peptide DRS-J10 was submitted to Edman N-terminal sequencing, by means of which it was possible to confirm the identity of its residues [Leu]<sup>2;6;7;13</sup>, [Lys]<sup>4;8</sup> and [Gln]<sup>12;19;25;27</sup>. The identity of Leu/Ile and Lys/Gln residues in the remaining DRS-J and DRT-J peptides was suggested based upon the similarity with previously characterized molecules (refer to Table 7 and Fig. 8). In order to further confirm the C-terminal sequence the listed dermaseptins and dermatoxins, an attempt of digesting these peptides with carboxypeptidase-Y was made (not shown). However, peptides DRS-J1 till DRS-J7 and DRT-J1 till DRT-J3 were protected from the reaction, thus further evidencing their amidated C-terminal.

The amino acid sequence of DRS-J7 is identical to DRS-DI1 (former Dermadistictin K, or DD K) from *P. distincta* (Batista, 1999). One should notice that DRS-J7 is C-terminally amidated whereas DRS-DI1 was originally reported without an amidation (Batista, 1999). The determination of the primary structure of DRS-DI1 was performed by Edman degradation and the sequence data was validated by means of the verification the molecular mass of the native peptide (Batista, 1999). Nonetheless, the reported molecular masses consisted in average masses (Batista, 1999), instead of monoisotopic masses, which hindered the confident determination of whether the peptide possessed a carboxamide terminal or not. Posterior studies pertaining to the characterization of the biological activity, three-dimensional structure, peptide–liposome interactions and liposome-fusion/lysis of DRS-DI1 interchangeably considered it in non-amidated (Brand et al., 2002) and amidated (Brand et al., 2002; Leite et al., 2008b; Silva et al., 2008; Verly et al., 2009) forms (similar situation is observed to DRS-DI2, former Dermadistictin L or DD L). Moreover, the truncated DRS-J7[3–33] was verified, although DRS-DI1[5–33] (2578.5 Da), previously reported in *P. distincta* (Batista, 1999), could not be detected in *P. jandaia*. As per its biological functions, DRS-DI1 possesses broad-range antibacterial (Batista, 1999), anti-*Trypanosoma cruzi* (Brand et al., 2002) and antifungal activities without toxicity to mammalian cells (Brand et al., 2002; Leite et al., 2008b). It has been observed that the liposome lysis caused by DRS-DI4 was preceded by a liposome–fusion phase (Silva et al., 2008). Yet,

```

PLS-J5  FLSLIPHAISAISIAIHJJa
PjP5-1  JLGMIPVAISAINIMk--Ja
          :*.:** *****. : *

```

**Fig. 7.** Amino acid sequence alignment of PLS-J5 and PjP5-1. Underlining indicates sequence confirmation by Edman degradation. Differentiation of Leu/Ile residues in PjP5-1 was based upon similarity to PLS-J5. Lower case 'k' indicates undifferentiated Lys/Gln residues. 'j' indicates undifferentiated Ile/Leu. Lower case 'a' indicates C-terminal amidation. Multiple sequence alignment generated using ClustalW 2.0.12. Sequence consensus displayed below aligned sequences. Consensus symbols, namely '\*', ':' and '.', means that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment, that conserved substitutions have been observed, and that semi-conserved substitutions are observed, respectively.

multidimensional solution NMR spectroscopy evidenced its  $\alpha$ -helical conformation spanning from position 7 till the carboxamide terminal, when in membrane-mimetic environment (Verly et al., 2009). This peptide aligns itself in parallel to phospholipid membranes, and was suggested to partition into the bilayer, thus disrupting the membrane arrangement (Verly et al., 2009).

DRS-J1 till DRS-J4 are similar to DRS-TA6 (former Dermaseptin-6) from *P. tarsius* (Prates et al., unpublished results), to DRS-DI4 (former DD Q1) from *P. distincta* (Batista, 1999) and to DRS-B3 from *P. bicolor* (Charpentier et al., 1998) (Fig. 8A). DRS-TA6, DRS-DI4 and DRS-B3 are active against the Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria (Prates et al., unpublished results; Batista, 1999; Charpentier et al., 1998). For DRS-DI4 the moderate activity against *Enterococcus faecalis* (MIC = 22.0  $\mu$ M) has also been reported (Batista, 1999). Hemolytic effects of DRS-DI4 and DRS-TA6 are only observed at 36 and 612  $\mu$ M, respectively (Prates et al., unpublished results; Batista, 1999).

DRS-J8 and DRS-J9 are identical to DRS-S7 from *P. sauvagii* (Chen et al., 2003) (Fig. 8B), except by the presence of an extra C-terminal Ala or Ser residue, respectively, and by the lack of C-terminal amidation. Those two facts are related since DRS-J8 and DRS-J9 lack the Gly residue necessary for the action of the  $\alpha$ -amidating enzyme (Kim and Seong, 2001). Fig. 8B also reports other peptides similar to DRS-J8 and DRS-J9, including DRS-DI2 (former Dermadistictin L, or DD L) from *P. distincta* (Batista, 1999), DRS-H1 (Chen et al., 2006) and DRS-H4 (former DShypo02) (Brand et al., 2006b) from *P. hypochondrialis*. As per the biological properties of the phyllomedusine counterparts of DRS-J8 and DRS-J9, it is worthy pointing that DRS-DI2 had limited activity against *P. aeruginosa* (MIC = 38  $\mu$ M) and *E. faecalis* (MIC = 10  $\mu$ M), but was highly active against *E. coli* (MIC = 2.5  $\mu$ M) and *S. aureus* (MIC = 1.3  $\mu$ M) (Batista, 1999). Similarly to DRS-DI1, DRS-DI2 possesses anti-*Trypanosoma cruzi* (Brand et al., 2002) and anti-fungal activities without toxicity to mammalian cells (Brand et al., 2002; Leite et al., 2008b). Also, it has been observed that the liposome lysis caused by DRS-DI2 was preceded by a liposome–fusion phase longer than that observed for DRS-DI1, (Silva et al., 2008).

DRS-J5 and DRS-J6 are similar to DRS-B8 (former DRS DRG2) from *P. bicolor* (Vouille et al., 1997) (Fig. 8C), whereas DRS-J10 is similar to DRS-S11 from *P. sauvagii* (Lequin et al., 2006) (Fig. 8D). No biological activity has so far been reported to both DRS-B8 and to DRS-S11. This fact renders

<b>A</b>	DRS-TA6	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLVGA--	<i>P. tarsius</i>
	DRS-DI4	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLVGAES	<i>P. distincta</i>
	DRS-B3	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLVGAE-	<i>P. bicolor</i>
	DRS-J4	ALWKDMLSGIGKLAGQAALGAVKTLV----a	<i>P. jandaia</i>
	DRS-J3	ALWKNMLSGIGKLAGQAALGAVKTLV----a	<i>P. jandaia</i>
	DRS-J1	GLWKNMLSGIGKLAGQAALGAVKTLV----a	<i>P. jandaia</i>
	DRS-J2	GLWKNMLSGIGKLAGQAALGAVKTLV----a .***:*.*****:*****	<i>P. jandaia</i>
<b>B</b>	DRS-H4	GLWKSLLKNVGVAAAGKAALNAVTDMVNQ-	<i>P. hypochondrialis</i>
	DRS-H1	GLWKSLLKNVGVAAAGKAALNAVTDMVNQa	<i>P. hypochondrialis</i>
	DRS-J9	GLWKSLLKNVGVAAAGKAALNAVTDMVNQS	<i>P. jandaia</i>
	DRS-J8	GLWKSLLKNVGVAAAGKAALNAVTDMVNQa	<i>P. jandaia</i>
	DRS-S7	GLWKSLLKNVGVAAAGKAALNAVTDMVNQa	<i>P. sauvagii</i>
	DRS-DI2	ALWKTLLKNVGVAAAGKAALNAVTDMVNQa .***:***** *****	<i>P. distincta</i>
	<b>C</b>	DRS-J5	GLWSKIKEAGKA AVKAAGKAALGAVANSVa
DRS-J6		GLWSKIKEAGKA AVKAAGKAALGAVADSVa	<i>P. jandaia</i>
DRS-B8		GLWSKIKEAGKAALTAAGKAALGAVSDAVa *****:*****:***	<i>P. bicolor</i>
<b>D</b>	DRS-J10	<u>ALWKSLLKGAGQLVGGVVQHFMGSQGQPES</u>	<i>P. jandaia</i>
	DRS-S11	ALWKTLLKGAGKVF <del>GH</del> VAKQFLGSQGQPES ***:*****:.* *.:*:*****	<i>P. sauvagii</i>
<b>E</b>	DRT-J1	SLGGFLKGVGKALAGVGVVADQFGNLLQAGQA	<i>P. jandaia</i>
	DRT-J2	SLGGFLKGVGKALAGVGVKVVADQFGNLLQAGQA	<i>P. jandaia</i>
	DRT-J3	SLGGFLKGVGKVLAVGVKVVADQFGNLLQAGQA	<i>P. jandaia</i>
	DRT-TA1	SLRGFLKGVGTALAGVGVVADQFDKLLQAGQ-a	<i>P. tarsius</i>
	DRT-B1	SLGSFLKGVGTTLASVGVVSDQFGKLLQAGQG	<i>P. bicolor</i>
	DRT-A1	SLGSFMKGVGKGLATVGVKIVADQFGKLLQAGQG	<i>P. azurea</i>
	DRT-S1	SLGSFMKGVGKGLATVGVKIVADQFGKLLQAGKG ** .*:****. ** ***:*:****.**:**:	<i>P. sauvagii</i>

**Fig. 8.** Amino acid sequence alignment of dermaseptins and dermatoxins from *P. jandaia* with previously sequenced phyllomedusine peptides. (A) Alignment of DRS-J1 (P86635), DRS-J2 (P86636), DRS-J3 (P86637) and DRS-J4 (P86638) with DRS-TA6 (P84926 - original name: Dermaseptin-6), DRS-DI4 (P83641 - original name: DD Q1), DRS-B3 (P81485). (B) Alignment of DRS-J8 (P86640) and DRS-J9 (P86641) with DRS-H4 (P84597 - original name: DS hypo02), DRS-H1 (CAJ76139), DRS-S7 (Q7T3K8) and DRS-DI2 (P83639 - original name: Dermadistinctin L). (C) Alignment of DRS-J5 (P86683) and DRS-J6 (P86684) with DRS-B8 (Q90ZK5 - original name: DRS DRG2). (D) Alignment of DRS-J10 (P86642) with DRS-S11 (CAI99866). (E) Alignment of DRT-J1 (P86621), DRT-J2 (P86622) and DRT-J3 (P86623) with DRT-TA1 (P84928 - original name: Dermaseptin-8), DRT-B1 (Q9PT75 - original name: Dermatoxin), DRT-A1 (O93221 - original name: DRP-AA-1-1), DRT-S1 (CAI26288 - original name: Dermatoxin S). Molecules with which *P. jandaia* peptides are aligned consist in the 'best hits' obtained by means of similarity search using BLASTP 2.2.23+ and the Swiss-Prot database. Underlining indicates sequence confirmation by Edman degradation. Differentiation of Leu/Ile residues in DRS-J1, DRS-J2, DRS-J3, DRS-J4, DRS-J5, DRS-J6, DRS-J10, DRT-J1, DRT-J2 and DRT-J3 was based upon similarity with previously known phyllomedusine sequences as depicted above. Lower case 'a' indicates C-terminal amidation. Multiple sequence alignment generated using ClustalW 2.0.12. Sequence consensus displayed below aligned sequences. Consensus symbols, namely '\*', ':' and '.', means that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment, that conserved substitutions have been observed, and that semi-conserved substitutions are observed, respectively. Peptide nomenclature as per Amiche et al., 2008.

DRS-J5, DRS-J6 and DRS-S11 and their phyllomedusine counterparts attractive investigation subjects.

As previously mentioned, three novel dermatoxin variants were sequenced in *P. jandaia* (Table 7 and Fig. 8E). Dermatoxins have been previously found in *P. bicolor* (Amiche et al., 2000), *P. sauvagii* (Chen et al., 2005), *P. tarsius* (Prates et al., unpublished results), *Agalychnis danicolor* and *Agalychnis annae* (Wechselberger, 1998). It has been reported that DRT-TA1 (originally named as Dermaseptin-8) from *P. tarsius*, is active against the Gram-positive, and Gram-negative bacteria besides displaying hemolytic

activity (Prates et al., unpublished results). DRT-B1 (formerly known as dermatoxin) was found to be particularly active against mollicutes and Gram-positive bacteria, although having lower activity upon Gram-negative bacteria (Amiche et al., 2000). The bacterial plasma membrane is thought to be the primary target of DRT-B1 due to the membrane depolarization observed upon the application of this peptide, being its cell killing mechanisms likely involved with the alteration of membrane permeability rather than membrane solubilization (Amiche et al., 2000).

### 3.3. Evolution of biochemical characters in Phyllomedusinae

A recent study has proposed a well-supported phylogenetic hypothesis for phyllomedusines, based on sequence data from up to 10 mitochondrial and nuclear loci and three intervening transfer RNAs for 45 species of that group. *Phrynomedusa* was found to be sister to a group comprising all remaining genera, within which *Cruziophyla* is the sister to all remaining genera (*Phasmahyla*, *Phyllomedusa* and a clade containing the paraphyletic *Hylomantis* with *Pachymedusa* plus *Agalychnis*). The clade composed of *Hylomantis*, *Pachymedusa* and *Agalychnis* is sister to the clade containing *Phasmahyla* and *Phyllomedusa*, within which *Phasmahyla* is sister to *Phyllomedusa*. The monophyly of *Phasmahyla* and of Phyllomedusinae itself is supported (Faivovich et al., 2010).

Considering those results and the distribution of skin bioactive peptides families in Phyllomedusinae, isolated from 17 species within *Agalychnis* (5 species), *Phyllomedusa* (11 species) and *Cruziophyla calcarifer*, general predictions regarding their occurrence in yet unprospected species could be made (Faivovich et al., 2010). In that sense, the presence deltorphins, dermorphins, dermaseptins, dermatoxins, phyllokinins, PLSs, plasticins, tryptophyllins and the peptide sauvagine (hyposin-related - see Table 4) was expected across the clade containing *Agalychnis*, *Phyllomedusa* and *Phasmahyla* (Faivovich et al., 2010). Corroborating with that hypothesis, apart from plasticins, all peptide families cited above were detected in *P. jandaia*. Phylloxins, expected to be minimally present in the species of the clade containing *P. camba*, *P. boliviana* and the *P. burmeisteri* and *P. tarsi* groups (Faivovich et al., 2010), were not detected in *P. jandaia*, further suggesting that this family may constitute a synapomorphy of that clade. The forecasted presence of caeruleins in *Phasmahyla* (Faivovich et al., 2010) was also confirmed upon the verification of [Arg]<sup>4</sup>-phyllocaerulein. The presence of Phyllolitorins, whose distribution was deemed as 'ambiguous' (Faivovich et al., 2010) was not detected. Moreover, taking into account that Phygo Xa has been verified in *P. hypochondrialis* (Conceição et al., 2007) and *P. jandaia*, one can make the prediction that canonical BPPs (i.e. Pyr–Aaa<sub>n</sub>–Gln–Ile–Pro–Pro) are to be minimally encountered across the clade containing *Phasmahyla* and *Phyllomedusa*. Corroborating with that supposition, according to Silva et al. (unpublished results), the ion 1215 [M + H]<sup>+</sup>, corresponding to Phygo Xa, has been detected in *P. oreades*, *P. tomopterna*, *P. rohdei*, *P. tarsi*, *P. centralis*, *P. distincta*, *P. bicolor*, *P. burmeisteri*, and *P. ayeaye*. Similarly, considering that tyrosine-rich peptides have been detected in *P. azurea* (Thompson et al., 2007b), *P. sauvagii* (Erspamer et al., 1986), and *P. jandaia*, the occurrence of tyrosine-rich peptides is minimally expected across the clade containing *Phasmahyla* and *Phyllomedusa*.

It is currently understood that the genes encoding the peptides of the dermaseptin superfamily were originated from a common ancestral locus that has undergone several rounds of duplication and subsequent loci divergence events (Nicolas and El Amri, 2009). Moreover, most duplication events occurred before the radiations of South American hylids (Nicolas and El Amri, 2009). By analyzing Fig. 8, it is possible to notice that a number of sub-families

within the *stricto sensu* dermaseptins occur, and to hypothesize that duplication events giving rise to such sub-families took place prior to, at least, the radiation of the clade including *Phasmahyla* and *Phyllomedusa*. Hence, efforts of systematic sequencing of *stricto sensu* dermaseptin peptides may assist the identification of their sub-families, the determination of the timing of the duplication events, and of which Phyllomedusinae clade a given sub-family of *stricto sensu* dermaseptin is a synapomorphy.

## 4. Conclusions

This study reports the sequencing/identification of 57 peptides from the skin secretion of *P. jandaia*, including phylloseptins, dermaseptins *stricto sensu*, dermatoxins, hyposins, tryptophyllins, caerulein-related, bradykinin-related, bradykinin potentiating, tyrosine-rich, and opioid peptides, in addition to five peptide families without significant similarity to other known molecules. The fact that 57 out of the 203 molecules detected were identified signalizes that other natural variants or even new molecular families still await discovery. Such natural peptidic repertoire may assist upcoming investigations pertaining to the relationships of molecular structure and function aiming at the development of therapeutical or other biotechnological application of phyllomedusine peptides. Besides, the present study contributes to the understanding of the evolution of biochemical characters of the phyllomedusines, since the molecular diversity in the skin of the genus *Phasmahyla* was hereby assessed for the first time.

## Acknowledgements

This study was funded by FAPEMIG, FINEP/MCT, CAPES, INCTOX/FAPESP and CNPq. The authors acknowledge the invaluable support of Mariana T.Q. de Magalhães (LEM/EMBRAPA DF) and of Michael Richardson (FUNED MG) for their assistance in the experimental phase of the present study and for their insightful discussions and suggestions.

## Conflict of interest Statement

None declared.

## References

- Ab'Saber, A.N., 1977. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. Geomorfologia 52, 1–21.
- Abdel-Wahab, Y.H., Marenah, L., Flatt, P.R., Conlon, J.M., 2007. Insulin releasing properties of the temporin family of antimicrobial peptides. Protein and Peptide Letters 14 (7), 702–707.
- Abdel-Wahab, Y.H., Marenah, L., Orr, D.F., Shaw, C., Flatt, P.R., 2005. Isolation and structural characterisation of a novel 13-amino acid insulin-releasing peptide from the skin secretion of *Agalychnis calcarifer*. Biological Chemistry 386 (6), 581–587.
- Abdel-Wahab, Y.H., Power, G.J., Flatt, P.R., Woodhams, D.C., Rollins-Smith, L.A., Conlon, J.M., 2008. A peptide of the phylloseptin family from the skin of the frog *Hylomantis lemur* (Phyllomedusinae) with potent in vitro and in vivo insulin-releasing activity. Peptides.
- Alford, R.A., Richards, S.J., 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. Annual Review of Ecology and Systematics 30, 133–165.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25 (17), 3389–3402.

- Amiche, M., Delfour, A., Nicolas, P., 1998. Opioid peptides from frog skin. *Exs* 85, 57–71.
- Amiche, M., Ladram, A., Nicolas, P., 2008. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. *Peptides*.
- Amiche, M., Seon, A.A., Wroblewski, H., Nicolas, P., 2000. Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. *European Journal of Biochemistry/FEBS* 267 (14), 4583–4592.
- Anastasi, A., Bertaccini, G., Cei, J.M., De Caro, G., Erspamer, V., Impicciatore, M., 1969. Structure and pharmacological actions of phyllocaerulein, a caerulein-like nonapeptide: its occurrence in extracts of the skin of *Phyllomedusa sauvagei* and related *Phyllomedusa* species. *British Journal of Pharmacology* 37 (1), 198–206.
- Anastasi, A., Bertaccini, G., Erspamer, V., 1966. Pharmacological data on phyllokinin (bradykyl-iso-leucyl-tyrosine *o*-sulphate) and bradykyl-iso-leucyl-tyrosine. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 27 (3), 479–485.
- Annesley, T.M., 2003. Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 49 (7), 1041–1044.
- Baeuerle, P.A., Huttner, W.B., 1987. Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification. *The Journal of Cell Biology* 105 (6 Pt 1), 2655–2664.
- Bairoch, A., Apweiler, R., 2000. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research* 28 (1), 45–48.
- Batista, C.V., da Silva, L.R., Sebben, A., Scaloni, A., Ferrara, L., Paiva, G.R., Olamendi-Portugal, T., Possani, L.D., Bloch Jr., C., 1999. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides* 20 (6), 679–686.
- Bechinger, B., 2005. Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides: a <sup>31</sup>P solid-state NMR spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1712 (1), 101–108.
- Blaustein, A.R., Kiesecker, J.M., 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5, 597–608.
- Bowie, J.H., Tyler, M.J., 2006. Host defence peptides from Australian amphibians: caerulein and other neuropeptides. In: Kastin, J.A. (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides*. Academic Press, London, pp. 283–289.
- Brand, G.D., Krause, F.C., Silva, L.P., Leite, J.R., Melo, J.A., Prates, M.V., Pesquero, J.B., Santos, E.L., Nakaie, C.R., Costa-Neto, C.M., Bloch Jr., C., 2006a. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* 27 (9), 2137–2146.
- Brand, G.D., Leite, J.R., de Sa Mandel, S.M., Mesquita, D.A., Silva, L.P., Prates, M.V., Barbosa, E.A., Vinecky, F., Martins, G.R., Galasso, J.H., Kuckelhaus, S.A., Sampaio, R.N., Furtado Jr., J.R., Andrade, A.C., Bloch Jr., C., 2006b. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347 (3), 739–746.
- Brand, G.D., Leite, J.R., Silva, L.P., Albuquerque, S., Prates, M.V., Azevedo, R.B., Carregaro, V., Silva, J.S., Sa, V.C., Brandao, R.A., Bloch Jr., C., 2002. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (51), 49332–49340.
- Broccardo, M., Erspamer, V., Falconieri Erspamer, G., Improta, G., Linari, G., Melchiorri, P., Montecucchi, P.C., 1981. Pharmacological data on dermorphins, a new class of potent opioid peptides from amphibian skin. *British Journal of Pharmacology* 73 (3), 625–631.
- Carvalho-e-Silva, A.M.P.T., Silva, G.R., Carvalho-e-Silva, S.P., 2009. A new species of Phasmahyla Cruz, 1990 from the Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil (Amphibia, Hylidae, Phyllomedusinae). *Zootaxa* 2120, 15–26.
- Charpentier, S., Amiche, M., Mester, J., Vouille, V., Le Caer, J.P., Nicolas, P., Delfour, A., 1998. Structure, synthesis, and molecular cloning of dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (24), 14690–14697.
- Chen, T., Orr, D.F., O'Rourke, M., McLynn, C., Bjourson, A.J., McClean, S., Hirst, D., Rao, P., Shaw, C., 2004. Pachymedusa dacinicolor tryptophyllin-1: structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA. *Regulatory Peptides* 117 (1), 25–32.
- Chen, T., Shaw, C., 2003. Cloning of the (Thr6)-phyllokinin precursor from *Phyllomedusa sauvagei* skin confirms a non-consensus tyrosine *O*-sulfation motif. *Peptides* 24 (8), 1123–1130.
- Chen, T., Tang, L., Shaw, C., 2003. Identification of three novel *Phyllomedusa sauvagei* dermaseptins (sVI–sVIII) by cloning from a skin secretion-derived cDNA library. *Regulatory Peptides* 116 (1–3), 139–146.
- Chen, T., Walker, B., Zhou, M., Shaw, C., 2005. Dermatoxin and phylloxin from the waxy monkey frog, *Phyllomedusa sauvagei*: cloning of precursor cDNAs and structural characterization from lyophilized skin secretion. *Regulatory Peptides* 129 (1–3), 103–108.
- Chen, T., Zhou, M., Gagliardo, R., Walker, B., Shaw, C., 2006. Elements of the granular gland peptidome and transcriptome persist in air-dried skin of the South American orange-legged leaf frog, *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* 27 (9), 2129–2136.
- Collins, J.P., Storfer, A., 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9 (2), 89–98.
- Conceição, K., Konno, K., de Melo, R.L., Antoniazzi, M.M., Jared, C., Sciani, J. M., Conceição, I.M., Prezoto, B.C., de Camargo, A.C., Pimenta, D.C., 2007. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* 28 (3), 515–523.
- Conlon, J.M., 1999. Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. *Regulatory Peptides* 79 (2–3), 71–81.
- Conlon, J.M., 2006. Bradykinin-related peptides from frog skin. In: Kastin, J.A. (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides*. Academic Press, London, pp. 291–294.
- Conlon, J.M., Iwamura, S., King, J.D., 2009a. Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1163, 75–82.
- Conlon, J.M., Kolodziejek, J., Nowotny, N., 2004. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta* 1696 (1), 1–14.
- Conlon, J.M., Kolodziejek, J., Nowotny, N., 2009b. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (8), 1556–1563.
- Conlon, J.M., Woodhams, D.C., Raza, H., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., Vaudry, H., Rollins-Smith, L.A., 2007. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). *Toxicon* 50 (4), 498–506.
- Cruz, C.A.G., 1991. Sobre as relações intergenéricas de Phyllomedusinae da Floresta Atlântica (Amphibia, Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 50, 709–726.
- Donnelly, M.A., Crump, M.L., 1998. Potential effects of climate change on two Neotropical amphibian assemblages. *Climatic Change* 39, 541–561.
- Drummond, G.M., Martins, C.S., Machado, A.B.M., Sebaio, F.A., Antonini, Y. (Eds.), 2005. Biodiversidade em Minas Gerais – um Atlas para sua Conservação. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- Erspamer, V., Falconieri Erspamer, G., Cei, J.M., 1986. Active peptides in the skins of two hundred and thirty American amphibian species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 85 (1), 125–137.
- Erspamer, V., Melchiorri, P., Falconieri Erspamer, G., Montecucchi, P.C., de Castiglione, R., 1985. *Phyllomedusa* skin: a huge factory and store-house of a variety of active peptides. *Peptides* 6 (Suppl. 3), 7–12.
- Erspamer, V., Melchiorri, P., Falconieri-Erspamer, G., Negri, L., Corsi, R., Severini, C., Barra, D., Simmaco, M., Kreil, G., 1989. Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (13), 5188–5192.
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Baêta, D., Jungfer, K., Álvares, G.F.R., Brandão, R. A., Sheil, C., Barrientos, L.S., Barrio-Amorós, C.L., Cruz, C.A.G., Wheeler, W.C., 2010. The phylogenetic relationships of the charismatic poe frog, *Phyllomedusinae* (Anura, Hylidae). *Cladistics* 3, 227–261.
- Frost, D.R., 2010. *Amphibian Species of the World: An Online Reference, Version 5.4*. American Museum of Natural History.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., De Sá, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M., Wheeler, W.C., 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297, 1–370.
- Geourjon, C., Deléage, G., 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer Applications in the Biosciences* 11 (6), 681–684.
- Green, D.M., 2005. The ecology of extinction: population fluctuation and decline in amphibians. *Biological Conservation* 111 (3), 331–343.
- Halliday, T., 2005. Diverse factors influencing amphibian population declines. In: Lannoo, M.J. (Ed.), *Amphibian Declines: The Conservation Status of United States Species*. University of California Press, Berkeley.
- Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A.H., Kuzmin, S.L., 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404, 752–755.
- Jagannadham, M.V., 2009. Identifying the sequence and distinguishing the oxidized-methionine from phenylalanine peptides by MALDI TOF/TOF mass spectrometry in an Antarctic bacterium *Pseudomonas Syringae*. *Proteomics Insights* 2, 27–31.

- Kehoe, J.W., Bertozzi, C.R., 2000. Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chemistry & Biology* 7 (3), R57–61.
- Kim, K., Seong, B.L., 2001. Peptide amidation: Production of peptide Hormones in vivo and in vitro. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 6, 244–251.
- Kratzer, R., Eckerskorn, C., Karas, M., Lottspeich, F., 1998. Suppression effects in enzymatic peptide ladder sequencing using ultraviolet - matrix assisted laser desorption/ionization - mass spectrometry. *Electrophoresis* 19 (11), 1910–1919.
- Kuckelhaus, S.A., Leite, J.R., Muniz-Junqueira, M.I., Sampaio, R.N., Bloch Jr., C., Tosta, C.E., 2009. Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia). *Experimental Parasitology* 123 (1), 11–16.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (Oxford, England) 23 (21), 2947–2948.
- Lazarus, L.H., Bryant, S.D., Cooper, P.S., Salvadori, S., 1999. What peptides these deltorphins be. *Progress in Neurobiology* 57 (4), 377–420.
- Lee, R.W., Huttner, W.B., 1983. Tyrosine-O-sulfated proteins of PC12 pheochromocytoma cells and their sulfation by a tyrosylprotein sulfotransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 258 (18), 11326–11334.
- Leite, F.S.F., Juncá, F.A., Eterovick, P.C., 2008a. Status do conhecimento, endemismo e conservação de anfíbios anuros da Serra do Espinhaço, Brasil. *Megadiversidade* 4, 182–200.
- Leite, J.R., Brand, G.D., Silva, L.P., Kuckelhaus, S.A., Bento, W.R., Araujo, A.L., Martins, G.R., Lazzari, A.M., Bloch Jr., C., 2008b. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 151 (3), 336–343.
- Leite, J.R., Silva, L.P., Rodrigues, M.I., Prates, M.V., Brand, G.D., Lacava, B.M., Azevedo, R.B., Bocca, A.L., Albuquerque, S., Bloch Jr., C., 2005. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides* 26 (4), 565–573.
- Lequin, O., Ladram, A., Chabbert, L., Bruston, F., Convert, O., Vanhoye, D., Chassaing, G., Nicolas, P., Amiche, M., 2006. Dermaseptin S9, an alpha-helical antimicrobial peptide with a hydrophobic core and cationic termini. *Biochemistry* 45 (2), 468–480.
- Licht, L.E., 2003. Shedding light on ultraviolet radiation and amphibian embryos. *BioScience* 53 (6), 551–561.
- Marenah, L., Flatt, P.R., Orr, D.F., McClean, S., Shaw, C., Abdel-Wahab, Y. H., 2004. Skin secretion of the toad *Bombina variegata* contains multiple insulin-releasing peptides including bombesin and entirely novel insulinotropic structures. *Biological Chemistry* 385 (3–4), 315–321.
- Melchiorri, P., Negri, L., 1996. The dermorphin peptide family. *General Pharmacology: The Vascular System* 27 (7), 1099–1107.
- Michaelson, D., Rayner, J., Couto, M., Ganz, T., 1992. Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *Journal of Leukocyte Biology* 51 (6), 634–639.
- Mignogna, G., Severini, C., Erspamer, G.F., Siciliano, R., Kreil, G., Barra, D., 1997. Tachykinins and other biologically active peptides from the skin of the Costa Rican phyllomedusid frog *Agalychnis callidryas*. *Peptides* 18 (3), 367–372.
- Montecucchi, P.C., 1985. Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. *Peptides* 6 (Suppl. 3), 187–195.
- Montecucchi, P.C., Gozzini, L., Erspamer, G.F., 1985. Primary structure determination of a tryptophan-containing tridecapeptide from *Phyllomedusa rohdei*. *International Journal of Peptide and Protein Research* 27 (2), 175–182.
- Moore, K.L., 2003. The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (27), 24243–24246.
- Negri, L., Melchiorri, P., 2006. Opioid peptides from frog skin and Bv8-related peptides. In: Kastin, J.A. (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides*. Academic Press, London, pp. 269–275.
- Negri, L., Melchiorri, P., Lattanzi, R., 2000. Pharmacology of amphibian opiate peptides. *Peptides* 21 (11), 1639–1647.
- Nicolas, P., El Amri, C., 2009. The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* 1788 (8), 1537–1550.
- Pearson, W.R., 1990. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183, 63–98.
- Pimenta, A.M., Stocklin, R., Favreau, P., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F., 2001. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15 (17), 1562–1572.
- Rates, B., Bemquerer, M.P., Richardson, M., Borges, M.H., Morales, R.A., De Lima, M.E., Pimenta, A.M., 2007. Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha): shedding light on venoms from a neglected group. *Toxicon* 49 (6), 810–826.
- Regoli, D., Jukic, D., Gobeil, F., Rhaleb, N.E., 1993. Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 71 (8), 556–567.
- Resende, J.M., Moraes, C.M., Prates, M.V., Cesar, A., Almeida, F.C., Mundim, N.C., Valente, A.P., Bemquerer, M.P., Pilo-Veloso, D., Bechinger, B., 2008. Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, and -3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. *Peptides* 29 (10), 1633–1644.
- Sachon, E., Clodic, G., Galanet, C., Amiche, M., Ollivaux, C., Soyey, D., Bolbach, G., 2009. D-amino acid detection in peptides by MALDI-TOF-TOF. *Analytical Chemistry* 81 (11), 4389–4396.
- Schiffer, M., Edmundson, A.B., 1967. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophysical Journal* 7 (2), 121–135.
- Shai, Y., 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et biophysica acta* 1462 (1–2), 55–70.
- Silva, L.P., Leite, J.R., Brand, G.D., Regis, W.B., Tedesco, A.C., Azevedo, R.B., Freitas, S.M., Bloch Jr., C., 2008. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy. *Comparative Biochemistry and Physiology* 151 (3), 329–335.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W., 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* (New York, NY) 306 (5702), 1783–1786.
- Tennessen, J.A., 2005. Enhanced synonymous site divergence in positively selected vertebrate antimicrobial peptide genes. *Journal of Molecular Evolution* 61 (4), 445–455.
- Thompson, A.H., Bjourson, A.J., Orr, D.F., Shaw, C., McClean, S., 2007a. A combined mass spectrometric and cDNA sequencing approach to the isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretions of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. *Peptides* 28 (7), 1331–1343.
- Thompson, A.H., Bjourson, A.J., Orr, D.F., Shaw, C., McClean, S., 2007b. Amphibian skin secretomics: application of parallel quadrupole time-of-flight mass spectrometry and peptide precursor cDNA cloning to rapidly characterize the skin secretory peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: discovery of a novel peptide family, the hyposins. *Journal of Proteome Research* 6 (9), 3604–3613.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 (22), 4673–4680.
- Tyler, M.J., Stone, D.J., Bowie, J.H., 1992. A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 28 (4), 199–200.
- Verano-Braga, T., 2009. Minimização da estrutura primária do peptídeo TsHpt-I: identificação dos resíduos de aminoácidos cruciais e da estrutura peptídica mínima para a manutenção de seus efeitos anti-hipertensivos. Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. Doutorado em Bioquímica e Imunologia.
- Verano-Braga, T., de Lima, M.E., Pimenta, A.M.C., 2009. From bradykinin-potentiating peptides to Hypotensins: more than four decades of research. In: de Lima, M.E., Pimenta, A.M.C., Martin-Eauclaire, M., Zingalli, R., Rochat, H. (Eds.), *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, vol. Ed. UFMG, Belo Horizonte, pp. 235–247.
- Verano-Braga, T., Rocha-Resende, C., Silva, D.M., Ianzer, D., Martin-Eauclaire, M.F., Bougis, P.E., de Lima, M.E., Santos, R.A., Pimenta, A.M., 2008. Tityus serrulatus Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371 (3), 515–520.
- Verly, R.M., de Moraes, C.M., Resende, J.M., Aisenbrey, C., Bemquerer, M.P., Pilo-Veloso, D., Valente, A.P., Almeida, F.C., Bechinger, B., 2009. Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin K by multidimensional solution and oriented 15N and 31P solid-state NMR spectroscopy. *Biophysical Journal* 96 (6), 2194–2203.
- Vouille, V., Amiche, M., Nicolas, P., 1997. Structure of genes for dermaseptins B, antimicrobial peptides from frog skin. Exon 1-encoded prepeptide is conserved in genes for peptides of highly different structures and activities. *FEBS Letters* 414 (1), 27–32.



- Wang, L., Zhou, M., Zhou, Z., Chen, T., Walker, B., Shaw, C., 2009. Sauvamide—a novel amidated myotropic decapeptide from the skin secretion of the waxy monkey frog, *Phyllomedusa sauvagei*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383 (2), 240–244.
- Wechselberger, C., 1998. Cloning of cDNAs encoding new peptides of the dermaseptin-family. *Biochimica et biophysica acta* 1388 (1), 279–283.
- Young, B.E., Lips, K.R., Reaser, J.K., Ibáñez, R., Salas, A.W., Cedeño, J.R., Coloma, L. A., Ron, S., La Marca, E., Meyer, J.R., Muñoz, A., Bolaños, F., Chaves, G., Romo, D., 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15 (5), 1213–1223.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415 (6870), 389–395.