

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

**Clonagem e expressão heteróloga de
PnTx2-6, uma toxina ativa na função erétil:
obtenção e caracterização parcial de seus mutantes.**

TESE DE DOUTORADO

Fernanda Silva Torres

**Orientadora: Prof^a . Dr^a Maria Elena de Lima
Perez Garcia.**

Universidade Federal de Minas Gerais

**Co-Orientador: Dr. Marcelo Ribeiro Vasconcelos
Diniz.**

Fundação Ezequiel Dias

**Belo Horizonte
2011**

Fernanda Silva Torres

**Clonagem e expressão heteróloga de
PnTx2-6, uma toxina ativa na função erétil:
obtenção e caracterização parcial de seus mutantes.**

Tese submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof^a . Dr^a Maria Elena de Lima Perez Garcia.

Universidade Federal de Minas Gerais

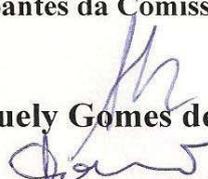
Co-Orientador: Dr. Marcelo Ribeiro Vasconcelos Diniz.

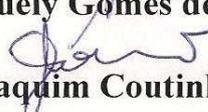
Fundação Ezequiel Dias

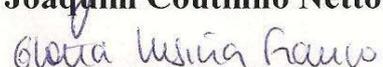
**Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2011**

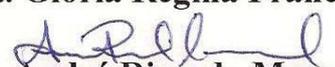


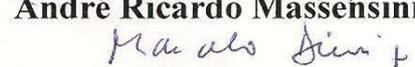
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE FERNANDA SILVA TORRES. Aos vinte e seis dias do mês de agosto de 2011, às 13:00 horas reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Clonagem e expressão heteróloga de PnTx2-6, uma toxina ativa na função erétil. Obtenção e caracterização parcial de seus mutantes”, requisito final para a obtenção do grau de *Doutor em Ciências: Bioquímica*. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão, Profa. Maria Elena de Lima Perez Garcia da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Joaquim Coutinho Netto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, aprovada; Dra. Suely Gomes de Figueiredo da Universidade Federal do Espírito Santo, aprovada; Dra. Glória Regina Franco da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. André Ricardo Massensini da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Marcelo Ribeiro Vasconcelos Diniz, co-orientador, da Fundação Ezequiel Dias, aprovada; Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de agosto de 2011.

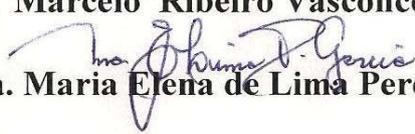

Dra. Suely Gomes de Figueiredo – UFES

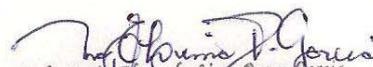

Dr. Joaquim Coutinho Netto – FMRP/USP


Dra. Glória Regina Franco – UFMG


Dr. André Ricardo Massensini – UFMG


Dr. Marcelo Ribeiro Vasconcelos Diniz co-orientador-FUNED


Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia-orientadora-UFMG


Prof. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Coordenadora do Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, no Núcleo de Estudo de Estrutura e Função de Biomoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG. Órgãos financiadores: CNPq, INCTTOX-FAPESP, Fapemig, FUNED, FUEP, ICB-UFMG.

DEDICATÓRIAS

*“É urgente partir sem medo e sem demora
para onde nasce os sonhos, buscar novas
artes de esculpir a vida”.*

Armando Arthur

A mamãe pelo possível e impossível;

Ao papai pela proteção espiritual;

A vovó Mariinha pela experiência dos 90 anos;

Ao Flávio pelo amor maduro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família: Mamãe e Vovó Mariinha, pela criação, educação, base, experiências de vida, orações, incentivo e por entenderem que a distância fez-se necessária ao amadurecimento. Ao meu pai, meu zelador espiritual, que mesmo com poucos anos de convivência norteou a minha essência.

Ao Flávio, meu noivo, por toda a sua paciência, cumplicidade e compreensão, pelo incentivo e entendimento das ausências físicas.

A minha orientadora Dra Maria Elena de Lima, por esse trabalho, pela oportunidade do desafio da Biologia Molecular, pelo carinho, palavras de apoio, confiança e até pelas cobranças, por estes 6 anos de parceria.

Ao meu co-orientador Dr. Marcelo Ribeiro Vasconcelos Diniz, (que eu chamo carinhosamente de Marcelão) a descoberta desse doutorado! Pelos ensinamentos de Biologia Molecular e de vida, pelo carinho, compreensão, confiança, diplomacia, respeito e pelo maior aprendizado, a paciência.

Aos amigos de muito tempo, Alice, Isac, “Mandi” (Cláudia), “Furinho” (Carolina Calíari), Bebela, Loló e Fernanda Braz pelos desabafos, torcida, admiração, respeito e cumplicidade.

A Lú (Luciana Lanza) por todas as palavras que me acalmaram e ajudaram na manutenção da minha sanidade, pela troca de experiências, por sua psicologia nata, pelo auxílio nos experimentos.

A Carol (Carolina Nunes), amiga e colega de trabalho, pela calma, compreensão, respeito e paciência. Por ter iniciado os experimentos e me permitir continuá-los, pelos experimentos de liberação de glutamato.

A Lela (Gabriela Gontijo Montandon) pela alegria, gargalhadas e irmandade. Por toda a sua compreensão, pela semelhança de personalidade e princípios, por toda a identificação que possuímos uma com a outra.

A Francine, minha aluna de iniciação científica, pela admiração, tolerância, interesse e complementação da minha formação docente.

Ao Dr. Agenor Valadares pelo auxílio na espectrometria de massas.

Ao Dr. Adriano Pimenta pela colaboração.

A Dra. Kênia Pedrosa Nunes pela colaboração.

Aos colegas de Laboratório de Venenos e Toxinas Animais pelas experiências compartilhadas. Em especial ao Júlio César, pelo auxílio técnico.

As colegas da FUNED pela recepção e empréstimos dos equipamentos, em especial a Ana Luiza Bittencourt Paiva por todo o carinho, compartilhamento de experiências e principalmente paciência e a Sra Ana Valentim do Carmo pelo apoio técnico.

Aos professores e funcionários da pós graduação em Bioquímica e Imunologia pela formação profissional.

A Celise por toda a paciência e resolução de problemas burocráticos.

Ao CNPq, FUNED, FAPEMIG, FUEP, INCTTOX (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A banca examinadora pela disponibilidade e sugestões.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho. Muito obrigada!

ÍNDICE

DEDICATÓRIAS.....	5
AGRADECIMENTOS	6
ÍNDICE	8
ABSTRACT	12
RESUMO.....	14
LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIATURAS.....	20
LISTA DE AMINOÁCIDOS.....	25
1. INTRODUÇÃO	27
1.1. Aspectos gerais.....	27
1.2. As aranhas e a espécie <i>Phoneutria nigriventer</i>	29
1.3. A peçonha da aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	30
1.3.1. A fração PhTx2 e a toxina PnTx2-6.....	34
1.4. Outras toxinas animais que causam priapismo.	38
1.5. Os mecanismos de detumescência e da ereção peniana	39
1.5.1. O pênis.....	39
1.5.2. As vias de sensibilização ao cálcio e os mecanismos de contração do músculo liso..	40
1.5.3. A fisiologia da ereção.....	46
1.6. A disfunção erétil e seus tratamentos	51
2. OBJETIVOS	54
2.1. Objetivo Geral	54
2.2. Objetivos Específicos.....	54
3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	56
3.1. Relevância	56
3.2. Justificativa.....	57
4. MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1. Material.....	59
4.1.1. Material Biológico	59
4.1.1.1. Aranhas	59
4.1.1.2. Linhagens de <i>E. coli</i>	59
4.1.1.3. Animais experimentais	59
4.1.2. Equipamentos.....	60
4.1.2.1. Centrífugas.....	60
4.1.2.2. Demais equipamentos.....	60
4.1.2.3. Colunas de cromatografia	61
4.1.3. Reagentes	61
4.1.3.1. Reagentes para eletroforese de DNA.....	61

4.1.3.2. Reagentes para eletroforese de proteína	61
4.1.3.3. Padrões de massa e tamanho molecular.....	62
4.1.3.4. Reagentes para cromatografias.....	62
4.1.3.5. Enzimas.....	62
4.1.3.6. Kits.....	63
4.1.3.7. Vetor de expressão	63
4.1.3.8. Outros reagentes.....	65
4.2. Métodos	66
4.2.1. Meios de cultura, tampões e soluções	66
4.2.1.1. Soluções para eletroforese	67
4.2.1.1.1. SDS-PAGE	67
4.2.1.1.2. Agarose.....	68
4.2.1.2. Antibióticos	68
4.2.1.3. Soluções para cromatografias	69
4.2.2. Protocolos experimentais	69
4.2.2.1. Obtenção do RNA extraído da glândula da aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	69
4.2.2.2. Estimativa da concentração do RNA	70
4.2.2.3. Análise do RNA.....	71
4.2.2.4. Síntese do cDNA de fita simples.....	71
4.2.2.5. Obtenção e amplificação do cDNA de dupla fita	73
4.2.2.6. Purificação do fragmento de DNA amplificado por PCR	74
4.2.2.7. Mini-preparação do DNA plasmídico	75
4.2.2.8. Digestão enzimática do DNA amplificado por PCR e do DNA plasmídico	76
4.2.2.9. Desfosforilação do DNA plasmídico linear.....	76
4.2.2.10. Clonagem do fragmento de DNA amplificado por PCR no DNA plasmídico linear.....	76
4.2.2.11. Preparação de células competentes de <i>E. coli</i>	79
4.2.2.12. Transformação das células competentes de <i>E. coli</i>	79
4.2.2.13. Análise por PCR das colônias transformantes	80
4.2.2.14. Isolamento do DNA plasmídico em larga escala	81
4.2.2.15. Sequenciamento de DNA	82
4.2.2.16. Expressão da proteína recombinante	83
4.2.2.17. Dosagem de proteínas.....	84
4.2.2.18. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes	84
4.2.2.19. Purificação da proteína recombinante rPnTx2-6	85
4.2.2.19.1. Cromatografia de afinidade	85
4.2.2.19.2. Cromatografia de gel filtração.....	85
4.2.2.19.3. Clivagem da proteína de fusão com a enzima enteroquinase	86
4.2.2.19.4. Cromatografia de fase reversa	86
4.2.2.20. Western blotting	87

4.2.2.21. Espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF MS	87
Parte 2- MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS	88
4.2.2.22. Mutações sítio dirigidas.....	88
4.2.2.22.1. Metilação.....	90
4.2.2.22.2. Reação de mutação.....	90
4.2.2.22.3. Transformação do plasmídeo recombinante mutado em células <i>E. coli</i> da linhagem DH5 α TM T1 ^R	93
4.2.2.22.4. Seleção dos clones mutantes	94
Métodos – Parte 3.....	94
4.2.2.23. Avaliação da atividade biológica por medida da ereção peniana	94
Métodos – Parte 4.....	98
4.2.2.24. Liberação de L-glutamato em sinaptosomas	98
4.2.2.24.1. Obtenção de sinaptosomas	98
4.2.2.24.2. Controle da integridade sinaptosomal por dosagem da atividade da enzima Lactato Desidrogenase	99
4.2.2.24.3. Liberação de L-glutamato	100
4.2.2.25. Análises estatísticas.....	101
5. Resultados -Parte 1.....	103
5.1. Obtenção da proteína recombinante rPnTx2-6	103
5.1.1. Análise do RNA.....	103
5.1.2. Síntese, amplificação e análise do cDNA	103
5.1.3. Clivagem enzimática do DNA plasmídico e do cDNA amplificado por PCR	105
5.1.4. Determinação da concentração do cDNA amplificado por PCR e do DNA plasmídico	108
5.1.5. Clonagem do DNA codificador da toxina nativa no vetor de expressão	108
5.1.5.1 Transformação em células <i>E. coli</i> da linhagem NM 522 e PCR para a triagem dos clones recombinantes pET32c(+)-PnTx2-6.....	110
5.1.6. Sequenciamento de DNA	112
5.1.7. Expressão da proteína recombinante em células BL21(DE3)pLysS	114
5.1.8. Purificação da proteína recombinante rPnTx2-6	115
5.1.8.1. Cromatografias de afinidade e gel filtração, eletroforese em gel de poliacrilamida, Western Blotting, e estimativa da recuperação protéica	115
5.1.8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blotting.....	117
5.1.8.3. Recuperação protéica	118
5.1.8.4. Clivagem enzimática da proteína de fusão com enteroquinase	119
5.1.8.5. Purificação da rPnTx2-6 em cromatografia de fase reversa.....	119
5.1.8.6. Espectrometria de massas	121
5.1.9. rPnTx2-6 potencia a função erétil de ratos após injeção subcutânea	122
Resultados - Parte 2. MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS	123
5.2. Mutações sítio dirigidas	123

5.2.1	Transformação em células E. coli da linhagem DH5 α T1 ^R e PCR para a triagem dos clones mutantes	124
5.2.2.	Sequenciamento de DNA dos clones mutantes	128
5.2.3.	Análise dos DNAs plasmídicos mutantes	131
5.2.4.	Expressão das proteínas recombinantes mutantes em células BL21(DE3)pLysS	133
5.2.5.	Purificação das toxinas mutantes	136
5.2.5.1.	Cromatografias de afinidade e gel filtração	136
5.2.6.	Alinhamento das sequências das proteínas recombinantes mutantes e cálculo das massas moleculares	142
5.2.7.	Espectrometria de massas das proteínas recombinantes mutantes	144
5.2.8.	Liberação de L-glutamato em sinaptosomas induzida pela proteína de fusão recombinante rPnTx2-6 e por seus derivados mutantes	147
6.	DISCUSSÃO	151
7.	CONCLUSÕES	168
8.	PERSPECTIVAS	170
9.	REFERÊNCIAS	172
10.	ANEXOS	191
10.1.	Anexos I	191
10.2.	Anexos II: Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG)	194

ABSTRACT

The venom of Brazilian 'armed' spider, *Phoneutria nigriventer*, contains several toxins; many of them are active on ion channels and other receptors of mammals and insects. Accidents involving humans are characterized by various symptoms including: neurotoxicity, intense pain, sudoresis, agitation, salivation, priapism, cardiac perturbations characterized by tachycardia, arrhythmia and death. Priapism is a painful and involuntary erection of the penis that is also induced by the purified toxins PnTx2-5 and PnTx2-6. In addition, electrophysiological studies have shown that these toxins slow down the inactivation current of sodium channels. Our group has studied the effects of PnTx2-6 in erectile function of rats and mice. It has shown that PnTx2-6 potentiates the erectile function in normotensive rats and fully or partially restored the erectile function of DOCA-salt hypertensive rats, stz-diabetics and old mice. The effects of PnTx2-6 on erectile function are shown to be mediated by NO that increases in the presence of this toxin. These results suggest that PnTx2-6 could be an important tool for the development of new pharmacological agents for the treatment of erectile dysfunction. As the toxin is produced in low quantity in the spider's venom gland, this is a limiting factor for studies. Therefore, the recombinant production of this toxin is of great interest providing it to a range of experimental approaches. In this study, the encoding region of the PnTx2-6 toxin was cloned and expressed as thioredoxin fusion protein in the cytoplasm of *E. coli*. After purification and cleavage, tests *in vivo* indicated that the recombinant toxin presents activity similar to that of the native toxin and the Western-Blotting analysis revealed that the anti-venom antibody of *Phoneutria nigriventer* is reactive against recombinant toxin. The effect of rPnTx2-6 in the erection function was evaluated through changes in intracavernosal pressure/mean arterial pressure ratio (ICP/MAP) during electrical stimulation of the major pelvic ganglion of normotensive rats. Subcutaneous injection of rPnTx2-6 (12µg/kg), as the natural peptide, potentiated the ICP/MAP induced by ganglionic stimulation. The rPnTx2-6 fusion protein increased the glutamate release by cortical synaptosomes in the rat brain. We also obtained mutant fusion proteins to check for the key role of

certain amino acid residues in the toxin action, as previously suggested by molecular modeling. The mutants were constructed from *in vitro* synthesis by using specific primers that flanked the regions of mutations. The recombinant vector pET32c(+)-PnTx2-6, previously cloned, was used as a template for mutations. The mutant plasmids were transformed in *E. coli*, sequenced, and expressed as thioredoxin fusion proteins. The mutant fusion proteins were purified (affinity and gel filtration chromatographies). To date, six mutants were idealized (Y₃₅N; Y₃₅A; W₃₇L; W₃₇A; Y₃₅NW₃₇L; Y₃₅AW₃₇A). Five (Y₃₅N; Y₃₅A; W₃₇L; W₃₇A; Y₃₅AW₃₇A) were sequenced (DNA), purified, and their molecular masses were determined. The mutant fusion proteins, comparative with native toxin and recombinant fusion proteins, were tested for their effect on glutamate release. All the mutants were less effective in releasing glutamate compared to the native toxin PnTx2-6 and recombinant fusion protein rPnTx2-6. In conclusion, we expressed the rPnTx2-6 active and some of its mutants (Y₃₅N; Y₃₅A; W₃₇L; W₃₇A; Y₃₅AW₃₇A) evidencing the key role of some amino acid residues implied in the biological activity of this toxin.

Keywords: *Escherichia coli*, rPnTx2-6, mutants, penile erection, glutamate release.

RESUMO

A peçonha da aranha brasileira *Phoneutria nigriventer*, conhecida popularmente como armadeira, é composta por diversas toxinas ativas em canais iônicos e outros receptores de mamíferos e insetos. Os envenenamentos envolvendo seres humanos são caracterizados por vários sintomas, incluindo neurotoxicidade, dor intensa, sudorese, agitação, salivação, priapismo, perturbações cardíacas, como taquicardia, arritmia e morte. Priapismo é uma ereção dolorosa e involuntária do pênis, também verificada na presença das toxinas purificadas, PnTx2-5 e PnTx2-6. Estudos eletrofisiológicos mostraram que estas toxinas deslocam a corrente de inativação de canais para sódio para potenciais hiperpolarizantes. Nosso grupo vem estudando o efeito da toxina PnTx2-6 na função erétil de ratos camUongos. O tratamento com esta toxina potenciou a função erétil de ratos normotensos e reverteu total ou parcialmente, a disfunção erétil de ratos hipertensos DOCA-sal, e de camUongos idosos e diabéticos. O seu efeito mostrou-se ser mediado pelo NO, que aumenta na presença desta molécula. Estes resultados sugerem que a PnTx2-6 pode ser uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos para o tratamento de disfunção erétil. Esta toxina é produzida em baixa quantidade na glândula de peçonha da aranha e isto é um fator limitante para estes estudos. Desta forma, houve um grande interesse na produção da proteína recombinante, de modo a provê-la para uma ampla investigação. Neste estudo, a região codificadora da toxina PnTx2-6 foi clonada e expressa como uma proteína de fusão à tiorredoxina, no citoplasma de *E. coli*. Após purificações e clivagens, testes *in vivo* indicam que a toxina recombinante apresenta atividade similar à toxina nativa e análises de Western-Blot revelaram que anticorpos anti-peçonha de *Phoneutria nigriventer* foram reativos contra esta molécula. O efeito da rPnTx2-6 na função erétil foi avaliado através de mudanças na razão entre a pressão intracavernosal e pressão arterial média (PIC/PAM) sob estimulação elétrica do gânglio pélvico maior de ratos normotensos. Injeções subcutâneas de rPnTx2-6 (12µg/kg), como verificado para a toxina nativa, potenciaram a relação PIC/PAM sob estimulação gangliônica. A proteína de fusão recombinante foi

efetiva, por sua vez, aumentando a liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais de rato. Obtivemos também mutantes da toxina recombinante, visando-se verificar o papel chave de certos resíduos de aminoácidos para a ação desta toxina, conforme previsto por estudos prévios de modelagem molecular. Os mutantes foram construídos por síntese *in vitro* usando-se iniciadores específicos que continham em seus flancos as regiões de mutação. O vetor recombinante pET32c (+)-PnTx2-6, anteriormente clonado, foi usado como um molde para as mutações. Os plasmídeos mutantes foram transformados em *E. coli*, sequenciadas e expressas como proteínas de fusão à tioredoxina. Estas foram purificadas (por cromatografia de afinidade e gel filtração). Até o momento, 6 mutantes foram idealizados (Y₃₅N; Y₃₅A; W₃₇L; W₃₇A; Y₃₅NW₃₇L; Y₃₅AW₃₇A), dois quais 5 foram sequenciados (Y₃₅N; Y₃₅A; W₃₇L; W₃₇A; Y₃₅AW₃₇A) purificados e suas massas moleculares foram determinadas. Em comparação com a toxina nativa e a proteína de fusão recombinante, as proteínas de fusão mutantes foram testadas quanto à liberação de glutamato e foram menos ativas. Em conclusão, neste trabalho expressaram-se rPnTx2-6 e alguns de seus mutantes (Y₃₅N; Y₃₅A; W₃₇L; W₃₇A; Y₃₅AW₃₇A), evidenciando-se o papel chave de alguns de seus resíduos de aminoácidos implicados na atividade biológica desta toxina.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, rPnTx2-6, mutantes, ereção peniana, liberação de glutamato.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aranha <i>Phoneutria nigriventer</i> em posição de ataque ou defensiva..	30
Figura 2: Alinhamento das sequências de aminoácidos das toxinas isoladas da fração PhTx2 da peçonha da aranha <i>Phoneutria nigriventer</i> ..	35
Figura 3: Seção transversal do pênis.	40
Figura 4: Mecanismos moleculares da contração do músculo liso e flacidez peniana.....	43 e 44
Figura 5: Vias dependentes e de sensibilização ao cálcio no músculo liso do pênis.....	45
Figura 6: Mecanismos moleculares do relaxamento do músculo liso e ereção peniana.....	49 e 50
Figura 7: Representação esquemática do DNA plasmídico pET-32 a-c(+) usado na clonagem do DNA codificador da toxina PnTx2-6..	64
Figura 8: Representação esquemática da reação de RT-PCR..	72
Figura 9: Representação esquemática dos locais nos quais os iniciadores anelam na região codificante da toxina funcional PnTx2-6.	73
Figura 10: A) Esquema da clonagem do DNA codificador da toxina PnTx2-6 no DNA plasmídico pET 32c(+). B) Representação da região codificante da proteína PnTx2-6 e da estratégia de clonagem.....	78
Figura 11: Representação esquemática dos locais nos quais os iniciadores anelam na região codificante da toxina PnTx2-6 inserida no DNA plasmídico pET32c(+).	81
Figura 12: A) Protocolo das mutações sítio-dirigidas. B) Anelamento dos iniciadores usados nas reações de mutação sítio dirigidas.....	89
Figura 13: Representações do método cirúrgico e dos aparelhos utilizados na indução/registo da ereção peniana em ratos normais.....	96
Figura 14: Avaliação da função erétil..	97
Figura 15: Reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase.....	99
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) para análise do RNA total extraído da glândula da aranha <i>P. nigriventer</i>	103
Figura 17: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR..	104

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da clivagem enzimática do DNA plasmídico com as enzimas de restrição Nco I e Xho I..	106
Figura 19: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da clivagem enzimática do cDNA amplificado por PCR.....	107
Figura 20: Representação esquemática da estratégia de clonagem para a inserção do cDNA da toxina PnTx2-6 no vetor de expressão pET32c(+)..	109
Figura 21: Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR de um clone recombinante.....	111
Figura 22: Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR de um clone recombinante.....	111
Figura 23: Sequência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos da toxina PnTx2-6.....	113
Figura 24: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de um clone transformante.....	114
Figura 25: Eletroforese em gel de poliacrilamida da proteína de fusão expressa, rTrx-PnTx2-6.....	115
Figura 26: Cromatografia de afinidade.....	116
Figura 27: Eletroforese em gel de poliacrilamida do sobrenadante contendo a proteína de fusão rPnTx2-6-Trx e das frações obtidas após as cromatografias de afinidade e gel filtração.....	117
Figura 28: Cromatografia de fase reversa.....	120
Figura 29: Espectrometria de massas da proteína recombinante rPnTx2-6..	121
Figura 30: Indução de ereção peniana por estimulação gangliônica em ratos controle normotensos antes e após injeção subcutânea da rPnTx2-6.....	122
Figura 31: Eletroforese em gel de agarose do produto da mutação sítio dirigida Y35N35.....	125
Figura 32: Eletroforese em gel de agarose do produto da mutação sítio dirigida W37L37.....	125
Figura 33: Eletroforese em gel de agarose do produto da mutação sítio dirigida Y35A35.....	126
Figura 34: Eletroforese em gel de agarose do produto da mutação sítio dirigida W37A37.....	126

Figura 35: Eletroforese em gel de agarose do produto da mutação sítio dirigida Y35A35-W37A37.....	127
Figura 36: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR dos clones mutantes.....	132
Figura 37: Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão da proteína de fusão rPnTx2-6-Trx mut Y35N35.	133
Figura 38: Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão da proteína de fusão rPnTx2-6-Trx mut W37L37..	134
Figura 39: Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão da proteína de fusão rPnTx2-6-Trx mut Y35A35.....	134
Figura 40: Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão da proteína de fusão rPnTx2-6-Trx mut W37A37.	135
Figura 41: Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão da proteína de fusão rPnTx2-6-Trx mut Y35A35W37A37.	135
Figura 42: Cromatografia de afinidade de rPnTx2-6-Trx mut Y35N35.....	137
Figura 43: Cromatografia de afinidade de rPnTx2-6-Trx mut W37L37.....	138
Figura 44: Cromatografia de afinidade de rPnTx2-6-Trx mut Y35A35.	139
Figura 45: Cromatografia de afinidade de rPnTx2-6-Trx mut W37A37.	140
Figura 46: Cromatografia de afinidade de rPnTx2-6-Trx mut Y35A3W37A375.	141
Figura 47: Espectrometria de massas da proteína recombinante mutante rPnTx2-6 Y35N35.....	145
Figura 48: Espectrometria de massas da proteína recombinante mutante rPnTx2-6 Y35A35W37A37.	146
Figura 49: Atividade da enzima lactato desidrogenase.....	148
Figura 50: Efeito da proteína de fusão recombinante e suas proteínas de fusão mutantes na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais...	149
Figura 51: Comparação dos resultados de indução de ereção peniana por estimulação gangliônica em ratos controle normotensos antes e após injeção subcutânea da rPnTx2-6 (A) e da PnTx2-6 nativa (B).....	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores PnTx2-6 Fw e PnTx2-6 Rv.	73
Tabela 2: Iniciadores S-Tag e T7 terminator.....	81
Tabela 3: Iniciadores para a Mutação PnTx2-6/PnTx2-5 Tyr ₃₅ -Asn ₃₅	91
Tabela 4: Iniciadores para a Mutação PnTx2-6/PnTx2-5 Trp ₃₇ - Leu ₃₇	91
Tabela 5: Iniciadores para a Mutação PnTx2-6/Alanina Tyr ₃₅ -Ala ₃₅	91
Tabela 6: Iniciadores para a Mutação PnTx2-6/Alanina Trp ₃₇ - Ala ₃₇	92
Tabela 7: Iniciadores para a Mutação PnTx2-6/Alanina Tyr ₃₅ -Ala ₃₅ e Trp ₃₇ - Ala ₃₇	92
Tabela 8: Iniciadores controle da reação de mutação	92
Tabela 9: Protocolo de liberação de L-glutamato.....	100
Tabela 10: Protocolo da reação da lactato desidrogenase.....	101
Tabela 11: Análise espectrofotométrica do cDNA	108
Tabela 12: Análise espectrofotométrica do DNA plasmídico.	108
Tabela 13: Alinhamento das sequências nucleotídicas de um clone com a região codificadora da toxina madura PnTx2-6.....	112
Tabela 14: Concentração protéica.....	118
Tabela 15: Alinhamento das sequências nucleotídicas do clone mutante Y35N35 com a região codificante da toxina madura PnTx2-6.....	128
Tabela 16: Alinhamento das sequências nucleotídicas do clone mutante W37L37 com a região codificante da toxina madura PnTx2-6.	129
Tabela 17: Alinhamento das sequências nucleotídicas do clone mutante Y35A35 com a região codificante da toxina madura PnTx2-6.....	129
Tabela 18: Alinhamento das sequências nucleotídicas do clone mutante W37A37 com a região codificante da toxina madura PnTx2-6.....	130
Tabela 19: Alinhamento das sequências nucleotídicas do clone mutante Y35A35W37A37 com a região codificante da toxina madura PnTx2-6.....	130
Tabela 20: Comparação das sequências de aminoácidos e massas moleculares da proteína rPnTx2-6 e de seus derivados mutantes.....	143
Tabela 21: Diferenças nos aminoácidos e alguns códons usados na tradução do DNA e expressão das toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 na glândula da aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	159

LISTA DE ABREVIATURAS

7-NI: 7-nitroindazol;
AC: adenilato ciclase;
Ach: acetilcolina;
ACN: acetonitrila;
AMPc ou cAMP: adenosina monofosfato cíclico;
Ang: angiotensina;
Ap: ampicilina;
BSA: soroalbumina bovina;
CaBP: proteína ligada à cálcio (*calcium binding protein*)
CaM: calmodulina;
CAP: proteína ativadora de catabólito (*catabolyte activator protein*)
CAT: cloranfenicol acetiltransferase;
Cav: canal para cálcio sensível a voltagem;
cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar;
CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal;
cGMP: guanosina monofosfato cíclico;
CHO: ovário de rata Chinesa (*Chinese hamster ovary*);
cNOS: óxido nítrico sintase isoforma constitutiva;
CPI-17: fosfoproteína inibitória;
DAB: 3,3'- diaminobenzidina;
DAG: diacilglicerol;
dATP: deoxiadenina trifosfato;
dCTP: deoxicitosina trifosfato;
DE: disfunção erétil;
DEPC: dietil pirocarbonato;
dGTP: deoxiguanina trifosfato;
DL₅₀: dose letal média;
dNTP: desoxirribonucleotídeo trifosfato;
DOCA- SAL: desoxicorticosterona e salina;
DTT: ditioneitol;
dTTP: deoxitimina trifosfato;

EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético;

Ek: enteroquinase;

eNOS: óxido nítrico sintase isoforma endotelial;

ET: endotelina;

ExPASy: Expert Protein Analysis System;

Fw: *foward* (iniciador senso);

GAP: proteína ativada por GTPase;

GDH: glutamato desidrogenase;

GDI: inibidor de dissociação de GDP;

GDP: guanosina bifosfato;

GEF: fator de troca de guanina nucleotídeo;

GPM: gânglio pélvico maior;

GPRC: receptores acoplados à proteína G;

GST: glutationa S-transferase

GTE: solução de 50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA;

GTP: guanosina trifosfato;

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano ácido sulfônico;

i.c.: intracerebral;

i.e.: isto é;

IC₅₀: concentração inibitória média;

IMAC: cromatografia de afinidade com ion metal imobilizado;

IP3: inositol trifosfato;

IPTG: isopropil-b-D-tiogalactopiranoside;

IRAG: cinase dependente de cGMP associada ao receptor para IP3;

Kb: Quilobases;

KCL: cloreto de potássio;

kDa: Quilodaltos;

KRH: Krebs- Ringer- Hepes;

Lac: promotor Lac (híbrido do promotor de *E. coli* lactose que controla a transcrição do gene lacZ da β- galactosidase)

LB: Meio de cultura Luria –Bertani;

LDH: lactato desidrogenase;

L-NAME: N (omega)-nitro-L- arginina hidrocloreto de metil éster;

m/v: razão massa por volume;

M: Molar;
mA: miliamper;
MALDI TOF: matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight MS;
MBP: proteína ligada à maltose (*maltose binding protein*)
MLC: cadeia leve da miosina;
MLCK: cinase da cadeia leve da miosina;
MLCP: fosfatase da cadeia leve da miosina;
MM: massa molecular;
mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro;
NADP: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato;
NANC: não adrenérgicos-não colinérgicos;
Nav: canal para sódio sensível a voltagem;
NE: noradrenalina;
NIH: Instituto Nacional de Consenso da Saúde;
NiSO₄: Sulfato de níquel;
NMDA: N-metil-D-aspartato
nNOS: óxido nítrico sintase isoforma neuronal;
NO: óxido nítrico;
NOS: óxido nítrico sintase;
N-terminal: Extremidade aminoterminal de proteínas;
ODQ: 1H-[1,2,4] oxidazolo [4,3,-alquinoxalin-1-one];
Oligo (dt): Oligonucleotídeo polidesoxiditimidina;
OPA: Tampão “one phor all”;
PAGE-SDS: eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio;
PAM (MAP): pressão arterial média;
pb: pares de base;
PBS: tampão fosfato salina;
PCR: reação em cadeia de polimerase;
PDE₅: fosfodiesterase tipo 5;
PEG: Polietilenoglicol;
pET 32c(+): Plasmídeo para Expressão por T7 RNA polimerase;
PGE₁: prostaglandina E₁;
PGF_{2α}: prostaglandina F;

PhTx1: fração 1 da peçonha da aranha *P. nigriventer* obtida por métodos cromatográficos;

PhTx2: fração 2 da peçonha da aranha *P. nigriventer* obtida por métodos cromatográficos;

PhTx3: fração 3 da peçonha da aranha *P. nigriventer* obtida por métodos cromatográficos;

PhTx4: fração 4 da peçonha da aranha *P. nigriventer* obtida por métodos cromatográficos;

PIC (ICP): pressão intracavernosa;

PIP₂: fosfatidil inositol bifosfato;

PKA: proteína cinase A;

PKC: proteína cinase C;

PKG: proteína cinase G;

P_L: promotor P_L responsável pela transcrição de moléculas de DNA λ ;

PLC: fosfolipase C;

PnTx1: polipeptídeo purificado da fração PhTx1;

PnTx2-1, PnTx2-3, PnTx2-5, PnTx2-6 e PnTx2-9: polipeptídeos purificados da fração PhTx2;

PnTx3-1, PnTx3-2, PnTx3-3, PnTx3-4, PnTx3-5 e Pn3-6: polipeptídeos purificados da fração PhTx3;

PnTx4(5-5), PnTx4(6-1): polipeptídeos purificados da fração PhTx4;

PRGC: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina;

PUC: plasmídeo de clonagem universal;

RAS: sarcoma RAT;

Rho A: família do gene homólogo RAS, membro A;

Rho GAP: proteína ativadora de GTPase da Rho;

Rho GDI: inibidor de dissociação de GDP;

Rho GEF: fator de troca de nucleotídeo guanidina

RNA: ácido ribonucléico;

RNAse: Ribonuclease;

RPC: cromatografia de fase reversa

rPnTx2-6: toxina recombinante PnTx2-6;

RT: transcriptase reversa;

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa;

Rv: *reverse* (iniciador antisenso);
SAM: s-adenosil-metionina;
SDS: dodecil sulfato de sódio;
sGC: enzima guanilato ciclase;
SP: substância P;
Tac: promotor Tac (um híbrido dos promotores de *E. coli* triptofano e lactose)
TAE: solução de Tris-HCl, acetato, EDTA;
TBE: solução de Tris-HCl, borato, EDTA.
TE: solução de 10 mM Tris, 1mM EDTA;
TEMED: N N N' N' tetrametiletileno diamino
TFA: ácido trifluoroacético;
TM: tamanho molecular (para DNA);
Tris-HCl: tris (hidroximetil) aminometano acidificado com ácido clorídrico;
Trx: tiorredoxina;
Ts1: *Tityus* gama toxina;
Ts3: *Tityus serrulatus* toxina 3;
TTX: tetrodotoxina
UFC: unidades formadoras de colônias;
VIP: peptídeo intestinal vasoativo;
W₃₇A (W37A37): mutante com substituição do resíduo Trp₃₇ para Ala;
W₃₇L (W37L37): mutante com substituição do resíduo Trp₃₇ para Leu;
WB: Western Blot;
X-Gal: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D-galactopiranosídeo;
Y₃₅A W₃₇A (Y35A35 W37A37): mutante com substituições dos resíduos Tyr₃₅ para Ala e Trp₃₇ para Ala;
Y₃₅A(Y35A35): mutante com substituição do resíduo Tyr₃₅ para Ala;
Y₃₅N (Y35N35): mutante com substituição do resíduo Tyr₃₅ para Asn;
Y₃₅N (Y35N35): mutante com substituições dos resíduos Tyr₃₅ para Asn e Trp₃₇ para Leu;

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Ácido aspártico (**Asp - D**)

Isoleucina (**Ile - I**)

Ácido glutâmico (**Glu - E**)

Leucina (**Leu - L**)

Alanina (**Ala - A**)

Lisina (**Lys - K**)

Arginina (**Arg - R**)

Metionina (**Met - M**)

Asparagina (**Asn - N**)

Prolina (**Pro - P**)

Cisteína (**Cys - C**)

Serina (**Ser - S**)

Fenilalanina (**Phe - F**)

Tirosina (**Tyr - Y**)

Glicina (**Gly - G**)

Treonina (**Thr - T**)

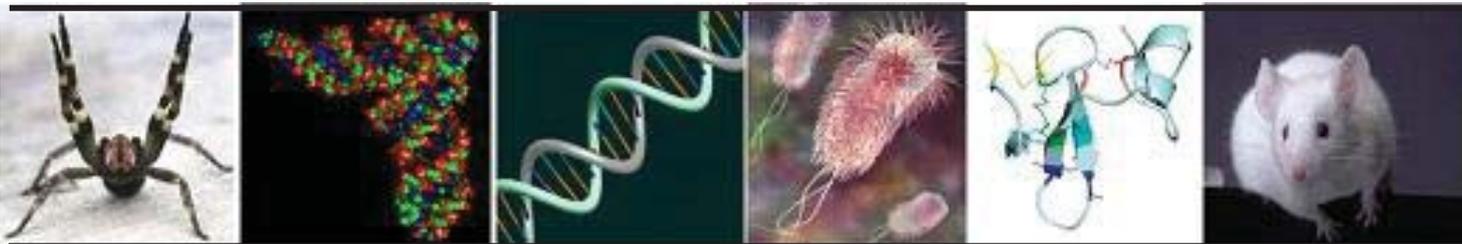
Glutamina (**Gln - Q**)

Triptofano (**Trp - W**)

Histidina (**His - H**)

Valina (**Val - V**)

1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

A aranha *Phoneutria nigriventer* Keyserling, 1891 (Araneae:Ctenidae) é conhecida popularmente como aranha armadeira, pela posição típica que assume ao atacar e como “banana spider”, já que pode ser encontrada em bananeiras ou cachos de bananas (Fig.1) (CARDOSO et al., 2004).

Esta aranha destaca-se por ser uma das mais peçonhentas dentre os aracnídeos brasileiros até então estudados (CARDOSO et al., 2004). Sua peçonha é composta por várias moléculas e pode causar diversos sintomas, que incluem: edema, eritema na região da picada. Observam-se também alterações sistêmicas como taquicardia, hipertensão arterial, sudorese, espasmos musculares, vômitos, sialorréia, lacrimejamento, priapismo e ejaculação. Os acidentes mais graves podem levar a outras manifestações como diarreia, bradicardia, hipotensão, arritmia cardíaca, edema agudo de pulmão e choque (BRAZIL, VELLARD, 1925, 1926; DINIZ, 1963; REZENDE Jr. et al., 1991; ANTUNES, MÁLAQUE, 2003; BUCARETCHI et al., 2000; 2008, BORGES et al, 2009).

Várias toxinas foram purificadas da peçonha de *P. nigriventer* e tiveram suas atividades bioquímicas e farmacológicas caracterizadas (para revisão ver GOMEZ et al.2002, BORGES et al., 2009). Duas delas, denominadas PnTx2-5 e PnTx2-6, causaram priapismo em camUongos e em ratos e ambas induziram o relaxamento dos músculos lisos do corpo cavernoso destes animais, *in vitro* (YONAMINE, TRONCONE, CAMILLO, 2004, REGO et al., 1996; ANDRADE et al., 2008; NUNES et al., 2008; 2009; 2010).

Estudos utilizando peptídeos provenientes de peçonhas de artrópodes (principalmente aranhas e escorpiões) têm demonstrado eficácia em promover a ereção peniana, sendo promissores como possíveis modelos para o desenho de drogas utilizadas no tratamento da disfunção erétil (DE) (TEIXEIRA et al., 2001 a,b; 2004; NUNES, 2008; NUNES et al., 2008; 2009; 2010a; 2011a; b; ANDRADE et al., 2008, TORRES et al., 2010). Esses peptídeos atuam, primariamente, em canais iônicos, interferindo no processo de liberação de

neurotransmissores e o estudo de seus mecanismos de ação é de grande interesse.

A ereção peniana é um processo fisiológico complexo que envolve interações entre diversos fatores do sistema nervoso, vascular e hormonal, associados a fatores locais, como estímulos táteis, olfatórios e auditivos (ANDERSSON, 2001). O grau de relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso e o estado funcional do pênis são determinados pelo balanço entre os mecanismos pró-eréteis e anti-eréteis, que operam fisiologicamente no pênis (MUSICKI, BURNETT, 2006). Quando há um desequilíbrio em algum desses mecanismos ocorre a Disfunção erétil (DE).

A DE, também conhecida como impotência sexual masculina, é definida como a “inabilidade de alcançar ou manter ereção adequada para a satisfação sexual” (NIH Consensus Conference, 1993). Os principais fatores de risco e etiológicos para o desencadeamento da DE são: idade, diabetes mellitus, doenças cardíacas, hipertensão, dislipidemia, depressão, tabagismo, aterosclerose, hipercolesterolemia e o uso de alguns medicamentos (ANDERSSON, 2001; WESSELLS et al., 2007).

Existem vários procedimentos terapêuticos para o tratamento de DE, os quais incluem intervenções cirúrgicas (como próteses penianas e revascularização do pênis), a injeção intracavernosa e a administração transuretral de drogas vasoativas como alprostadil (prostaglandina E1), e o mais utilizado, a ingestão oral de drogas que inibem a enzima fosfodiesterase tipo 5 – PDE5 (PRIVIERO et al., 2007). Estas últimas atuam no sistema vascular, induzindo relaxamento da musculatura lisa e as três que estão disponíveis comercialmente são o citrato sildenafil (Viagra; Pfizer, New York, EUA), tadalafil (Cialis; Eli Lilly, Basingstoke, Inglaterra) e vardenafil (Levitra; Bayer, Leverkusen, Alemanha).

A neuromodulação farmacológica é o principal evento para a manutenção da ereção peniana (PRIVIERO et al., 2007). Não obstante, as principais drogas usadas para o tratamento da DE atuam nas células endoteliais dos sinusóides penianos. Desta forma, o uso de drogas que exerçam ação no sistema neural (como as neurotoxinas presentes em algumas peçonhas) abriria novas perspectivas terapêuticas baseadas em conceitos de interação molecular e celular no tratamento da DE.

Um empecilho para os estudos e a melhor compreensão da ação farmacológica destas toxinas é a pequena quantidade que estes peptídeos são expressos nas glândulas veneníferas das aranhas e a decorrente dificuldade em purificá-los. A clonagem e expressão destas moléculas, em organismos heterólogos podem possibilitar a obtenção de material em quantidades suficientes para realizar estes estudos.

1.2. As aranhas e a espécie *Phoneutria nigriventer*

Existem 34.000 espécies de aranhas descritas e destas, poucos gêneros são considerados importantes em medicina, pelo número e gravidade dos acidentes que causam. Casos de acidentes letais têm sido relacionados com os gêneros *Trechona*, *Atrax*, *Harpactirella*, *Loxosceles*, *Latrodectus* e *Phoneutria*, e mais raramente, em espécies de *Mastophora*, *Cheracanthium* e *Lithyphantes*.

No Brasil, muitos acidentes relacionados com picada de aranhas são por espécimes do gênero *Phoneutria*, i.e. *Phoneutria nigriventer* (HERZIG; WARD; SANTOS, 2002). Simó & Brescovit (2001) descreveram que no Brasil são encontradas cinco espécies deste gênero: *P. fera*, *P. reidy*, *P. boliviensis*, *P. nigriventer* e *P. bahiensis*. Martins; Bertani (2007) após uma revisão taxonômica do gênero *Phoneutria*, propuseram mais três espécies: *P. pertyi*, *P. keyserlingi* e *P. eickstedtae*.

A picada da aranha *Phoneutria nigriventer* é a segunda causa mais comum de araneísmo no Brasil e pode ser fatal (LUCAS, 1988). Nas regiões sul e sudeste estes acidentes correspondem a 50% do total dos acidentes por aracnídeos (CARDOSO et al., 2004).

A espécie *Phoneutria nigriventer* possui o corpo coberto por pelos curtos, aderentes, marrons acinzentados, com pelos vermelhos no segmento basal das quelíceras (par de apêndices bucal, que compõe o aparelho inoculador da peçonha) (fig. 1). As pernas destes artrópodes apresentam espinhos negros implantados em manchas claras. No dorso do abdômen há pares de manchas claras formando uma faixa longitudinal e desta seguem filas laterais oblíquas de manchas menores. O ventre da fêmea é negro e do macho

alaranjado. O macho apresenta também um colorido geral mais claro, amarelado.

A classificação taxonômica da espécie *Phoneutria nigriventer* é a seguinte:

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfilo	Chelicerata
Classe	Arachnida
Ordem	Araneida
Subordem	Labidognatha
Família	Ctenidae
Subfamília	Phoneutrinae
Gênero	<i>Phoneutria</i> (PERTY, 1833)
Espécie	<i>Phoneutria nigriventer</i> (KEYSERLING, 1891)



Figura 1: Aranha *Phoneutria nigriventer* em posição de ataque ou defensiva. Foto cedida por Nelman Antunes (Aracnidário Científico da FUNED).

1.3. A peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*

A peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* é composta por um coquetel de moléculas biologicamente ativas, incluindo toxinas que se ligam a receptores de membrana, levando, por exemplo, ao bloqueio dos receptores pós-sinápticos de glutamato (PRADO et al., 1996; REIS et al., 1999; 2000) e aquelas que interferem em canais iônicos diversos (Na^+ , Ca^{2+} e K^+) (ARAUJO et al., 1993; GUATIMOSIM et al., 1997; KALAPOTHAKIS et al., 1998;

ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000; Dos SANTOS et al., 2002; RASH, HODGSON, 2002; De LIMA et al., 2002; CORZO; ESCOUBAS, 2003; TRONCONE et al., 2003; CORZO et al., 2005; MARTIN-MOUTOUT et al., 2006; RICHARDSON et al., 2006, CATTERAL et a., 2007; De LIMA et al., 2007; BORGES et al., 2009).

Utilizando-se métodos de cromatografia de gel filtração (Sephadex G 50 e Superose 12 HR) e fase reversa (coluna Pep RPC-FPLC) isolaram-se desta peçonha três frações neurotóxicas (denominadas PhTx1, PhTx2 e PhTx3) e uma fração não tóxica denominada M. Estas frações são formadas por peptídeos com massas moleculares entre 6000-9000 Da e apresentam diferenças em suas propriedades farmacológicas e sequências de aminoácidos. As suas doses letais médias, após injeções intracerebrais, em camUongos foram PhTx1: 47 ± 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; PhTx2: $1,75 \pm 0,7$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e PhTx3: $137 \pm 9,6$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (REZENDE Jr et al., 1991).

Dentre as frações purificadas, desta peçonha, encontra-se a fração PhTx3. Essa é composta por seis peptídeos denominados de PnTx3-1 a PnTx3-6 (CORDEIRO et al., 1993), ela causa paralisia flácida e morte (REZENDE Jr. et al., 1991), além de agir em canais para K^+ e Ca^{2+} (LEÃO et al., 2000; CARNEIRO et al., 2003).

A fração PhTx3 apresentou ainda, atividade inibitória sobre a liberação de acetilcolina em íleo de cobaia e em fatias de córtex cerebral de rato (GOMEZ, ROMANO-SILVA, PRADO, 1995), além de suprimir a liberação de L-glutamato, dependente de cálcio e o aumento de cálcio no citoplasma, em resposta à despolarização da membrana induzida por KCl. Este último efeito também foi desencadeado por uma das toxinas purificadas desta fração, denominada PnTx3-4 (MIRANDA et al., 1998; REIS et al., 1999).

A ação da toxina PnTx3-4 (40 resíduos, 8449,6 Da) na inibição da liberação de L-glutamato parece ser devido a sua ação tanto na liberação de L-glutamato dependente e naquela independente desse íon, de maneira dose e tempo-dependentes (REIS et al., 1999). Estes autores observaram ainda que quando a captação é bloqueada, a liberação de L-glutamato basal continua, esgotando, desta forma, os estoques de L-glutamato no terminal nervoso. Castro Jr. et al. (2008) verificaram que esta toxina bloqueia a exocitose de cálcio induzida por KCl em vesículas sinápticas de sinaptosomas corticias

(IC₅₀= 1,1 nM), sendo a principal população de canais sensíveis a esta toxina são os canais do tipo P/Q.

Outra toxina também presente na fração PhTx3, conhecida como PnTx3-3 (34 resíduos, 6300 Da), foi considerada uma das mais potentes toxinas desta fração, causando desde paralisia flácida até a morte de camUongos em 10-30 min (CORDEIRO et al., 1993). PnTx3-3 (0,1 µg/ml) bloqueia a liberação de acetilcolina induzida por tityustoxina, uma toxina isolada do veneno de escorpião *Tityus serrulatus*, e por potássio (50 nM). Esta toxina reproduz os efeitos da fração PhTx3, agindo como um bloqueador dos canais para cálcio sensíveis a voltagem do sistema nervoso central, em especial os dos tipos P/Q e R (LEÃO et al., 2000). Além disto, ela inibe o influxo de cálcio (MIRANDA et al., 1998) e a liberação de L-glutamato em sinaptosomas corticais de ratos, por um mecanismo de exocitose dependente de cálcio (PRADO et al. 1996; GUATIMOSIM et al., 1997).

Resultados de Dalmolim et al. (2011) mostraram que PnTx 3-3 provoca efeito antinociceptivo em testes de dor de curta duração e um efeito de longa duração em modelos de dor neuropática, sem produzir efeitos colaterais detectáveis. No entanto, os autores não observaram que a PnTx3-3 cause alterações na dor inflamatória, propondo que a inibição da liberação de glutamato, por esta toxina, poderia explicar, pelo menos em parte, este efeito antinociceptivo (espinhal e supra-espinhal).

Foi demonstrado que outra toxina, a PnTx3-2 (34 resíduos, 3549 Da) é capaz de inibir canais para cálcio do tipo L em células GH3 (KALAPOTHAKIS et al., 1998) e que a PnTx3-1 (40 resíduos, 4500 Da) bloqueia especificamente, canais para potássio do tipo A (KUSHIMERICK et al., 1999). Além destas, a neurotoxina PnTx3-6 ou Phα 1β (55 resíduos, 6017,9 Da) apresentou ação bloqueadora reversível, com preferência para canais para cálcio ativados por voltagem, do tipo N (Cav 2.2) (VIEIRA et al., 2005).

PnTx3-6 também possui propriedades analgésicas após injeções intratecais (200 pmol) em camUongos e ratos. Este efeito, em camUongos, foi tão potente quanto aquele produzido por ω-conotoxina MVIIA (10 pmol), um bloqueador de canais para cálcio sensíveis à voltagem, isolada primariamente de *Conus magus*; e quatro vezes maior do que aquele visto com o ziconotide (um derivado sintético da ω-conotoxina) (SOUZA et al., 2008). Acredita-se que

a analgesia decorrente da ação da toxina PnTx3-6 seja consequência de seu efeito bloqueador da liberação de L-glutamato, já que este é um neurotransmissor importante para as vias da dor (MALMBERG; YAKSH, 1995).

Foram descritas também toxinas com ações inseticidas, presentes na fração denominada PhTx4 da peçonha de *P. nigriventer* (FIGUEIREDO et al., 1995, 2001; De LIMA et al., 2002, 2007; BORGES et al., 2009). Dos componentes inicialmente isolados, a toxina PnTx4(6-1), que possui 48 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 5244,6 Da, produziu um efeito neurotóxico inseticida na dose de 0,5 ng/mosca (*Musca domestica*) e foi menos tóxica para baratas (0,5-2,5 mg/Kg), *Lepidoptera* e *Coleóptera* (>50 mg/kg) (FIGUEIREDO et al., 1995). Propôs-se que esses efeitos tóxicos em insetos, como a hipersalivação e paralisia espástica sejam decorrentes da ativação de canais para sódio (FIGUEIREDO et al., 1995; De LIMA et al., 2002).

Outra ação vinculada à toxina PnTx4(6-1) foi o estímulo da liberação de L-glutamato em junções neuromusculares de baratas (*Periplaneta americana*) (FIGUEIREDO et al., 1997) e o atraso na inativação da corrente de Na⁺ de axônio isolado de inseto. Esta toxina, porém, foi inativa em canais para sódio de mamíferos, sugerindo-se, após ensaios de competição com uma toxina do tipo “α-like” do escorpião *Buthus martensii*, que ela atue no sítio 3 de canais para sódio de inseto (De Lima et al., 2002).

Uma toxina também inseticida, encontrada na fração PhTx4, a PnTx 4(5-5), (47 resíduos, incluindo 10 cisteínas, 5175 Da) foi altamente tóxica para moscas (50 ng/g), baratas (250 ng/g) e grilos (150 ng/g). Em contraste, injeções intracerebrais desta toxina (30 µg) em camUongos, não produziram efeitos tóxicos aparentes. Esta toxina (1 µM) inibiu, de forma seletiva e específica, o receptor NMDA em neurônios do hipocampo de rato (FIGUEIREDO et al., 2001). Em contrapartida, outros receptores como os do tipo AMPA, kainato ou gabaérgicos não foram afetados (FIGUEIREDO et al., 1995). A toxina também mostrou forte atividade analgésica, em testes de hiperalgesia, quando administrada, subcutaneamente, na superfície plantar da pata de ratos, após sensibilização com carragenina, prostaglandina E2 ou Glutamato (De OLIVEIRA, 2010).

Dentre estas várias toxinas purificadas da peçonha da aranha armadeira, é interessante ressaltar, ainda, àquela encontrada na fração PhTx1,

denominada de toxina PnTx1. Esta toxina apresentou massa molecular de 8594,6 Da e é composta por 77 resíduos de aminoácidos, sendo 14 cisteínas (DINIZ et al., 1990). A PnTx1 possui DL₅₀ de 0,05 mg/ Kg e quando injetada, intracerebralmente, em camUongos produziu sinais excitatórios como paralisia espástica e morte dos animais. Além disto, a toxina causou modificações nas fibras do músculo esquelético e terminais neurais de preparações de nervo-diafragma de camundongos (MATTIELLO-SVERZUTA et al., 1998). PnTx1 foi capaz de bloquear tanto canais para sódio, como canais para cálcio do tipo L. Entretanto, em células CHO recombinantes, expressando canais para sódio Nav 1.2, ela bloqueou os canais com afinidade bem mais alta do que os canais para cálcio do tipo L, de células GH3. (MARTIN-MOUTOT et al., 2006; SANTOS et al., 2006). Esta toxina teve seu DNA clonado e foi expressa em organismo heterólogo, apresentando, a toxina recombinante, os mesmos sintomas tóxicos da toxina nativa (DINIZ et al., 2006).

1.3.1. A fração PhTx2 e a toxina PnTx2-6

A fração PhTx2 foi isolada da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* pela combinação de cromatografias de gel filtração e de fase reversa (REZENDE Jr. et al., 1991). Alguns estudos demonstraram que esta fração é a responsável pela maioria dos efeitos da peçonha (CORDEIRO et al., 1992; ARAÚJO et al., 1993) induzindo sinais excitatórios como salivação, lacrimejamento, priapismo, convulsões e paralisia espástica das patas em camUongos (CORDEIRO et al., 1992).

Experimentos usando preparações de íleo de cobaia demonstraram que a fração PhTx2 (0,2- 1 µg/ ml) induz uma contração lenta do músculo liso, efeito inibido por atropina (1µg/ ml) e tetrodotoxina (21 µg/ ml), um bloqueador de canais para sódio, e após injeções intracerebrais em camUongo, sua DL₅₀ foi de $1,7 \pm 0,7$ µg/ Kg (REZENDE Jr. et al., 1991, CORDEIRO et al., 1992).

Em estudos de 'patch clamp' mostrou-se, também, que PhTx2 não afeta as correntes para potássio, mas inibe a inativação dos canais para sódio, em membranas de células musculares e nervos (ARAÚJO et al., 1993). Este efeito sobre os canais altera a dependência da voltagem para potenciais hiperpolarizantes, resultando em maior permanência dos canais no estado aberto. O consequente aumento na condutância do sódio provoca

despolarização e aumento da excitabilidade da membrana (ARAÚJO et al., 1993; MATAVEL et al., 2002), e resulta na liberação de neurotransmissores, como observado para a acetilcolina (MOURA et al., 1998).

A PhTx2 também induz rápido aumento na concentração de cálcio intracelular, estimulando tanto a liberação de L-glutamato quanto de acetilcolina, em sinaptosomas de córtex cerebral de rato (CORDEIRO et al., 1992; ROMANO-SILVA et al., 1993). Foi demonstrado que esta fração causa destruição e mionecrose do músculo esquelético e também produz alterações em axônios mielinizados (MATTIELLO-SVERSUTA; CRUZ-HOFLING, 2000). Todas estas alterações podem ser relatadas como consequência de um desbalanço osmótico, resultado da abertura dos canais para cálcio.

Esta fração é uma mistura de 9 polipeptídeos que foram purificados por uma combinação de cromatografias de filtração e fase reversa (CORDEIRO et al., 1992). Cinco destes polipeptídeos foram sequenciados e denominados PnTx2-1 (53 resíduos de aminoácidos, 5838,8 Da), PnTx2-3 (40 resíduos, 6015,0), PnTx2-5 (49 resíduos, 5116,6 Da), PnTx2-6 (48 resíduos, 5.291,3 Da) e PnTx2-9 (32 resíduos, 3.742,1 Da) (CORDEIRO et al., 1992; BORGES et al., 2009)- figura 2.

PnTx2-1	ATCAGQDKPCKETC DCCGERGECV CALSYEGKYRCICRQGNFLIAWHK LASCCK	54
PnTx2-3	GTCAGQDKPCKETC DCCGERGECV CALSYYGKYRCICRQG-----	40
PnTx2-5A	ATCAGQDQPKETC DCCGERGECVCG----G--PCICRQGNFLIAWYK LASCCK	48
PnTx2-6	ATCAGQDQTCKVTC DCCGERGECVCG----G--PCICRQGYFWIAWYK LANCKK	48
PnTx2-9	SFCIPF-KPCKSDENCC-KKFCKTT----G-IVKLCR-----W-----	32
	. * :. ** : ** :: :* * : **	

Figura 2: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das toxinas isoladas da fração PhTx2 da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*. Alinhamento feito pelo programa ClustalW a partir das seqüência primárias disponíveis em Cordeiro et al. (1992) e Borges et al. (2009).

Comparando-se estas toxinas da fração PhTx2, a seqüência de aminoácidos da PnTx2-9 é a que apresenta o menor grau de identidade e similaridade com as demais e é também a menos tóxica. Quando testada em camundongos (via intracerebral – dose 1,40 µg), observou-se somente ereção da cauda e redução de mobilidade, após 30 min. da injeção, sintomas considerado poucos tóxicos (CORDEIRO et al., 1992).

As toxinas - PnTx2-1, PnTx2-5 e PnTx2-6 mostram alto conteúdo de cisteínas, e foram tóxicas quando injetadas em camundongos, com DL₅₀,

calculadas após injeção intracerebral de: 1,62 µg/ camUongo (PnTx2-1), 0,24 µg/ camUongo (PnTx2-5) e 0,79 µg/ camUongo (PnTx2-6). Os sintomas tóxicos observados foram: lacrimejamento, salivação, sudorese, agitação, paralisia espástica seguida de morte.

Comparando-se as toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6, esta última apresenta seis vezes mais afinidade aos canais para sódio neuronais quando comparada com a PnTx2-5 (MATAVEL et al., 2009). Estas duas toxinas diferenciam-se em apenas 5 resíduos de aminoácidos que estão nas posições 9, 12, 35, 37 e 45, sendo Tyr e Pro, Val e Glu, Asn e Tyr, Leu e Trp, Ser e Asn, respectivamente para PnTx2-5 e PnTx2-6 (CORDEIRO et al., 1992; MATAVEL et al., 2009; BORGES et al., 2009).

As diferenças nas sequências primárias apresentadas entre estas duas toxinas (mostradas na Fig. 2) são apontadas como responsáveis pelas diferenças em suas atividades, por exemplo, nos resultados obtidos em ensaios com células GH3 expressando os subtipos 1.1, 1.2, 1.3 e 1.6 de canais para sódio sensíveis à voltagem. Nestes experimentos, a modificação causada pela PnTx2-6 na corrente de sódio não foi revertida após lavar-se a preparação, o que não aconteceu com a PnTx2-5 (MATAVEL et al, 2009).

Os efeitos sintomáticos após a injeção intracerebral da toxina PnTx2-6 em camundongos são os mesmos observados após a injeção da fração PhTx2 (LE SUEUR et al, 2003). Por reproduzir o efeito da fração PhTx2, esta é considerada como uma toxina representativa, presente na peçonha da *Phoneutria nigriventer* e a sua ação pode ser atribuída ao atraso da ativação dos canais para sódio (ARAÚJO et al, 1993; MATTIELLO-SVERSUTA; CRUZ-HOFLING, 2000; MATAVEL et al., 2009).

A toxina PnTx2-6 altera a cinética de inativação da corrente para sódio em músculo esquelético de rã, deixando-a mais lenta, um efeito típico de toxinas tipo alfa. Porém, ela também desloca para valores hiperpolarizantes, a dependência de voltagem da ativação do estado-estacionário da inativação, efeito mais comumente encontrado em toxinas do tipo beta, mas que pode ser encontrada também em toxinas do tipo alfa (GORDON; GUREVITZ, 2003, MATAVEL et al., 2002; 2004; 2009). A coexistência de efeitos típicos de toxinas do tipo alfa e beta sugere que a interação da PnTx2-6 com o canal para sódio ocorre de maneira distinta desses tipos de toxinas, podendo envolver

macrosítios, especialmente do sítio 3 ou ocorrer em um sítio receptor ainda não identificado na superfície do canal (MATAVEL et al, 2002; 2004; 2009).

Em 2004, Yonamine Troncone, Camillo mostraram que a toxina PnTx2-5 produz relaxamento dos músculos lisos do corpo cavernoso e ereção peniana, efeito que também foi posteriormente demonstrado para a PnTx2-6 (REGO et al., 1996; ANDRADE et al., 2008; NUNES et al., 2008). Uma característica comum entre essas duas toxinas é a ativação dos canais para sódio. Acredita-se que esse efeito leve à ativação de óxido nítrico sintases (NOS) e à liberação de óxido nítrico (NO) (YONAMINE, TRONCONE, CAMILLO, 2004; NUNES et al., 2008).

O óxido nítrico liberado pode então agir em músculos esqueléticos, de forma a aumentar o relaxamento, e culminar com a ereção. Além disso, em trabalho publicado por Villanova et al. (2009) sugere-se que alguns genes envolvidos na via do óxido nítrico têm sua expressão aumentada no tecido erétil de camundongos, após tratamento com a toxina PnTx2-6.

Nunes et al (2008) verificaram que a toxina PnTx2-6 potencia a ereção em ratos anestesiados, por meio da liberação de óxido nítrico, o qual é aumentado nas células do corpo cavernoso. Esta atividade foi inibida após pré-tratamento com L-NAME (N (G)-nitro-L- arginina metil éster, um inibidor não seletivo de óxido nítrico sintase). Esses autores também verificaram que a PnTx2-6 foi capaz de reverter a disfunção erétil em ratos DOCA-sal.

Estudos posteriores com PnTx2-6 em tiras de corpo cavernoso isoladas de ratos normais, pré-contraídas com fenilefrina, demonstraram que as tiras apresentaram um relaxamento maior na presença da toxina, sob estímulo elétrico, quando comparado ao relaxamento produzido somente pelo estímulo elétrico (NUNES et al., 2010a). Estes autores sugeriram que esta toxina atuaria retardando a inativação dos canais para sódio também dos nervos nitrérgicos, com consequente despolarização das células e abertura de canais para cálcio do tipo N. O cálcio teria o seu influxo aumentado, facilitando, desta forma, a sinalização na via NO/cGMP causando um aumento na produção de óxido nítrico.

Paralelamente, mostrou-se que o efeito de relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso é independente da inibição da enzima fosfodiesterase tipo 5, efeito comumente apresentado pelos medicamentos mais usados no

tratamento de disfunção erétil. Além disto, em experimentos de biodistribuição da toxina marcada radioativamente com tecnécio, houve um acúmulo de radioatividade no pênis, o que provavelmente indica que existem receptores para a PnTx2-6 neste órgão, sendo os alvos desencadeadores do seu efeito (NUNES et al., 2010a).

Nunes et al (2010) demonstraram ainda que a toxina facilita a transmissão neural não colinérgica-não adrenérgica no corpo cavernoso e que a ereção induzida por esta molécula tem pouco ou nenhum envolvimento da acetilcolina, já que não observaram inibição de seu efeito por atropina (bloqueador de receptores muscarínicos).

Recentemente, Nunes et al (2011b-artigo submetido), verificaram que a toxina PnTx2-6 melhora a função erétil de ratos idosos (60-61 semanas), com aumento do relaxamento cavernosal via sinalização NO/cGMP. Além disto, a toxina não foi capaz de modificar a expressão da enzima NOS, mas parece aumentar a atividade desta enzima tanto em ratos normais, quanto em ratos idosos. Em outro trabalho recente (2011a-artigo submetido) os mesmos autores mostraram que esta toxina foi capaz de aumentar parcialmente (65%) o relaxamento de tiras de corpo cavernoso isolado em camundongos diabéticos e em camundongos *knockout* para NOS endotelial, mas não em *knockout* de NOS neuronal.

Todos estes dados colocam a toxina PnTx2-6 como uma molécula interessante para uma possível ferramenta farmacológica nova para estudar tratamentos alternativos para a disfunção erétil.

1.4. Outras toxinas animais que causam priapismo.

Uma das manifestações clínicas após acidentes com algumas espécies de aracnídeos é o priapismo. Isto tem sido relatado, por exemplo, em acidentes com escorpiões cuja espécie pertence à família Buthidae (MAHADEVAN, 2000). O priapismo caracteriza-se por uma ereção prolongada involuntária (superior a seis horas), não relacionada com estímulo ou desejo sexual e não aliviada pela ejaculação (GOMES; VENDEIRA; REIS, 2003).

Sabe-se que a peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* evoca o relaxamento neurogênico mediado por NO dos terminais dos nervos NANC

isolados de corpos cavernosos de cães e coelhos (TEIXEIRA et al., 1998). A peçonha dos escorpiões *Androctonus australis* e *Buthotus judaicus* também relaxam tiras de tecido cavernosal de coelhos, por agir nas fibras neurais NANC através da ativação da guanilato ciclase e formação de GMPc com consequente aumento de NO. Esse efeito de aumento do NO foi inibido por L-NAME e por 7-NI (7- nitroindazol), um inibidor de óxido nítrico sintase neuronal (TEIXEIRA et al., 2001a).

Em outros estudos, realizados com a peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* em corpos cavernosos de coelhos (TEIXEIRA et al., 1998) e humanos (TEIXEIRA et al., 2001b), essa peçonha promoveu o relaxamento destas preparações através da liberação de NO de nervos NANC. Este efeito foi abolido por administração de um inibidor da enzima guanilato ciclase (30 µM ODQ - 1H-[1,2,4] oxidazolo [4,3,-alquinoxalin-1-one]).

Duas toxinas isoladas da peçonha de *Tityus serrulatus* denominadas Ts3 e Ts1 foram também testadas. A primeira causa o relaxamento do corpo cavernoso peniano de humanos e coelhos pelo aumento da liberação de NO, e esta ação foi bloqueada por L-NAME e tetrodotoxina (TEIXEIRA et al., 2004). A toxina Ts1 (*Tityus* gama toxina ou TsVII) induziu o relaxamento do corpo cavernoso de coelhos, ação que foi atribuída à sua ligação seletiva a canais para sódio dependentes de voltagem presentes nos terminais neurais do pênis, causando aumento também, da liberação de NO (De OLIVEIRA et al., 2003).

Várias toxinas isoladas de diferentes peçonhas de artrópodes podem desencadear ereção peniana, cujas vias parecem ter pontos em comum, mas que não estão ainda bem estabelecidas. Faz-se necessário, desta forma, o entendimento dos mecanismos moleculares da contração e relaxamento do músculo liso do pênis sob a ação destas moléculas.

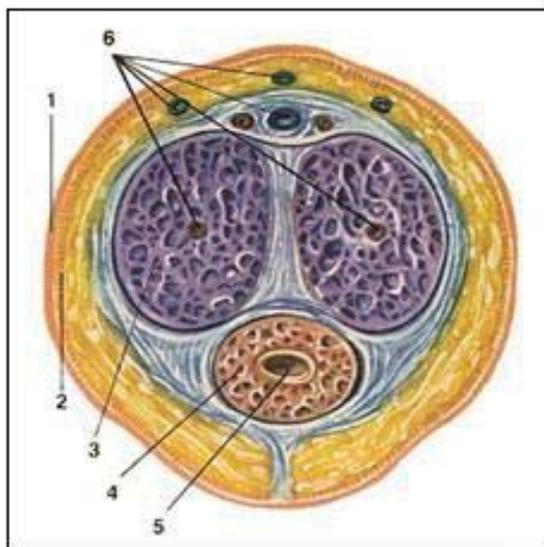
1.5. Os mecanismos de detumescência e da ereção peniana

1.5.1. O pênis

O pênis é composto de três tecidos separados por um septo de tecido conectivo. O corpo esponjoso dá suporte e protege a uretra ao longo da superfície ventral do pênis. O par de corpos cavernosos que se encontram

dorsal e ventralmente funcionam como reservatório de sangue e provê estrutura para o pênis no estado ereto. Os corpos cavernosos compreendem uma rede de sinusóides vasculares supridos pelas artérias helicinas (ramos terminais das artérias cavernosas) (Fig.3).

O pênis é innervado por fibras neurais autonômicas e somáticas (ANDERSSON, WAGNER, 1995). Nervos simpáticos e parassimpáticos da pelve emergem para formar os nervos cavernosais, que entram nos corpos cavernosos e regulam o fluxo sanguíneo durante a ereção (LUE, 2000). Os nervos somáticos dão as sensações físicas ao pênis. No estado flácido, a trabécula do músculo liso, que dá suporte aos sinusóides vasculares está tonicamente contraída e permite somente um pequeno influxo de sangue arterial (ABOSEIF, TANAGHO, 1999). Após ocorrer o relaxamento dos vasos sanguíneos penianos e a entrada de sangue, acontece a ereção.



- 1) Pele
- 2) Darto peniano
- 3) Corpos cavernosos
- 4) Corpo esponjoso
- 5) Uretra
- 6) Vasos sanguíneos

Figura 3: *Seção transversal do pênis.* O pênis estruturalmente compõe-se de três diferentes tecidos delimitados por uma membrana de tecido conectivo. O corpo esponjoso na superfície ventral sustenta e protege o pênis. Os corpos cavernosos disponibilizam o sangue e estrutura para o pênis ereto. Fonte: NETTER, 2000. Atlas de anatomia humana. 2Ed. Artmed, 2000.

1.5.2. As vias de sensibilização ao cálcio e os mecanismos de contração do músculo liso

A contração do músculo liso está envolvida na detumescência peniana e é regulada por mecanismos dependentes e de sensibilização ao cálcio (SOMLYO, SOMLYO, 1994). Esses mecanismos são iniciados por ativação de

receptores ou pela despolarização da membrana plasmática do músculo liso (KARAKI et al., 1997; WEBB, 2003).

A noradrenalina, dos terminais neurais adrenérgicos, endotelinas e prostaglandina F_{2α}, das células endoteliais, ativam receptores acoplados à proteína G (GPCR) nas células do músculo liso. Isso acarreta aumento da atividade da fosfolipase C (PLC) e de formação de fosfatidil inositol bisfosfato (PIP₂), resultando em maior formação de trifosfato de inositol (IP₃) e de diacilglicerol (DAG) (DEAN, LUE, 2005) (Figs 4 e 5).

O IP₃ induz a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e o influxo de cálcio através dos canais dependentes de voltagem e aqueles operados por receptores, levando a um aumento nos níveis de cálcio intracelular (SOMLYO, SOMLYO, 2002; DEAN, LUE, 2005). Em níveis elevados, o cálcio liga-se a calmodulina causando nela uma mudança conformacional, o que expõe sítios para a interação com a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) (Fig. 4 e 5). Esta cinase ativada catalisa a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC). A fosforilação ativa a ATPase da miosina, que hidrolisa o trifosfato de adenosina (ATP), disponibilizando energia para a contração muscular (DEAN, LUE, 2005; MIZUNO et al., 2008).

De forma complementar o DAG e a proteína cinase C (PKC) ativada por cálcio, colaboram com a contração muscular, por fosforilação dos canais para cálcio do tipo L, presentes na membrana das células endoteliais do músculo liso, e fosforilação da proteína citoplasmática CPI-17 (ETO et al., 1995; KOYAMA et al., 2000), que em conjunto causam a inativação por fosforilação, da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (SOMLYO, SOMLYO, 1994; JIN, BURNETT, 2006) (Fig. 5).

Após o cálcio retornar aos níveis basais, as vias de sensibilização são ativadas. Um dos mecanismos é por ativação de receptores acoplados à proteína G, que podem causar contração a partir do aumento da sensibilização ao cálcio, sem nenhuma mudança no cálcio citosólico. Essa via envolve a RhoA (família do gene homólogo RAS, membro A), uma pequena proteína G monomérica, ligada a guanosina trifosfato (GTP) (HIRATA et al., 1992) (Fig. 4 e 5).

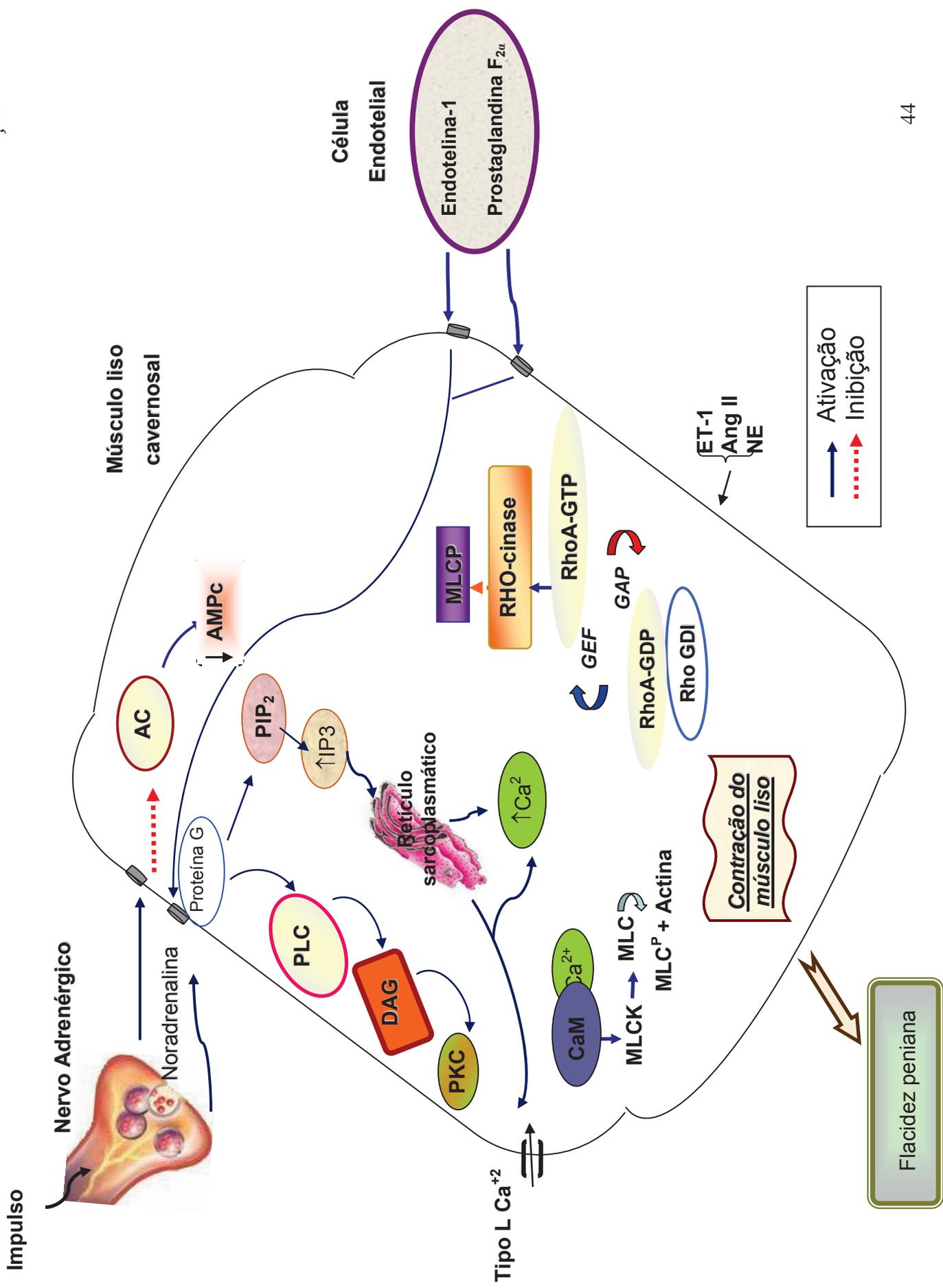
A proteína RhoA tem como efetor a Rho cinase, que está diretamente envolvida na contração muscular. Essa proteína A ocorre em dois estados: o

inativo, ligado à guanosina bisfosfato (GDP) e o ativo, ligado ao GTP. A sua atividade é regulada por três diferentes proteínas: fator de troca de nucleotídeo guanina (Rho GEF), proteína ativadora de GTPase da Rho (Rho GAP) e inibidor de dissociação de GDP (Rho GDI) (SOMLYO, SOMLYO, 2003, 2004; DEAN, LUE, 2005; NUNES, RIGSBY, WEBB, 2010b).

No estado inativo, Rho GDI liga-se a RhoA GDP, formando um complexo estável, que permanece no citoplasma. A ativação por Rho GEF facilita a troca de GDP para GTP na Rho A e a dissociação de Rho GDI. A Rho GTP ativa migra do citoplasma e liga-se à membrana plasmática, iniciando a transdução de sinal. A proteína Rho GAP acelera a atividade GTPase intrínseca da RhoA e promove a hidrólise do GTP em RhoA GDP, inativando a RhoA (FUKATA, AMANO, KAIBUCHI, 2001; SOROKINA, CHERNOFF, 2005; JAFFE, HALL, 2005; DEAN, LUE, 2005; NUNES, RIGSBY, WEBB, 2010b) (Figs. 4 e 5).

A proteína RhoA ativa participa na regulação da via contrátil do músculo liso ao se ligar à proteína Rho cinase, ativando-a. Uma vez ativada, a Rho cinase fosforila e inibe a subunidade regulatória da MLCP e previne a desfosforilação dos miofilamentos da MLC, promovendo a ligação da actina à miosina e a manutenção do tônus contrátil (SOMLYO, SOMLYO, 2000; 2003). Alguns agonistas, como noradrenalina, angiotensina II e endotelina 1 agem na ativação da via da Rho cinase e contração do músculo liso (Fig. 5).

Figura 4: *Mecanismos moleculares da contração do músculo liso e flacidez peniana.* A noradrenalina (NE), endotelinas (ET) e prostaglandinas (PGF_{2α}) ativam receptores acoplados à proteína G nas células do músculo liso cavernosal. Após a ativação, uma cascata de reações intracelulares é iniciada com consequente ativação da fosfolipase C (PLC), liberação de diacilglicerol (DAG) e ativação da proteína cinase C (PKC). Em outra via ocorre a liberação de fosfatidil inositol bisfosfato (PIP₂) e aumento da concentração de trifosfato de inositol (IP₃). Este age nas células do retículo sarcoplasmático e abre canais para cálcio do tipo L, causando a liberação do cálcio para o meio intracelular. Com a concentração aumentada, o cálcio pode se complexar com a calmodulina e ativar a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que irá fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC^F), esta em conjunto com a actina muscular causa a contração do músculo liso e consequente flacidez peniana. Outra via relacionada com o mecanismo de contração da musculatura lisa é a da RhoA/ Rho cinase . A Rho GDI liga-se a RhoA GDP, formando um complexo estável, que permanece no citoplasma. A ativação por Rho GEF facilita a troca de GDP para GTP na Rho A e a dissociação de RhoA GDI. A RhoA GTP (ativa) migra do citoplasma para a membrana plasmática da células do músculo liso, ativando a Rho cinase que inibe a subunidade regulatória da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP). A proteína Rho-GAP acelera a atividade ATPase intrínseca da RhoA e promove a hidrólise do GTP em RhoA-GDP, inativando a RhoA. (Adaptado de Lue, 2000, Lue et al., 2005, Nunes, 2008). Abreviações: AC - adenilato ciclase, AMPc - adenosina monofosfato cíclico, CaM - calmodulina, GTP - guanosina trifosfato, GEF - fator de troca de guanina nucleotídeo, GAP - proteína ativada por GTPase, GDI - inibidor de dissociação GDP e Ang - angiotensina



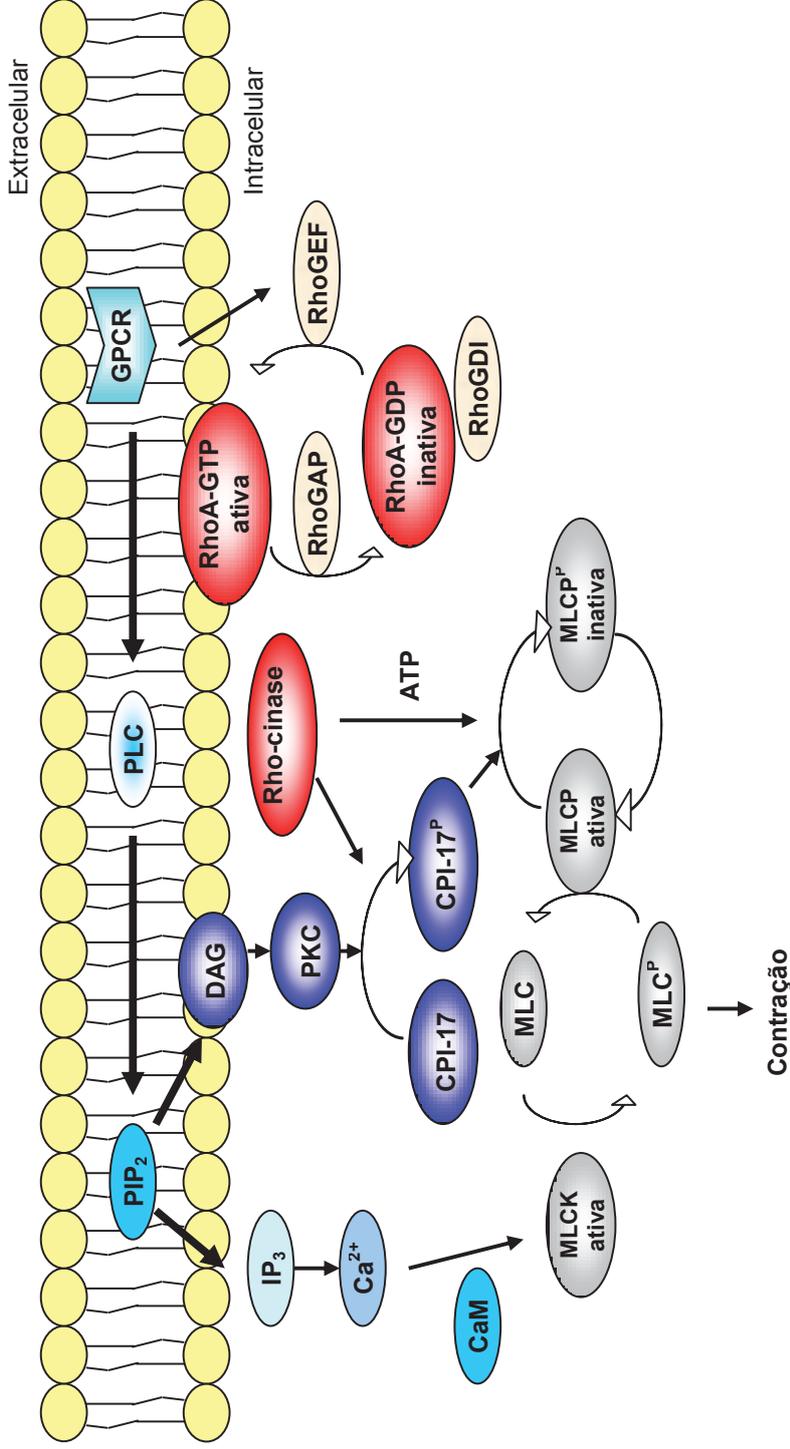


Figura 5: Vias dependentes e de sensibilização ao cálcio no músculo liso do pênis. O estímulo de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) leva a uma ativação de cascatas de vias dependentes e de sensibilização ao cálcio, que resultam na contração muscular. Uma dessas vias, após a ativação por DAG, a proteína quinase C (PKC) fosforila a proteína citoplasmática CPI-17. A CPI-17^p tem afinidade para a subunidade catalítica da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), inativando-a. A ativação de GPCRs também estimula a troca de GDP por GTP na RhoA, dissociando a do Rho GDI. A RhoA GTP desloca-se para a membrana plasmática e ativa a Rho cinase, esta ativa a fosforilação de CPI-17 e MLCP, inativando-a. De uma forma cíclica, os fatores se restauram e podem ser utilizados novamente (Adaptado de Jin, Burnett, 2006).

1.5.3. A fisiologia da ereção

O complexo mecanismo neurovascular da ereção peniana é iniciado por estímulos dos nervos centrais e periféricos (BURNETT, 2003; ANDERSSON, WAGNER, 1995). Ele envolve o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso, com o aumento do influxo de sangue arterial no pênis e efluxo venoso restrito (MUSICKI, BURNETT, 2006).

Os nervos, o endotélio dos sinusóides penianos, os vasos sanguíneos e as células do músculo liso produzem transmissores e moduladores que controlam os estados flácidos e eréteis do pênis (MUSICKI, BURNETT, 2006). Os nervos colinérgicos, os mediadores não adrenérgicos e não colinérgicos (NANC), o óxido nítrico e outros fatores; como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), prostaglandina E (PGE), substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC); modulam o relaxamento do corpo cavernoso e a ereção (ANDERSSON, WAGNER, 1995).

No estado flácido, a via neural simpática é dominante, após o estímulo sexual, a atividade parassimpática aumenta nos nervos nitrérgicos do pênis, ocorre abertura de canais para cálcio do tipo N, permitindo o influxo de cálcio e o consequente aumento de sua concentração. O cálcio liga-se à calmodulina que ativa a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), elevando a produção de NO (JIN, BURNETT, 2006) (Fig. 6).

O óxido nítrico, uma vez liberado, difunde-se pelas células do músculo liso dos corpos cavernosos e ativa a cascata de sinalização cGMP/PKG (guanosina monofosfato cíclico/ proteína cinase G). Nessa cascata, o NO interage com a forma solúvel da enzima guanilato ciclase (sGC), enzima responsável pela formação de cGMP a partir de GTP. Isso aumenta a concentração intracelular do cGMP (BURNETT et al., 1992; RAJFER et al., 1992) e influencia em diversos processos que culminam com o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso. O cGMP pode ser clivado a 5'GMP pela enzima fosfodiesterase tipo 5. Essa enzima é inibida por substâncias como o citrato de sildenafil (Viagra),

disponibilizando por mais tempo o cGMP para as células do músculo liso cavernosal e que o mantém relaxado.

Os processos fisiológicos que causam o relaxamento do músculo liso são: 1) ativação da proteína cinase G dependente de cGMP (PKG); 2) ativação de canais iônicos dependentes de cGMP que reduzem o cálcio intracelular por sequestro (para o retículo sarcoplasmático) ou extrusão (por inibição dos canais para cálcio da membrana); 3) abertura de canais para potássio, causando hiperpolarização das células do músculo liso do corpo cavernoso; e 4) ativação de fosfatases da cadeia leve da miosina (LEE et al., 1997, STIEF, NOACK, ANDERSSON, 1997, MORELAND et al., 1999, MILLS CHITALEY, LEWIS, 2001) (Fig. 6).

O balanço de todos esses processos de ativação de cinases, ativação e abertura de canais e a consequente diminuição da resistência periférica das arteríolas cavernosais, possibilita um aumento do fluxo sanguíneo no pênis, culminando com estresse de cisalhamento nas células endoteliais do músculo liso. Isso, em conjunto com a ligação da acetilcolina a receptores muscarínicos dependentes de cálcio no endotélio trabecular, ativa a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) produzindo mais NO a partir da L-arginina na presença de O₂ (BURNETT, 1995; 2004) (Fig. 6).

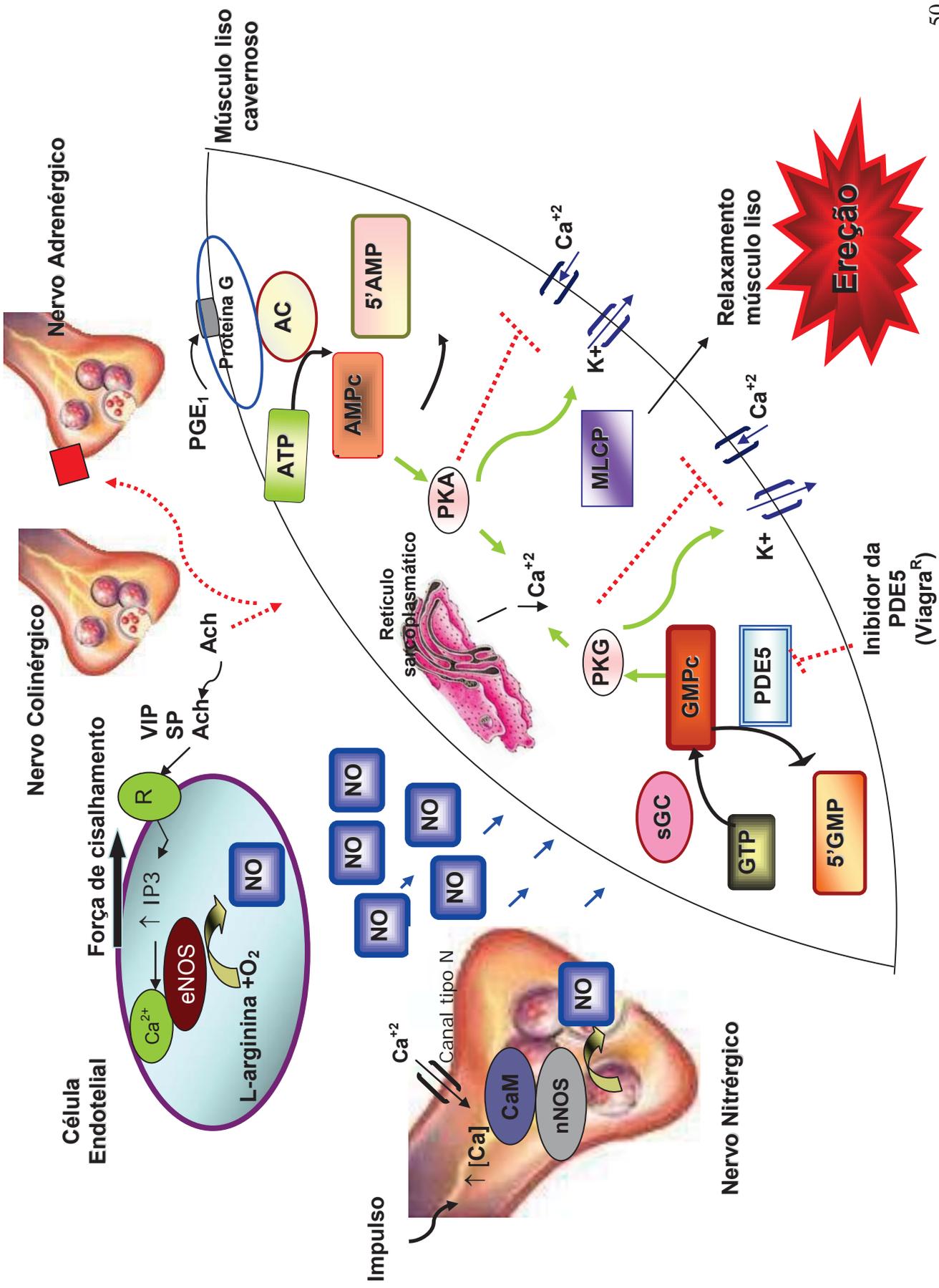
Mills, Chitaley, Lewis (2001) sugeriram que o NO exerce duas ações distintas, agindo como um neurotransmissor nos nervos não adrenérgicos e não colinérgicos e como um modulador da ativação da sGC, estas ações são específicas e mediadas por PKG. Ammendola et al. (2001) mostraram que uma proteína regulatória, cinase dependente de cGMP, associada ao receptor para IP₃ (IRAG) é fosforilada por PKG. Isso leva a uma diminuição do IP₃ nas células do músculo liso, induzindo a liberação de cálcio para o espaço extracelular. Se isso ocorre no corpo cavernoso, a consequente diminuição na concentração do cálcio intracelular e a redução da atividade da MLCK diminuem os níveis de fosforilação da cadeia leve da miosina e favorecem o relaxamento do músculo liso cavernosal.

Os agentes que também participam na fisiologia da ereção são aqueles que aumentam os níveis intracelulares de cAMP, ao se ligarem a receptores acoplados à proteína G, por ativação da enzima adenilato ciclase (AC). Como exemplo de agente que indiretamente ativam a AC tem-se a PGE1, o VIP e o PRGC (ANDERSSON, WAGNER, 1995; ANDERSSON, STIEF, 1997; TRAISH et al., 1997; MONTORSI et al., 1995). Os aumentos no cAMP também ativam a cascata de fosforilação e desfosforilação da actina-miosina do músculo liso, que causa o seu relaxamento (ANDERSSON, STIEF, 1997, TRAISH et al., 1997, NEHRA, BARRET, MORELAND, 1999) (Fig. 6).

Outro fator a ser considerado no processo erétil e que contribui para o tônus vascular do pênis é a presença de canais intercelulares, conhecidos como junções (gap), na membrana das células do músculo liso cavernosal. A comunicação entre as células do músculo liso, através destas junções, permite a passagem e o movimento de íons (K^+ , Ca^{2+}) e segundo mensageiros (cGMP, cAMP), que controlam o relaxamento e a contração da musculatura lisa do corpo cavernoso, necessária para unificar a ereção com a detumescência (CHRIST et al., 1999).

Como consequência de todos esses mecanismos, os espaços dos sinusóides cavernosos são preenchidos com sangue, criando uma pressão que comprime as vênulas contra a túnica albugínea e limita o fluxo venoso. Esse mecanismo de veno-oclusão aumenta a pressão intracavernosa, resultando na ereção peniana.

Figura 6: *Mecanismos moleculares do relaxamento do músculo liso e ereção peniana.* A chegada do impulso ao nervo não adrenérgico-não colinérgico (nitérgico) abre canais para cálcio do tipo N, aumentando a concentração de cálcio intracelular. O cálcio liga-se a calmodulina e essa ativa a enzima óxido nítrico sintase neuronal a produzir o NO. Este se difunde para a musculatura lisa do corpo cavernoso e inicia o processo erétil, causando aumento da força de cisalhamento nas células endoteliais das paredes dos vasos sanguíneos que irrigam o pênis. Nessas células ocorre, por sua vez, a abertura de canais para cálcio com consequente ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial e liberação de mais óxido nítrico. O NO liberado pelas duas vias difunde-se para as células do músculo liso cavernoso, ativando a guanilato ciclase solúvel (sGC), aumentando a síntese intracelular de GMPc, resultando no relaxamento do músculo liso. Outras substâncias como a acetilcolina (ACh), substância P (SP) e o peptídeo vasointestinal (VIP) podem ligar-se aos receptores na membrana das células endoteliais e ativar a cascata do NO. A acetilcolina age ainda inibindo a liberação de agentes vasoconstritores dos nervos adrenérgicos. As células do músculo liso cavernoso possuem ainda receptores para prostaglandina E₁ (PGE₁) acoplados a proteína G que ao serem ocupados pela PGE₁ ativam a enzima adenilato ciclase (AC) que forma AMPc a partir de ATP. O cAMP e cGMP, segundo mensageiros intracelulares, mediam o relaxamento do músculo liso ao ativar as suas cinases específicas, que fosforilam proteínas e causam a abertura de canais para potássio, fechamento de canais para cálcio e sequestro de cálcio intracelular pelo retículo sarcoplasmático. Inibidores de fosfodiesterase tipo 5, como o Viagra (citrato de sildenafil), inibem a quebra do cGMP em 5'GMP permitindo uma maior permanência do GMPc intracelular. AMPc: adenosina monofosfato cíclico (Adaptado de Lue, 2000, Lue et al., 2005, Nunes, 2008, Nunes et al., 2009). Abreviações: PKC - proteína cinase C, PKA - proteína cinase A, CaM - calmodulina, MLCP - fosfatase da cadeia leve da miosina, GTP - guanosina trifosfato, nNOS - óxido nítrico sintase neuronal, eNOS - óxido nítrico sintase endotelial, IP₃ - inositol trifosfato e ATP - trifosfato de adenosina.



1.6. A disfunção erétil e seus tratamentos

A disfunção erétil (DE) masculina ocorre entre 19-64% dos homens em idade de 40 a 80 anos em todo o mundo (JONLER et al., 1995 citado por PRIVIERO et al., 2007). Fatores emocionais, físicos e farmacológicos contribuem para a DE. Trauma e cirurgias pélvicas, que resultam em prejuízos neurais ou vasculares podem também serem causas de DE.

Além destes fatores, medicamentos, como antihipertensivos (β -bloqueadores), diuréticos, hormônios e antidepressantes também contribuem para este problema (BIVALACQUA et al., 2000). Em geral, os fatores orgânicos e psicogênicos que causam alterações na via do NO/cGMP, com prejuízo ao relaxamento do músculo liso cavernosal ou aumento da sua contração, são considerados os mais importantes no desencadeamento da DE.

Diferentes classificações são propostas para a disfunção erétil. Algumas dessas baseiam-se nas causas (diabética, iatrogênica e/ou traumática); outras nos mecanismos vasculares do processo erétil (neurogênica, arterial e/ou venosa). A classificação recomendada pela Sociedade Internacional de Investigação de Impotência divide a DE em dois grupos principais: DE psicogênica e DE orgânica (LIZZA, ROSEN, 1999).

A disfunção erétil psicogênica é considerada o tipo mais comum. Dois possíveis mecanismos são propostos para explicar a inibição da ereção nesse grupo: a) inibição direta do centro erétil no cérebro, assim como inibição supra-sacral normal e uma liberação simpática excessiva; (b) níveis elevados de catecolaminas que podem, algumas vezes, aumentar o tônus do músculo liso, prevenindo o relaxamento necessário para a ereção (STEERS, 1990 citado em DEAN, LUE, 2005).

Em relação à DE orgânica, esta se caracteriza por algum tipo de disfunção fisiológica que pode ser vasculogênica, cavernosal, mista, neurogênica, anatômica e endocrinológica (STEERS, 1990 citado em DEAN, LUE, 2005). Dentre estes tipos, a mais relatada é a vasculogênica. Acredita-se que esta afete cerca de 70% dos pacientes, sendo evocada por um prejuízo entre os agentes relaxantes (por exemplo, NO, acetilcolina e prostaglandina F) e os de contração no pênis (como, noradrenalina, endotelina e prostaglandina G) (ANDERSSON, WAGNER, 1995).

Os tratamentos para DE usados atualmente, têm sido substituídos, em relação às antigas intervenções cirúrgicas (como prótese peniana e revascularização), por agentes administrados intracavernosa e intrauretralmente (prostaglandinas, papaverina, fentolamina), tendendo a uma efetiva terapia oral com inibidores de fosfodiesterase 5, como citrato de sildenafil, tadalafil e vardenafil (PRIVIERO et al., 2007). Estas drogas têm ação em componentes da via do NO/cGMP, responsável pelo relaxamento do músculos liso do corpo cavernoso e atuam em sua maioria através do sistema vascular.

Na busca por tratamentos alternativos para a disfunção erétil, encontram-se as várias pesquisas com toxinas animais que causam relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso e ereção peniana. Entretanto, os estudos para o melhor entendimento da ação destas toxinas têm como limitação a quantidade dos peptídeos nativos produzidos nas glândulas das aranhas. A disponibilização de quantidades maiores dessas moléculas pode viabilizar a realização de estudos da estrutura tridimensional, bem como complementar os seus estudos farmacológicos. Essas duas abordagens são essenciais para o perfeito entendimento das relações estrutura-função.

Por isso, este trabalho teve como foco, a obtenção da toxina PnTx2-6, expressa em organismo heterólogo. A clonagem e expressão dessa molécula e de alguns mutantes derivados visam prover o mais material para esses estudos. O entendimento do mecanismo de ação desta toxina, bem como de sua interação com o sistema nervoso, poderão indicar possíveis modelos alternativos para o desenvolvimento de medicamentos utilizados no restabelecimento da ereção peniana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Material Biológico

4.1.1.1. Aranhas

As aranhas da espécie *Phoneutria nigriventer* utilizadas neste trabalho foram capturadas na região Santa Bárbara- Minas Gerais e mantidas no aracnidário da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte.

4.1.1.2. Linhagens de *E. coli*

- **Linhagem NM522:** *supE, thi, Δ(lac-proAB), hsd5 (r⁻, m⁻), [F', proAB, lacI^qZΔM15]* (GOUGH, MURRAY, 1983)
- **Linhagem BL21(DE3)pLysS:** *F⁻ dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3) [pLysS Cam^r]* (WEINER et al., 1994).
- **Linhagem DH5α™-T1^R:** *F⁻φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk⁻, mk⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA* (KILLMANN, BENZ, BRAUN, 1996).

4.1.1.3. Animais experimentais

Ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar (240-270 g), fornecidos pelo Centro de Bioterismo-CEBIO do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, foram utilizados nos protocolos experimentais. Todos os animais foram mantidos em caixas de plástico 17 x 34 x 40 cm em grupos de 4 animais, com livre acesso à alimentação padrão e água potável, e ciclo de 12 h de luz e 12 h de escuro.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Comitê da Universidade Federal de Minas Gerais (Processo n°. CETEA 22/1996 e 102/2009)- Anexo II.

4.1.2. Equipamentos

4.1.2.1. Centrífugas

Beckman GS-6R
Beckman J2-MC rotor JA 20
Eppendorf Modelo 5415C
Hettich MIKRO 200 R
Hitachi - Himac CR21GII, Rotor R20A2
Sorval® pico
SORVALL Tube, PP- F

4.1.2.2. Demais equipamentos

Agitador de bancada Shaker TS-2000^a (Biomixer®- China)
Agitador magnético/Aquecedor, modelo 258 (Fanem®- Brasil)
Balança analítica PM 4000 (Mettler®-Brasil)
Banho-maria (Hemoquímica®, Brasil)
Capela de exatão (Polyscience®-EUA)
Capela de fluxo laminar (Veco®- Brasil)
Cuba para eletroforese em gel de agarose (Sigma Aldrich®- EUA)
Espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech®- Uppsala, Suécia)
Estufa bacteriológica 002CB (Fanem®- Brasil)
Gene Quant RNA/DNA (Pharmacia Biotech ®- Uppsala, Suécia)
Homogeneizador Potter-Elvehjem (Sigma Aldrich®- EUA)
HPLC ÄKTA Purifier 10 (Amersham Biosciences®- EUA)
MALDI TOF-TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics®, Billerica EUA)
Máquina fotográfica digital (Kodak 120 ds - Digital Science)
Mini-Protean Trans-Blott Tranfer (Bio-Rad, EUA).
pHmetro (Digimed- Brasil)
Scanner HP Scan Jet G2710 (HP- Brasil)
Sequenciador de DNA ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems-EUA)
Shaker (New Brunswick Scientific®- EUA)
Software Kodak digital science 1D – Electrophoresis Documentation and Analysis (Kodak- Rochester- Nova York)

Sonicador Sonifier 250 (Hielscher- Alemanha)
Termociclador DNA 480 (Perkin Elmer-EUA)
Termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems- EUA)
Termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems- EUA)
Trans-iluminador (HOEFER, Califórnia- EUA)
Vortex G22220 (Daigger- Califórnia- EUA)

4.1.2.3. Colunas de cromatografia

- a) C18 5 μ ST 4.6/ 250 (poros- 100Å- de sílica esférica de 5 μ m com 18 cadeias de alquila, 250 x 4,6 mm, $p_{m\acute{a}x}$ =25 MPa (250 bar) (Amersham Pharmacia Biotech- Uppsala, Suécia)
- b) HisTrap™ HP Column Chelating HP 5 mL, (6% agarose esférica, 34 μ M, 1,6 x 2, 5 cm, $p_{m\acute{a}x}$ =0,3 MPa (3 bar) (GE Healthcare- Uppsala, Suécia)
- c) Hitrap™ HP Desalting 5 mL (Sephadex™ G-25 Superfina ligada à dextrana, 1,6 x 2,5 cm, $p_{m\acute{a}x}$ = 0,3 MPa (3 bar), limite de exclusão M_r = 5000 (GE Healthcare- Uppsala, Suécia)

4.1.3. Reagentes

4.1.3.1. Reagentes para eletroforese de DNA

Ácido bórico (Sigma- EUA)
Ágar (GibcoBRL Life Technologies- Nova York, EUA)
Agarose (Sigma- EUA)
Azul de Bromofenol (Sigma- EUA)
Brometo de Etídio (Pharmacia Biotech- Uppsala, Suécia)
EDTA (Sigma- EUA)
Glicerol (USB- Claveland, Ohio)
Orange G (Sigma- EUA)
Tris-HCl (Invitrogen- EUA)

4.1.3.2. Reagentes para eletroforese de proteína

β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich- EUA)
Acrilamida (USB- Claveland, Ohio)
Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma- EUA)

Dodecil sulfato de sódio (Pharmacia Biotech- Uppsala, Suécia)

Glicina (GibcoBRL Life Technologies- Nova York, EUA)

N, N'- metil-bis-acrilamida (USB- Claveland, Ohio)

Persulfato de Amônio (Sigma- EUA)

TEMED (Sigma- EUA)

4.1.3.3. Padrões de massa e tamanho molecular

1) Para eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de SDS (PAGE-SDS): Bench Mark™ Protein Ladder (Invitrogen- EUA):

Banda 1- 220 kDa. **Banda 2-** 160 kDa. **Banda 3-** 120 kDa. **Banda 4-** 100 kDa. **Banda 5-** 90 kDa.

Banda 6- 80 kDa. **Banda 7-** 70kDa. **Banda 8-** 60kDa. **Banda 9-** 50kDa. **Banda 10-** 40kDa. **Banda 11-**

30kDa. Banda 12- 25kDa. **Banda 13-** 20kDa. **Banda 14-** 15kDa. **Banda 15-** 10kDa.

2) Para eletroforese gel de agarose: pUC 19/HpaII: **Banda 1-** 501pb. **Banda 2-** 489pb.

Banda 3- 404pb. **Banda 4-** 331pb. **Banda 5-** 242pb. **Banda 6-** 190pb. **Banda 7-** 147pb. **Banda 8-**

111pb. Banda 9- 110pb. **Banda 10-** 67pb. **Banda 11-** 34pb. *N/ HindIII*: **Banda 1-** 23130pb. **Banda**

2- 9416pb. **Banda 3-** 6557pb. **Banda 4-** 4361pb. **Banda 5-** 2322pb. **Banda 6-** 2027pb. **Banda 7-**

564pb. Banda 8- 125pb. DNA Ladder 250 pb (Invitrogen- EUA): **Banda 1-** 5000pb. **Banda 2-**

3500pb. Banda 3- 1000pb. **Banda 4-** 250pb.

4.1.3.4. Reagentes para cromatografias

Acetonitrila (JT Baker-EUA)

Ácido trifluoroacético (Merck Schuchardt, Alemanha).

Cloreto de Cálcio Dihidratado cristalino (Merck- Brasil)

Cloreto de Sódio (Sigma Aldrich Life Science- EUA)

Fosfato de sódio (Merck- Brasil)

Imidazol (Sigma- EUA)

4.1.3.5. Enzimas

a) De restrição: *NcoI* e *XhoI* (Amersham Pharmacia Biotech-Uppsala, Suécia)

b) De modificação:

- DNA T4 ligase (Amersham Pharmacia Biotech-Uppsala, Suécia)

- Taq polimerase Platinum de alta fidelidade (Invitrogen- EUA)

- Taq polimerase (Invitrogen- EUA)
 - Fosfatase alcalina (Pharmacia- Uppsala, Suécia)
 - DNA metilase (Invitrogen- EUA)
- c) Para proteínas: Enteroquinase (Novagen Inc. - Madison, EUA)

4.1.3.6. Kits

- a) Kit para síntese da primeira fita de DNA RT-PCR Super Script™ (Invitrogen- EUA)
- b) PCR Supermix (22 mM Tris-HCl, pH=8,4; 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl₂, 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP, 22 U Taq DNA Polimerase recombinante /ml) (Invitrogen- EUA)
- c) Kit “GeneTailor Site-Directed Mutagenesis” (Invitrogen- EUA).
- d) Big Dye Terminator v3.1 Cycle (Applied Biosystem, EUA)

4.1.3.7. Vetor de expressão

O vetor de expressão usado neste trabalho foi o pET32c(+) (Novagen-EUA) fig. 7. O sistema pET é especializado na clonagem e expressão de proteínas recombinantes em diferentes linhagens de *E. coli*. Este vetor possui vários sítios para diferentes enzimas de restrição e gene de resistência ao antibiótico ampicilina, além de duas origens de replicação, a f1 e a origem do vetor pBR322. Este plasmídeo contém ainda, o promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7 – T7 lac (STUDIER et al, 1990; DUBENDORFF, STUDIER, 1991). O gene da T7 RNA polimerase, deve estar sob o controle do promotor lac UV5 no cromossomo da célula hospedeira, sendo a expressão das proteínas recombinantes, clonadas no vetor, induzida por IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo). Este vetor possui ainda, a sequência His•Tag®, a qual facilita a purificação e detecção imunológica da proteína expressa. Além disto, a proteína é expressa em fusão com a tiorredoxina (Trx•Tag™- 109 aa), que proporciona o aumento na solubilidade no citoplasma da *E. coli* (LA VALLIE et al., 1993).

4.1.3.8. Outros reagentes

a) Para proteínas

Ácido acético (Merck- Alemanha)
Cloreto de potássio (Merck- Brasil)
3,3'- diaminobenzidina (Sigma - EUA)
Hidrogenofosfato de potássio (Merck- Brasil)
Hidrogenofosfato de sódio (Merck- Brasil)
IPTG (Bioeasy- Brasil)
Soroalbumina bovina (Sigma- EUA)
Tween 20% (Pharmacia- Uppsala, Suécia)
Uréia (Amresco- Solon, Ohio)

b) Para DNA

Acetato de Sódio (Merck- Brasil)
Álcool isoamílico (Sigma- Alemanha)
Cloreto de céσιο (Sigma- EUA)
Cloreto de magnésio (Merck- Brasil)
Dietilpirocarbonato (Sigma- EUA)
Etanol (Sigma Aldrich)
Extrato de levedura (GibcoBRL Life Technologies- Scotland, U.K)
Fenol: CIAA (Invitrogen- EUA)
FICOLL® 400 (Pharmacia Biotech- Suécia)
Formamida Hi-Di (Applied Biosystems-EUA)
Glicogênio (USB- Claveland, Ohio)
Glicose (Synth- Brasil)
Hidróxido de sódio (Merck- Brasil)
Polietilenoglicol 800 (Merck- Brasil)
Peptona Bacteriológica (Himedia®- Mumbai, Índia)
Triton X-100 (Sigma Aldrich)

TRizol (Invitrogen- EUA)

Tween 20 (Pharmacia Biotech)

X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β -D-galactopiranosideo) (Promega-EUA)

4.2. Métodos

4.2.1. Meios de cultura, tampões e soluções

GTE (glicose- Tris- EDTA): 50 mM glicose, 25 mM de Tris pH=8,0, 10 mM de EDTA.

KRH (Krebs-Ringer-Hepes): 0,124 M NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM Hepes, 10 mM Glicose pH 7,4 com NaOH 5 M.

Meio 2xTY: 16 g de Peptona Bacteriológica, 10g de Extrato de levedura, 5g de NaCl. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1M, em um volume final de 1L. O meio foi autoclavado.

Meio LB (Luria- Bertani): 10 g de Peptona Bacteriológica, 5g de Extrato de levedura, 10g de NaCl em um volume final de 1L. O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 1M. O meio foi autoclavado.

Meio LB Agar: 10 g de Peptona Bacteriológica, 5g de Extrato de levedura, 10g de NaCl, 15g de Agar, em um volume final de 1L. O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 1M. O meio foi autoclavado.

PBS (*Phosphate buffered saline*): 10 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, 27 mM KCL e 1,4 M NaCl.

Solução bloqueadora: 1,4 M NaCl, 0,027 M KCl, 80 mM Na₂HPO₄. 7H₂O, 15 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween 20, 1% de BSA.

Solução de glicogênio: 10 mg em 1 mL de água Milli Q autoclavada

Solução de homogeneização: sacarose 0,32 M, EDTA 1 mM e Dithiotreitol 0,25 mM, pH=7,4 com NaOH 0,1 M

Solução de IPTG: foi dissolvido em água Milli Q estéril, em fluxo laminar, na concentração de 1M e estocado a -20°C. A solução foi utilizada na concentração final de 1 mM.

Solução salina: 0,9 % de NaCl

Tampão da enzima enteroquinase: Solução estoque 10x: 500 mM Tris-HCl, pH=8,0 (22°C), 10 mM CaCl₂, 1% Tween-20 (Invitrogen®).

Tampão de revelação: 10 mg/ ml 3,3'-diaminobenzidina, 50 mM Tris pH=8,0, 5µl H₂O₂.

Tampão de transferência: 25 mM Tris pH=8,3, 0,192 mM glicina, 20% de metanol.

TE (Tris-EDTA): Solução estoque 10x concentrado: 12,1 g de Tris, 2,9 g de EDTA. O pH foi ajustado para 8,0 com HCl 1M, em um volume final de 10 ml.

4.2.1.1. Soluções para eletroforese

4.2.1.1.1. SDS-PAGE

PSA: 10% (m/v), armazenada a -20°C.

Solução A: 29,2% (m/v) de acrilamida, 0,8% (m/v) bis-acrilamida em água. A solução foi armazenada a 4°C até o momento do uso.

Solução B: Tris-HCl 1,5 M, pH =8,8.

Solução C: Tris-HCl 0,5 M, pH =6,8.

Solução corante: 0,2 % (m/v) de Coomassie Blue R-250 em água: metanol: ácido acético (4:5:1 v/v).

Solução D: SDS 10 % (m/v).

Solução descorante: água: etanol: ácido acético (6:3:1 v/v).

Tampão da amostra: 2 ml de 0,5 M Tris-HCl pH=6,8; 0,8 ml de β -mercaptoetanol, 1,6 ml glicerol; 3,2 ml de SDS 10% (m/v), 0,5 g de azul de bromofenol e 4 ml de água.

Tampão de corrida: 0,025 M Tris; 0,192 M glicina; SDS 10% m/v, pH=8,3

4.2.1.1.2. Agarose

Solução corante: TAE na presença de brometo de etídeo (1 μ g/ml)

Solução de Orange G 0,025%, 0,03 g de EDTA, FICOL 20% m/v, pH= 8,0, e volume final de 10 ml.

TAE (Tampão Tris-Acetato): 0,04 M Tris-HCl pH=8,0, 0,12% ácido acético, 0,1 M EDTA

TBE (Tampão Tris-Borato): 89 mM Tris, 89 mM Ácido bórico, 2 mM EDTA. O pH foi ajustado para 8,0 com HCl 1M, em um volume final de 1L.

4.2.1.2. Antibióticos

Ampicilina: A ampicilina (Fluka- EUA) foi dissolvida em água Milli Q estéril na concentração de 50 mg/ml. A solução foi filtrada (filtro 0,22 μ m) e armazenada em alíquotas de 50 μ l a -20°C. A solução foi utilizada na concentração final de 100 μ g/ml.

Cloranfenicol: O cloranfenicol (Calbiochem, Merck- Alemanha) foi dissolvido em água Milli Q estéril na concentração de 34 mg/ml. A solução foi filtrada (filtro 0,22 μ m) e estocada em alíquotas de 50 μ l a -20°C. A solução foi utilizada na concentração final de 34 μ g/ml.

4.2.1.3. Soluções para cromatografias

a) Cromatografia de afinidade:

Solução de descarga: 20 mM fosfato de sódio, 0,5 M NaCl e 50 mM EDTA, pH=7,4

Solução de recarga: 0,1 M de sulfato de níquel

Tampão de ligação: 30 mM imidazol, 0,5M NaCl e 20 mM fosfato de sódio, pH=7,4.

Tampão de eluição: 0,5 M imidazol, 0,5 M NaCl e 20 mM fosfato de sódio, pH=7,4.

b) Cromatografia de gel filtração:

Solução: TFA 0,1 % (v/v) em água Milli-Q.

c) Cromatografia de fase reversa:

Solução A: TFA 0,1 % (v/v) em água Milli-Q.

Solução B: TFA 0,1 % (v/v) em acetonitrila.

Os demais reagentes foram de grau analítico e as soluções destinadas ao uso no sistema HPLC foram preparadas com água Milli-Q® H₂O (Millipore-Bedford, E.U.A).

4.2.2. Protocolos experimentais

4.2.2.1. Obtenção do RNA extraído da glândula da aranha *Phoneutria nigriventer*

Aproximadamente 90 µg de glândulas veneníferas isoladas de exemplares da aranha *Phoneutria nigriventer* foram maceradas, em um cadinho de porcelana, sob uma atmosfera de nitrogênio líquido visando-se a extração do RNA total.

Acrescentou-se 10 ml de Trizol (Invitrogen- EUA) (CHOMCZYNSKI, SACCHI, 1987, CHOMCZYNSKI, 1993) e incubou-se por 5 min a 30°C.

Em seguida, adicionaram-se 2 ml de clorofórmio, a mistura foi incubada por 3 min e centrifugada a 13000 g (Eppendorf Modelo 5415C) a 4°C durante 15 min. A solução foi separada em duas fases: uma aquosa e uma orgânica. A fase aquosa, contendo o RNA foi transferida para um outro tubo e à mesma adicionaram-se 5 ml de isopropanol. Este material foi incubado por 10 min a 30°C e centrifugado a 13000 g (Eppendorf Modelo 5415C) a 4°C por mais 10 min.

O sobrenadante foi descartado, o sedimento lavado e ressuspendido com etanol 75% (v/v) e em seguida centrifugado a 13000 g por 15 min para a retirada do DNA e das proteínas. O sobrenadante foi descartado e o sedimento após a evaporação completa do etanol, foi ressuspendido em 300 µl de água/DEPC. Aliquotas (1 µg/ ml) foram armazenadas em congelador a -80°C.

Todo o material utilizado para a extração do RNA foi previamente enxaguados com água Milli Q autoclada e tratada com DEPC (dietil-pirocarbonato). Luvas foram utilizadas em todo o processo e o material armazenado em local isolado do restante.

4.2.2.2. Estimativa da concentração do RNA

A quantificação do RNA purificado foi realizada através de leituras das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O fator de conversão para as leituras foi de 1 DO (densidade óptica) corresponde a concentração de RNA de 40 µg/ ml (SAMBROOK, FRITISCH, MANIATIS, 2001). As razões entre as leituras A_{260}/A_{280} determinam a pureza da amostra de RNA e razões $\geq 1,8$ até 2,0 indicam alto grau de pureza da amostra.

4.2.2.3. Análise do RNA

O RNA (2 µg diluído em água tratada com DEPC), previamente extraído, foi analisado quanto a sua integridade, por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA- ver item 4.2.1.1.2). À amostra acrescentou-se uma solução tampão contendo: FICOLL 20% (m/v), 10 mM EDTA pH=8,0, orange G 0,025% (m/v), brometo de etídeo (0,3 µg/mL). A eletroforese foi realizada com o tampão de corrida TBE diluído em água DEPC 0,1%, a 100 V por 40 min.

O gel foi visualizado sob iluminação ultravioleta em um trans-iluminador e fotografado em câmara digital com o auxílio de “software” da Câmara Kodak Digital Science 1D para o envio e análise da imagem ao computador.

4.2.2.4. Síntese do cDNA de fita simples

A síntese da primeira fita do cDNA, a partir do RNA total foi realizada de acordo com as instruções do Kit Super Script™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen-EUA) (Catálogo n° 11904-018).

Essa reação, apresentada na fig.8, é catalisada pela enzima transcriptase reversa SuperScript™II (RT). Ao RNA total (4 µg) adicionou-se uma mistura contendo os dNTP (10mM), Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg) e o volume foi completado para 9 µl com água tratada com DEPC. Estes componentes foram incubados a 65 °C por 5 min e no gelo por 1 min.

Paralelamente, preparou-se uma mistura de reação contendo tampão para a enzima transcriptase reversa (RT) 10x concentrado (2 µl), 25 mM MgCl₂ (4 µl), 0,1 M DTT (2 µl) e 1 µl de inibidor recombinante de RNase. Os 9 µl da mistura de reação foram adicionados para a mistura de RNA/Oligo (dT)₁₂₋₁₈, esta mistura foi homogeneizada e incubada a 42 °C por 2 min., após adicionou-se 50 U da enzima transcriptase reversa SuperScript™II e incubou-se a 42 °C por 50 min. A reação foi interrompida a 70°C por 15 min e armazenada em gelo. Em seguida adicionou-se 1 µl de RNase H à reação (que cliva a fita de RNA do híbrido RNA/cDNA) e esta foi incubada a 37 °C por 20 min.

Como controles usaram-se dois tubos, um contendo 1 µl da mistura de dNTP, 1 µl de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ e água tratada com DEPC q.s.p 10 µl; o outro continha 50 ng de RNA controle, 1 µl da mistura de dNTP, 1 µl de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ e água tratada com DEPC q.s.p 9 µl. Todos os controles foram submetidos às mesmas condições de incubação da reação para obtenção do cDNA de fita simples.

O cDNA de fita simples obtido foi então amplificado diretamente por reação de PCR.

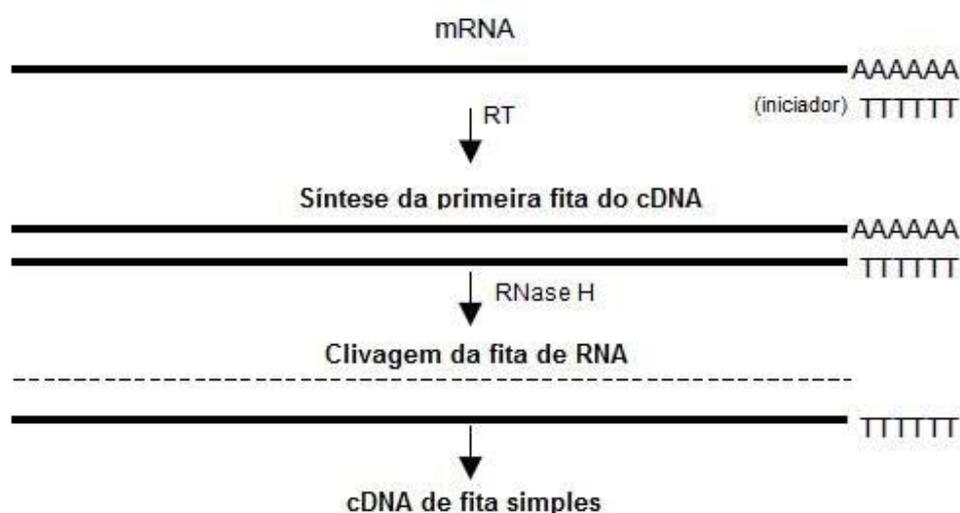


Figura 8: Representação esquemática da reação de RT-PCR. A reação de RT-PCR foi realizada com o kit SuperScript. First-Strand Synthesis System for RT-PCR. O RNA total isolado da glândula da aranha *Phoneutria nigriventer* foi utilizado como molde para a síntese do cDNA de fita simples pela enzima transcriptase reversa (RT). Após esta reação a fita de RNA do híbrido RNA/cDNA foi clivada pela enzima RNase H e a fita simples de cDNA obtida pode ser usada em reações de PCR posteriores.

4.2.2.5. Obtenção e amplificação do cDNA de dupla fita

Para a obtenção e amplificação do DNA de fita dupla codificador da toxina funcional PnTx2-6, a partir do segmento de cDNA de fita simples (2 µl), foi realizada uma PCR em equipamento DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, EUA).

Para tal procedimento usaram-se os iniciadores denominados PnTx2-6 Fw e PnTx2-6 Rv (Tabela 1), desenhados e sintetizados a partir das sequências de aminoácidos e DNA acessíveis eletronicamente nos bancos de dados Swiss-Prot (ID: AAL14349.1) e GenBank (número de acesso AY054746), publicadas por Cordeiro et al. (1992) e Penaforte (1998).

O cDNA de fita dupla codificador da toxina PnTx2-6 obtido, continha em seus flancos 5' e 3' segmentos de sítios de restrição para as enzimas *Nco*I e *Xho*I, respectivamente. A figura 9 representa o esquema do anelamento dos iniciadores utilizados para amplificar o cDNA.

Tabela 1: Iniciadores PnTx2-6 Fw e PnTx2-6 Rv.

Iniciador	Sequência	Produto
PnTx2-6 Fw	5'AGAGAGAGACCATGGCCACATGCGCTGGCCAA 3' (<i>Nco</i> I)	176 pb
PnTx2-6 Rv	5'AGAGAGAGACTCGAGTCATTTTTTACAGTTAGC 3' (<i>Xho</i> I)	

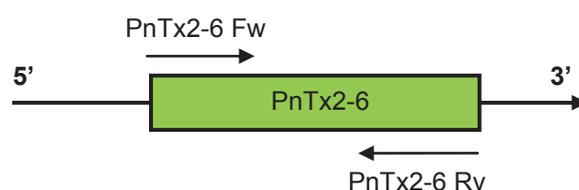


Figura 9: Representação esquemática dos locais nos quais os iniciadores anelam na região codificante da toxina funcional PnTx2-6.

A reação de PCR foi realizada utilizando-se uma concentração final de 0,2 μ M de cada iniciador (Fw e Rv), 2 μ L de cDNA de fita simples obtido no passo anterior, 1 μ L de 50 mM MgSO₄, 1 μ L da mistura de dNTPs (10 mM), 25 μ L do tampão da enzima Taq Platinum 10 x concentrado, 1 U da enzima Taq Platinum de Alta fidelidade e água Milli Q q.s.p. 25 μ L.

O programa utilizado no termociclador foi de 2 min a 94°C (desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 58°C (anelamento dos iniciadores), 1 min a 68°C. O ciclo final teve a duração de 2 min a 72°C (extensão). As amostras foram armazenadas a 4°C até a utilização.

O fragmento amplificado (10 μ l) foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) em tampão TBE/ brometo de etídeo (1,0 μ g/mL). Às amostras acrescentou-se uma solução de 0,2% Orange G em 20% de FICOLL. A eletroforese foi realizada a 90 V e o tamanho molecular do produto amplificado foi estimado utilizando o “Software” da Câmara Fotográfica Kodak Digital Science 1D comparando-o com os fragmentos do marcador de tamanho molecular pUC19/HpaII.

4.2.2.6. Purificação do fragmento de DNA amplificado por PCR

O DNA amplificado foi precipitado com etanol. À amostra acrescentaram-se glicogênio 6,25% (v/v), etanol (3 volumes) e acetato de sódio 3 M pH=5,5 10% (v/v). Esta mistura foi mantida a -20 °C por 30 min e em seguida centrifugada (Centrifuga Eppendorf 5415) por 10 min. a 17000g e 4 °C. O precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v), centrifugado a 4 °C e novamente lavado com etanol 99% (v/v). Após a evaporação do álcool à temperatura ambiente, o precipitado foi ressuspenso em solução TE (Tris -EDTA ver item 4.2.1).

A concentração de DNA amplificado (μ g/mL) foi determinada através da leitura de absorvâncias a 260 nm. Uma unidade de DO de uma solução de DNA de fita dupla equivale a concentração de 50 μ g/mL. A qualidade e pureza do DNA eluído foram determinadas pela razão entre as leituras das absorvâncias A_{260}/A_{280} nm. Amostras com razão igual ou superior a 1,8 tem elevado grau de pureza do

DNA, amostras com a razão menor do que 1,8 podem estar contaminadas com proteína ou fenol (SAMBROOK, FRITISCH, MANIATIS, 2001).

4.2.2.7. Mini-preparação do DNA plasmídico

O vetor pET 32c(+) (mapa na Figura 7) confere às bactérias transformadas resistência ao antibiótico ampicilina. Por isso alíquotas obtidas de uma cultura de células de *E. coli* da linhagem NM 522 contendo o DNA plasmídico pET-32c(+) foram crescidas em meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e usadas na minipreparação seguindo o protocolo adaptado de Sambrook; Fritisch; Maniatis (2001) (Molecular Cloning. Cold Spring Harbor. Capítulo 1, Protocolo 1: Preparação de DNA plasmídico por lise alcalina: Minipreparação).

As amostras foram incubadas por 16h a 37°C sob agitação constante (225 g). Essas culturas foram centrifugadas (Beckman CS-6R) a 3000 g por 15 min., o meio removido e o sedimento ressuspensionado em 200 µl de solução GTE (ver item 4.2.1) a 4°C.

À suspensão adicionaram-se 200 µl de solução 200 mM de NaOH, 1% (m/v) SDS e a mistura foi incubada a 4°C por 5 min. Cento e cinquenta microlitros de NaOAc 3 M foram acrescentados e uma segunda incubação foi realizada, a 4°C por 5 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 13000 g (Sorvall® pico) por 15 min. até a eliminação completa de qualquer material particulado, após adicionaram-se 400µl de fenol:CIAA (1:1 v/v) ao sobrenadante, com uma posterior centrifugação a 13000 g (Sorvall® pico) por mais 5 min.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a ela adicionaram-se 240 µl de isopropanol 100%, permanecendo a temperatura ambiente por 10 min., a mistura foi centrifugada a 13000 g por 15 min. Retirou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado com 1 ml de etanol 70 % (v/v). Após a retirada e evaporação completa do etanol, ao sedimento acrescentou-se uma solução TE contendo 20 µg/ ml de RNase e essa solução foi incubada por 1 h a 37°C.

A concentração de DNA plasmídico foi determinada pela medida da absorbância a 260nm.

4.2.2.8. Digestão enzimática do DNA amplificado por PCR e do DNA plasmídico

As clivagens enzimáticas do DNA amplificado e do DNA plasmídico foram realizadas com as enzimas de restrição *Xho* I e *Nco* I. Cerca de 2 µg do DNA amplificado ou DNA plasmídico pET32c(+) (30 µg), 5 U de enzima *Xho* I, tampão OPA 10X concentrado (100 mM Tris, pH=7,5, 100 mM acetato de magnésio e 500 mM de acetato de potássio, Amersham-Pharmacia- Upsala, Suécia) em H₂O q.s.p. 100 µl foram incubados a 37 °C por 16 h. A reação foi inativada a 65°C por 5 min. Em seguida, adicionaram-se 5U da enzima *Nco*I, seguindo-se o mesmo protocolo. Alíquotas dos produtos foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 4% (m/v).

4.2.2.9. Desfosforilação do DNA plasmídico linear

O DNA plasmídico clivado, foi quantificado e posteriormente, incubado com a enzima fosfatase alcalina (Pharmacia- Uppsala, Suécia) na concentração de 4 pmol da enzima para cada 3 µg de plasmídeo. A reação foi realizada a 37°C durante 30 min. e a atividade enzimática interrompida a 85°C por 5 min. A integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v).

4.2.2.10. Clonagem do fragmento de DNA amplificado por PCR no DNA plasmídico linear

O fragmento de DNA amplificado por PCR (16 ng) foi clonado no DNA plasmídico (100 ng), utilizando-se a enzima DNA ligase T4 (1 U em tampão 10 mM Tris-HCl pH=7,5, 1 mM DTT, 50% (v/v) glicerol) (Ver o esquema da clonagem na Figura 10A).

A reação foi realizada na presença do tampão da reação (250 mM Tris-HCl pH=7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM de DTT, 5% (v/v) polietilenoglicol-8000), à temperatura ambiente por 5 min. A reação de ligação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) e o produto da reação utilizado para a transformação em células de *E. coli*.

Como controles utilizaram-se: Controle positivo: 4 µl tampão da reação 5x concentrado, o vetor pET 32 c(+) (100 ng), água Milli Q autoclavada para um

volume final de 20 µl. Controle negativo: 4 µl tampão da reação 5x concentrado, o vetor pET 32 c(+) previamente digerido e desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina (100 ng), DNA ligase T4 (1U) e água Milli Q autoclavada para um volume final de 20 µl.

A estratégia de clonagem representada na figura 10 B indica que a região codificante da proteína PnTx2-6 apresenta 3 regiões, uma sequência de peptídeo sinal, um pró-peptídeo e a sequência da toxina madura (1). A região codificante que foi amplificada por PCR (2) e posteriormente inserida no vetor de expressão pET 32c(+). A proteína recombinante PnTx2-6 apresenta dois resíduos de aminoácidos, -AM² no N-terminal, que são provenientes de sequência extra do vetor de expressão.

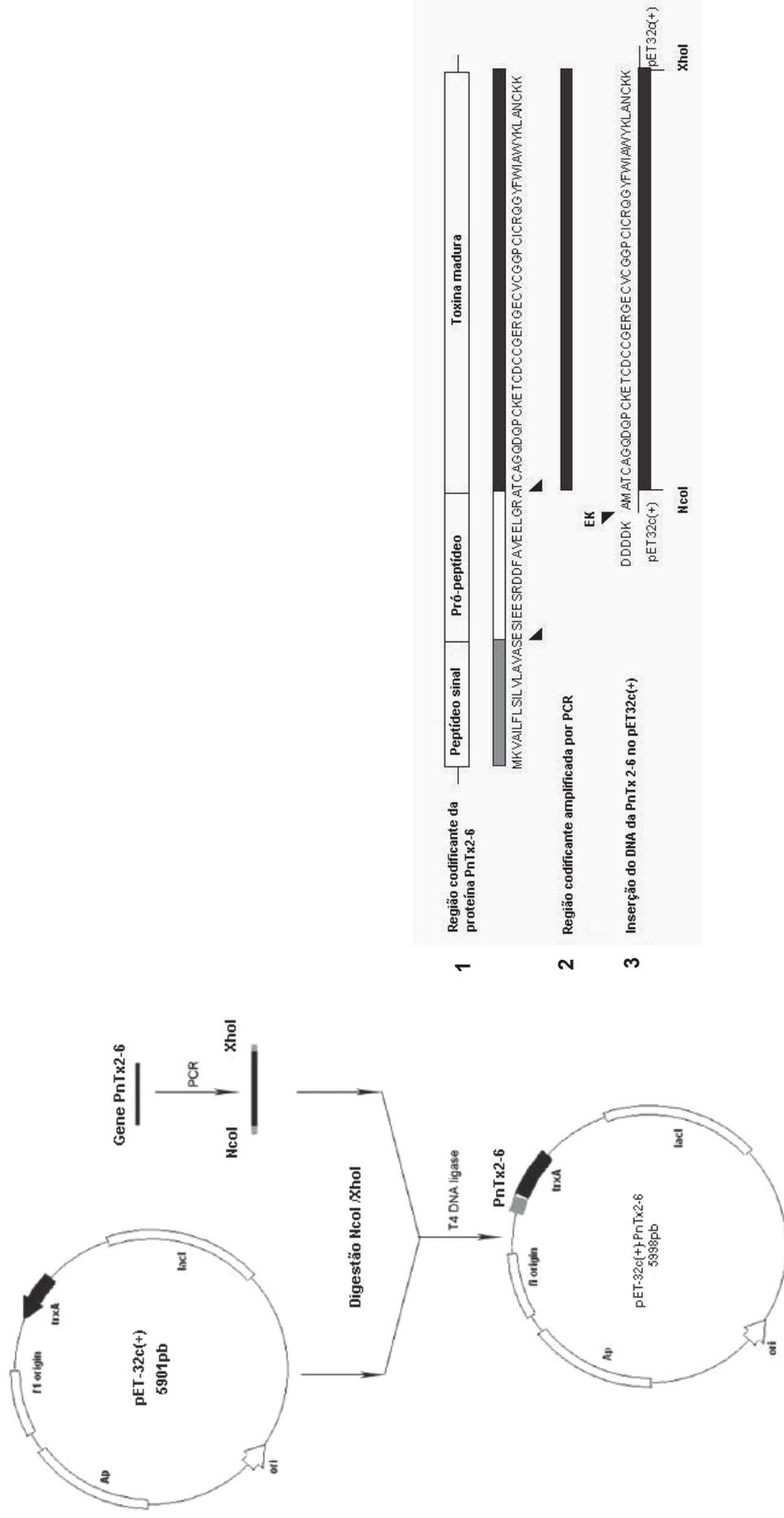


Figura 10: **A)** Esquema da clonagem do DNA codificador da toxina PnTx2-6 no DNA plasmídico pET-32c(+). O DNA plasmídico recombinante pET32c(+)-PnTx2-6 que possui 5998pb. **B)** Representação da região codificante da toxina madura PnTx2-6 e da estratégia de clonagem. 1) Domínios funcionais incluindo a sequência sinal (□), a região rica em glutamato (■) e a sequência da toxina madura PnTx2-6 amplificada por PCR. 2) A região codificante da toxina madura PnTx2-6 amplificada por PCR. 3) A estratégia de clonagem do cDNA para a toxina e a sua sequência de aminoácidos deduzidos. *NcoI* e *XhoI* são as enzimas de restrição usadas para clivar tanto o vetor de expressão quanto o cDNA para a PnTx2-6. A sequência de aminoácidos DDDDK corresponde ao sítio de clivagem da enzima enterocinase (EK).

4.2.2.11. Preparação de células competentes de *E. coli*

Na obtenção das células competentes utilizaram-se células de *E. coli* das linhagens NM522 (Promega, EUA) e BL21(DE3) pLysS (Novagen, EUA). Estas foram quimicamente preparadas segundo o protocolo descrito em Sambrook; Fritish; Maniats (2001), (Molecular Cloning. Cold Spring Harbor. Capítulo 1, Protocolo 25: Preparação e transformação de células competentes Usando cloreto de cálcio) com algumas modificações.

Frasco de 50 ml contendo 20 ml de meio 2xTY foi inoculado com 200 µl de um pré-cultivo (crescido a 37°C em meio 2xTY por 16 h). Essas culturas foram incubadas a 37°C sob agitação constante (225 g), por cerca de 2 h, até atingirem a fase log cuja leitura no espectrofotômetro em A_{600nm} foi de aproximadamente 0,3 e 0,6 para as linhagens NM522 e BL21(DE3)pLysS, respectivamente.

As culturas foram transferidas para tubos de centrifuga estéreis e centrifugadas (Beckman CS-6R) a 3000 g por 10 min. à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 10 ml de CaCl₂ 50 mM previamente esterilizado, sendo mantido a 4°C por 20 min. Centrifugou-se novamente a suspensão, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as células quimiocompetentes ressuspendido em 1 ml da mesma solução.

4.2.2.12. Transformação das células competentes de *E. coli*

A transformação das células com o DNA plasmídico recombinante pET-32c(+)-PnTx2-6, realizou-se por choque térmico como segue: pET-32c(+)-PnTx2-6 (100 ng em Tris-HCl 50 mM, pH=7,2 q.s.p 25µl, estéril) foi incubado a 4°C por 40 min com 150 µl da suspensão contendo as células competentes. A seguir, a mistura foi mantida a 42°C por 3 min e à temperatura ambiente por 10 min. Às células transformadas adicionaram-se 500 µl de meio LB, e estas ficaram sob agitação constante a 37 °C durante 1 h. A cultura foi inoculada em placas contendo meio sólido LB-ágar suplementado com o antibiótico ampicilina (100 µg/ml para células NM522) ou ampicilina-cloranfenicol (100 µg/ml - 34 µg/ml para

células BL21(DE3)pLysS). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 16 h e posteriormente a 4°C por 1 mês.

Para medir a eficiência da transformação, foram feitos controles utilizando-se o plasmídeo íntegro, plasmídeo digerido e fosforilado com a enzima fosfatase alcalina, células transformadas com o inserto e células não transformadas.

Eficiência da transformação (UFC/ µg):

$$\frac{\text{UFC na placa controle}}{\text{pg de PUC 19 da transformação}} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ pg}}{10^3 \text{ pg}} \times \text{fator de diluição}$$

4.2.2.13. Análise por PCR das colônias transformantes

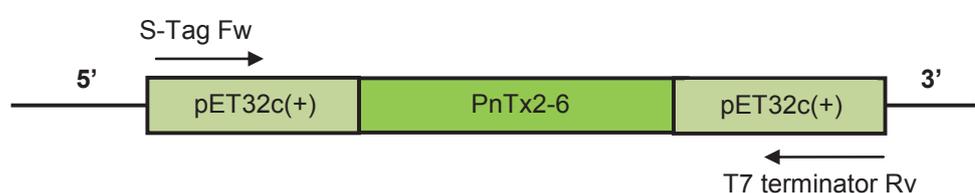
Com intuito de isolar plasmídeos portadores de inserto, as colônias transformantes item 4.2.2.12, foram aleatoriamente selecionadas, inoculadas em 0,24 ml de meio líquido LB/ampicilina e/ou cloranfenicol e incubadas sob agitação constante a 37 °C por 2 h. Alíquotas de 2 µL provenientes de cada cultura foram analisados por PCR certificando-se que o fragmento codificador da toxina PnTx2-6 estava inserido no vetor.

Na reação de PCR, utilizaram-se dois pares de iniciadores (0,2 µM): os apresentados na Tabela 1 (com sequências 5' e 3' da região codificadora da toxina PnTx2-6) e os que continham sequências que flanqueavam a região do múltiplo sítio de clonagem do DNA plasmídico, denominados S-Tag (senso) e T7 terminator (antisenso) (Tabela 2). O anelamento dos iniciadores está representado na figura 11 e os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% (m/v).

Os clones recombinantes foram selecionados e cultivados em 10 ml de meio líquido LB/ampicilina e/ou cloranfenicol, crescidos a 37°C até atingirem a fase log, com leitura de DO_{600nm} de 0,3 (células NM522) e 0,6 (células BL21(DE3)pLysS, coletados por centrifugação e ressuspensão em meio LB contendo 10% (v/v) de glicerol. As alíquotas de 20 µl foram armazenadas a -70 °C.

Tabela 2: Iniciadores S-Tag e T7 terminator

Iniciador	Sequência	Produto
S-Tag Fw	5'CGAACGCCAGCACATGGACA 3'	300 pb
T7 terminator Rv	5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'	

**Figura 11:** Representação esquemática dos locais nos quais os iniciadores anelam na região codificante da toxina PnTx2-6 inserida no DNA plasmídico pET32c(+).

4.2.2.14. Isolamento do DNA plasmídico em larga escala

A preparação do DNA plasmídico, pET-32c(+)-PnTx2-6, segue o protocolo descrito no item 4.2.2.7. A purificação deu-se pelo método descrito em Sambrook; Fritish; Maniats (2001), (Molecular Cloning. Cold Spring Harbor. Capítulo 1, Protocolo 10: Purificação de DNA circular por centrifugação de equilíbrio em gradiente de cloreto de céσιο e brometo de etídio) com algumas modificações.

Para a purificação, o sedimento de uma cultura de clones recombinantes, preparado pelo método de lise-alcalina, foi ressuspendido em uma solução de TE. Adicionou-se então, 10 µl de Triton X-100 (diluição 1:100/ ml do volume final) e CsCl (1,01g/ml de solução de DNA) e a solução foi homogeneizada.

Posteriormente, acrescentou-se 2 µl de uma solução de brometo de etídio 2,5 M para cada 1µg de DNA. A mistura foi centrifugada (centrífuga Sorvall, rotor SS-34) a 1100g por 10 min. em tubos de polipropileno. A fase límpida e a de coloração avermelhada foram transferidas para um tubo Quick-Seal® (Beckman) e

esses foram selados a quente. Os tubos foram ultracentrifugados (Beckman XL 70, rotor NVT 65), a 65000 g, 20°C por 5h. A banda plasmídica foi coletada por punção em uma seringa sob luz UV.

A remoção do brometo de etídio foi realizada segundo Sambrook; Fritish; Maniats (2001), (Molecular Cloning. Cold Spring Harbor. Capítulo 1, Protocolo 12: Remoção do brometo de etídio do DNA por extração com solventes orgânicos). Acrescentou-se um volume igual ao da solução de DNA, de n-butanol ou álcool isoamílico saturados com água, homogeneizando-se em vórtex.

A mistura foi centrifugada a 1500 g (centrífuga Sorvall RT-6000 rotor HL-4) por 3 min à temperatura ambiente. A fase orgânica superior foi retirada e o procedimento repetido por 6 vezes até que ambas as fases (orgânica e aquosa) ficassem incolores. O cloreto de céσιο foi removido por precipitação do DNA com etanol.

Para precipitar o DNA da solução de cloreto de céσιο, adicionou-se água Milli-Q na proporção 1:3 e a mistura foi homogeneizada. Posteriormente, acrescentou-se etanol 100% (1:8 volumes de etanol) e incubou-se a mistura por 15 min. a 4°C. O DNA precipitado foi coletado por centrifugação a 13000 g (Centrífuga Sorval, rotor SS 34) por 15 min. a 4°C, e a operação repetida até que não restasse mais DNA no sobrenadante. Posteriormente, lavaram-se os sedimentos de DNA com uma solução de etanol 70% (v/v). O etanol foi removido por inversão e evaporação à temperatura ambiente. O DNA foi então ressuspenso em 2 ml de TE.

A concentração de DNA na solução foi obtida por leituras de absorvância a 260 nm e o DNA foi estocado a -20°C.

4.2.2.15. Sequenciamento de DNA

Na reação de sequenciamento foi utilizado o kit de sequenciamento Big Dye Terminator v3.1 Cycle” (Applied Biosystems, EUA) com a seguinte reação padrão: 1 µl de mistura de reação Big Dye Terminator Ready, 1,5 µl de tampão de diluição

(5x concentrado), 1 µl de iniciador sTag (1,6 pmol/ µl), DNA (q.s.p. 200 a 500 ng) e água Mili-Q q.s.p 10 µl.

Cada clone a ser sequenciado foi aplicado em placa MicroAmp® Optical (Applied Biosystems). A placa foi colocada no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), utilizando-se o programa: 96°C por 1 min, 30 ciclos (94°C por 15 seg., 55°C por 15 seg, 60°C por 4 min), mantidas a 4 °C. Após a reação de PCR, os produtos foram precipitados segundo as recomendações do fabricante.

As amostras foram ressuspensas em formamida (Hi-Di™ Formamida Applied Biosystems) e em seguida analisadas no sequenciador automático capilar *ABI 3130 Genetic Analyser* (Applied Biosystems). A determinação da sequência consenso foi obtida pelo alinhamento dos produtos obtidos com a porção codificadora da toxina, utilizando-se o programa **BLASTN 2.2.21**.

4.2.2.16. Expressão da proteína recombinante

Células de *E. coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS, transformadas com o DNA plasmídico recombinante pET-32c(+)-PnTx2-6 foram testadas quanto a presença desse DNA recombinante por reações de PCR. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% (m/v). As colônias transformantes foram inoculadas em meio de cultura LB suplementados com ampicilina/cloranfenicol (100 µg/mL; 34 µg/mL).

As culturas foram crescidas por 16h. Dez mililitros do pré-inóculo

D G L F G R H Q P P O G H P H L R / % V X S O H P H Q W D

D Q W L E L H W F I U H R V L G R V V R E D J L W D até DO_{600nm} entre

0,6 – 1,0. A produção da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG (ver item 4.2.1) na concentração final de 1 mM com incubação a 23°C por 16h.

Posteriormente, as células foram centrifugadas a 3.000 g (Beckman CS-6R) por 30 min, temperatura ambiente e o sedimento submetido a congelamento por 20 min, seguido de descongelamento por 20 min. O precipitado viscoso foi ressuspensado em uma solução (0,03 M imidazol, 0,5M NaCl e 0,02 M fosfato de sódio, pH=7,4) denominado tampão de ligação.

4.2.2.17. Dosagem de proteínas

A concentração das proteínas presentes nas diferentes amostras foi estimada pelo Método de Dosagem de proteínas descrito por Lowry et al. (1951). Uma curva padrão controle foi construída a partir da solução de albumina nas concentrações de 0, 0,25; 0,05; 0,1; 0,2 mg/ml, em um volume final de 200 µl. Em seguida, às soluções protéicas (5, 10, 20 e 40 µl) foram acrescentados 200 µl de solução A e 20 µl do Reagente de Folin (1:2). Um tempo de 30 min foi aguardado e estas novas soluções (200 µl) aplicadas em uma placa de fUo chato (96 poços). Todas as amostras foram aplicadas na placa em duplicata. Após as absorbâncias das amostras foram obtidas por leituras em espectrofotômetro a 650 nm e comparadas a curva padrão do controle de albumina.

4.2.2.18. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes

As eletroforeses em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (PAGE-SDS) foram realizadas conforme a técnica descrita por Laemmli (1970). Os géis foram preparados em placas de vidro com dimensões de 10 x 8 x 0,2 cm, com espaçadores de 0,75 mm. Utilizou-se um gel de concentração 5 % (m/v) pH=6,8 contendo 0,125 M de Tris-HCl e SDS (0,1 % m/v) e um gel de separação 12,5 % ou 15 % (m/v), pH=8,8 e SDS (0,1 % m/v), mantendo-se a relação acrilamida:bis-acrilamida de 29,2:0,8 (m/m).

As amostras foram diluídas no tampão de amostra (ver item 4.2.1.1.1) e incubadas durante 3 min a 100 °C. Em seguida, de 5 a 25 µL das amostras e os padrões de massa molecular foram aplicados no gel.

A eletroforese em aparelho Bio-Rad Mini Protean® II (Cell- EUA) foi desenvolvida verticalmente com a solução tampão de corrida (item 4.2.1.1.1) para o cátodo e ânodo. A eletroforese foi realizada com uma corrente de 20 mA até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel (cerca de 100 min). Os géis foram corados por 16 h em solução corante (item 4.2.1.1.1) e descorados com uma solução de água: etanol: ácido acético (6:3:1 v/v). Em seguida, esses foram escaneados em Scanner HP Scan Jet G2710.

4.2.2.19. Purificação da proteína recombinante rPnTx2-6

O processo de purificação da proteína recombinante foi dividido em quatro etapas: cromatografias de afinidade e gel filtração da proteína de fusão recombinante, clivagem dessa proteína com enzima enteroquinase e cromatografia de fase reversa dos produtos da clivagem enzimática.

4.2.2.19.1. Cromatografia de afinidade

O material proveniente do sobrenadante do extrato celular foi aplicado em coluna de afinidade HisTrap™ HP Chelating HP 5 ml, carregada com íons Ni²⁺ imobilizados e equilibrada com o tampão de ligação (ver item 4.2.1.3a). A cromatografia foi realizada em aparelho HPLC, sistema ÄKTA Purifier 10, software UNICORN 4.11.

A cromatografia foi realizada com um gradiente linear (0-100%) de tampão de ligação (A) e eluição (B) (0,5 M de imidazol, 0,5 M NaCl e 0,02 M fosfato de sódio, pH=7,4), numa extensão de 100 ml. Frações de 1 ml foram coletadas em um fluxo de 1ml/ min. O perfil cromatográfico foi acompanhado por leituras de absorbância em 280 nm e amostras das frações coletadas foram analisadas por PAGE-SDS. Após as análises cromatográficas e eletroforéticas, a fração que apresentou a proteína de fusão recombinante foi selecionada para o segundo passo cromatográfico.

Todas as soluções utilizadas no sistema HPLC, foram preparadas com água Milli Q, filtrada (filtro de 0,22 µM) e degasificadas.

4.2.2.19.2. Cromatografia de gel filtração

A fração que continha a proteína de fusão recombinante obtida na etapa anterior foi submetida à cromatografia de filtração em gel em sistema de HPLC, utilizando-se duas colunas acopladas em série Hitrap™ HP Desalting 5 ml. As colunas foram previamente equilibradas e eluídas com o tampão Tris 0,025 M ou com uma solução de TFA 0,1% em água, com fluxo de 1,5 ml/min. Frações de 1ml

foram coletadas. O perfil cromatográfico foi acompanhado por leituras de absorbância em 280 nm. A presença da Trx-Histidina-PnTx2-6 foi detectada por PAGE-SDS.

4.2.2.19.3. Clivagem da proteína de fusão com a enzima enteroquinase

À fração purificada foi adicionado o tampão da enzima enteroquinase (Novagen- 0,02 M Tris-HCL pH=7,4, 0,05 M NaCl, 0,002 M CaCl₂) e a solução incubada a 22°C por 16h com diferentes quantidades de enzima enteroquinase. A análise da clivagem foi realizada por espectrometria de massas em aparelho MALDI TOF-TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics, Alemanha).

As clivagens da proteína de fusão com a enzima enteroquinase também foram testadas usando-se outra enzima enteroquinase (Invitrogen- EUA) incubadas em soluções tampões (Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM CaCl₂, 0,1% Tween-20) em diferentes concentrações de Tris-HCl (50 mM; 500 mM; 2,1 M e 5 M Tris-HCl). Testes posteriores foram realizados após incubações em solução Tris-HCl (0,5; 0,25 e 0, 125 M) contendo 10% (volume final) de soluções de uréia (2; 1 e 0,5 M) (SHAHRAVAN et al., 2008).

4.2.2.19.4. Cromatografia de fase reversa

A fração contendo a proteína de fusão recombinante clivada com enteroquinase, foi submetida à cromatografia em fase reversa em sistema de HPLC, com coluna Sephasil Peptide C 18 5µ ST4.6/250.

A amostra foi aplicada à coluna, previamente equilibrada com o eluente A (0,1% de TFA em água Milli-Q®). Os produtos de clivagem foram eluídos usando-se um gradiente contínuo do eluente B (0,1% TFA em ACN de 0 a 100%, segundo o programa: 0% de B de 0 a 15 min.; 0 a 35% de B de 15 a 19 min.; 35 - 40% de B de 19 a 102 min.; 40 a 100% de B de 104 a 106min.; 100% de B de 106 a 125 min. e 0% de B até 146 min). O fluxo foi de 1,0 ml/min; frações de 1 ml foram coletadas e as proteínas foram detectadas por absorbância a 214 nm.

4.2.2.20. Western blotting

Frações protéicas separadas em PAGE-SDS foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose (Genebind 45, tamanho do poro- 0,45µm, Pharmacia Biotech- Upsala, Suécia) segundo técnica descrita por Towbin et al. (1979). A transferência úmida foi realizada, por 1 h em tampão de transferência (ver item 4.2.1) e corrente de 180 mA, em aparelho Mini-Protean Trans-Blott Tranfer (Bio-Rad, EUA).

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução bloqueadora (item 4.2.1), por 16 h a 4°C e lavada com uma solução de PBS (item 4.2.1), 0,1% Tween 20. Em seguida, essa foi tratada com anticorpos de coelho contra peçonha bruta da aranha *Phoneutria nigriventer* (1 µg/ml em PBS, 0,1% Tween 20), incubando-a por 1 h, à temperatura ambiente, sob agitação constante.

A membrana foi então lavada com a solução de PBS, 0,1% Tween 20 e incubada por 1 h com o conjugado anti-IgG de coelho (1:10000 em PBS, 0,1% Tween 20). Após seguidas lavagens com PBS, 0,1% Tween 20, o complexo antígeno-anticorpo foi detectado pelo acréscimo e incubação por 1h no tampão de revelação (item 4.2.1). A reação foi finalizada com adição de solução de PBS.

4.2.2.21. Espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF MS

Para determinar os valores das massas moleculares dos peptídeos, as análises por espectrometria de massa em MALDI TOF/TOF MS foram realizadas no aparelho Ultraflex II (Bruker Daltonics, Alemanha), com o programa FlexControl 2.4.30.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras (1 µl) foram aplicadas na placa MTP AnchorChip 600/384 acrescida da solução matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) (1:1 v/v) deixando essa mistura cristalizar. Os espectros de MS foram obtidos em modo positivo/linear, com a frequência do laser ajustada em 50Hz. Os dados foram analisados através do programa Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics, Alemanha).

Parte 2- MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS

4.2.2.22. Mutações sítio dirigidas

Mutações sítio dirigidas da região codificadora da toxina PnTx2-6 foram efetuadas Usando o Kit “GeneTailor Site-Directed Mutagenesis” (Invitrogen- EUA). Este procedimento consistiu no uso do plasmídeo pET32c(+) contendo o gene para a toxina PnTx2-6 previamente sub-clonado e metilado, como “molde” em uma reação de PCR utilizando-se os iniciadores contendo as bases substituídas para as mutações desejadas.

A figura 12 A mostra o protocolo para as mutações sítio-dirigidas e um exemplo do anelamento dos iniciadores mutantes.

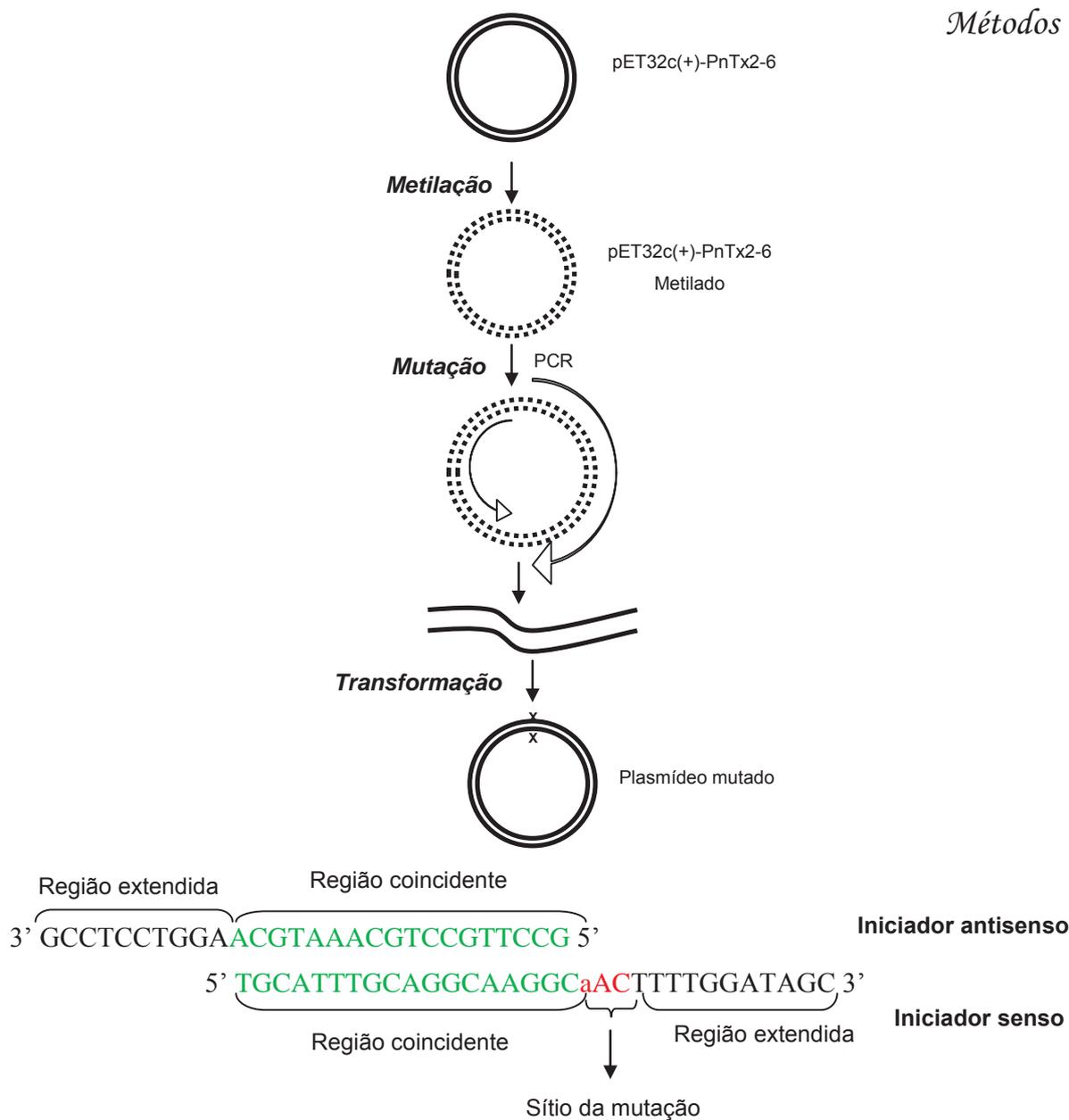


Figura 12: A) Protocolo das mutações sítio-dirigidas. O DNA plasmídico pET32c(+)-PnTx2-6 foi metilado pela enzima DNA metilase, e as mutações inseridas por PCR usando-se iniciadores mutante-específicos. Os produtos de PCR lineares foram transformados em células quimiocompetentes de *E. coli* da linhagem DH5 α T1^R, que possibilitaram a recircularização do plasmídeo mutante. A endonuclease MrcBC presente nesta célula digere o DNA metilado/hemimetilado deixando apenas o produto não metilado. **B) Anelamento dos iniciadores usados nas reações de mutação sítio dirigida.** Os iniciadores senso e antisenso continham regiões com bases nitrogenadas complementares e coincidentes (regiões coincidentes- em verde) e regiões de não coincidência (regiões estendida- em preto). Além dessas duas regiões, o iniciador senso continha o sítio de mutação (em vermelho)

4.2.2.22.1. Metilação

Incubou-se por 1 h, a 37°C, 100 ng do plasmídeo recombinante, com tampão de metilação (1,6 µl), SAM (s-adenosil-l-metionina) 10X concentrado (1,6 µl), 4 U de DNA metilase, água Milli Q estéril q.s.p 16 µl.

A eficiência da metilação foi avaliada usando-se duas reações: uma contendo o co-substrato enzimático SAM 10x concentrado e outra na ausência de SAM 10x concentrado. As reações foram diluídas 25x e transformadas em 50 µl de células competentes *E. coli* DH5αT1^R. As células (125 µl com SAM e 25 µl sem SAM) foram inoculadas em placas de ágar suplementadas com ampicilina. Após 16h de incubação a 37°C, a eficiência da metilação foi determinada utilizando-se a fórmula descrita abaixo.

$$\% = \frac{\text{colônias totais} \times 5 \frac{\text{com SAM}}{\text{sem SAM}} - \text{colônias totais (com SAM)}}{\text{Colônias totais} \times 5 \frac{\text{com SAM}}{\text{sem SAM}}}$$

Eficiência esperada: ≥90%.

O kit provem plasmídeos e iniciadores, para uso dos controles positivos, para testar eficiência da metilação, mutagenesis e células competentes.

4.2.2.22.2. Reação de mutação

Foram feitas reações de PCR a partir do plasmídeo recombinante metilado (30-40 ng), usando-se os iniciadores Fw e Rv (0,3 µM) contendo a região de mutação, 0,3 mM de dNTPs, 2,5 unidades Taq Platinum de Alta fidelidade (Invitrogen- EUA), 10 % (v/v) do tampão para PCR de alta fidelidade 10 x concentrado, 1 mM MgSO₄, água Milli Q autoclavada q.s.p 50 µl.

As reações foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem- EUA) com o seguinte programa: 2 min a 94°C (desnaturação inicial), seguido de 20 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C (anelamento dos iniciadores) e 6 min a 68°C. O ciclo final teve a duração de 10

min a 68°C (extensão). Após a mutação os produtos (5 µl) foram analisados em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE.

Às amostras acrescentou-se uma solução de 0,2% Orange G em 20% de FICOLL. A eletroforese foi realizada a 90 V e o gel corado com uma solução de TAE contendo brometo de etídeo (1,0 µg/mL). O tamanho molecular do produto amplificado foi estimado utilizando o “Software” da Câmara Fotográfica Kodak Digital Science 1D comparando-o com os fragmentos do marcador de tamanho molecular 250 pb. As amostras (45µl) foram armazenadas a -20°C até a utilização.

Os iniciadores usados nas reações de mutação previamente desenhados, conforme estudos dos códons para a toxina nativa, bem como dos códons mais frequentemente usados em *E. coli*, estão representados nas Tabelas 3-7.

Tabela 3: Iniciadores para a Mutação PnTx2-6/PnTx2-5 Tyr₃₅-Asn₃₅

Iniciador	Sequência	Produto
Fw 1	5'TGCATTTGCAGGCAAGGCAACTTTTGGATAGC3'	
Rv 1	5'GCCTTGCCTGCAAATGCAAGGTCCTCCG3'	5998 pb

Tabela 4: Iniciadores para a Mutação PnTx2-6/PnTx2-5 Trp₃₇- Leu₃₇

Iniciador	Sequência	Produto
Fw 2	5'TGCAGGCAAGGCTACTTTTTGATAGCATGGTA3'	
Rv 2	5'AAAGTAGCCTTGCCTGCAAATGCAAGGTC3'	5998 pb

Tabela 5: Iniciadores para a Mutação PnTx2-6/Alanina Tyr₃₅-Ala₃₅

Iniciador	Sequência	Produto
Fw 4	5'TGCATTTGCAGGCAAGGCGCCTTTTGGATAGC3'	
Rv 4=Rv1	5'GCCTTGCCTGCAAATGCAAGGTCCTCCG 3'	5998 pb

Tabela 6: Iniciadores para a Mutação PnTx2-6/Alanina Trp₃₇- Ala₃₇

Iniciador	Sequência	Produto
Fw 5	5'TGCAGGCAAGGCTACTTTGCGATAGCATGGTA3'	
Rv 5=Rv2	5'AAAGTAGCCTTGCCTGCAAATGCAAGGTC 3'	5998 pb

Tabela 7: Iniciadores para a Mutação PnTx2-6/Alanina Tyr₃₅-Ala₃₅ e Trp₃₇- Ala₃₇

Iniciador	Sequência	Produto
Fw 6	5'TGCATTTGCAGGCAAGGCGCCTTTGCGATAGCATGGTA3'	
Rv 6=Rv1	5'GCCTTGCCTGCAAATGCAAGGTCCTCCG3'	5998 pb

No controle da reação de mutação usou-se um plasmídeo (3,4 Kb) contendo o gene *LacZα*, cujo tipo selvagem produz colônias azuis nas placas de LB/Agar/Amp/X-Gal (400 µg/ ml de X-Gal, 100 µg/ ml de ampicilina). Iniciadores controle também foram usados, esses continham duas substituições de bases, a primeira introduzia um sítio de restrição *Hind* III e outra um códon de parada dentro do gene *LacZα*, gerando uma proteína *LacZα* truncada (colônias brancas).

Após a reação de metilação do plasmídeo controle (ver item 4.2.2.22.1), a reação de mutação controle foi realizada usando-se os iniciadores controles (tab. 8). O produto dessa reação foi transformado em células quimiocompetentes e inoculado nas placas LB-ágar-X-Gal. As colônias azuis e brancas foram contadas. Eficiência esperada: ≥80%.

Tabela 8: Iniciadores controle da reação de mutação

Iniciador	Sequência
Fw	5'GACCATGATTACGCCAAGCTTATAAATTAACCCT3'
Rv	5'AGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTT3'

4.2.2.2.3. Transformação do plasmídeo recombinante mutado em células *E. coli* da linhagem DH5 α TMT1^R

Células de *E. coli* da linhagem DH5 α TMT1^R foram quimicamente preparadas para transformação segundo o protocolo descrito no item 4.2.2.11.

Os produtos da PCR (2 μ l), dos plasmídeos mutantes foram incubados com 50 μ l de células quimiocompetentes DH5 α TMT1^R, por 10 min. a 4°C. As misturas foram mantidas por 30 seg a 42°C e a 4°C por 1 min. Às células adicionaram-se 200 μ l de meio 2xTy pré-aquecido (37 °C), e estas foram incubadas, sob agitação constante (225 g) a 37 °C durante 1 h. O cultivo (125 μ l) foi inoculado em placas de LB-ágar suplementada com ampicilina (100 μ g/ml) e as placas incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 16 h. Em seguida, as colônias foram analisadas, quanto à presença do plasmídeo recombinante mutado, em gel de agarose 1% (m/v).

Para testar a eficiência das células competentes de *E. coli* da linhagem DH5 α TMT1^R, estas (50 μ l) foram transformadas com o plasmídeo pUC 19 (50 pg). A mistura foi incubada a 4 °C por 30 min e em seguida por 30 seg a 37 °C e novamente a 4 °C. À mistura acrescentaram-se 250 μ l de meio 2xTy pré-aquecido (37°C) e esta foi incubada a 37°C com agitação constante (225 g) por 1 h. Após diluição (1: 100) as células foram inoculadas (30 μ l) em placas de LB-ágar-Amp (100 μ g/ ml) e incubadas a 37°C por 16 h. As colônias foram contadas e o cálculo da eficiência da transformação obtido de acordo com a fórmula:

$$\frac{\text{\# de colônias}}{\text{DNA transfor. (50 pg)}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{300 \mu\text{l do vol. Total da transformação}}{30 \mu\text{l plaqueados}} \times 100 = \frac{\text{\# transformante}}{\text{DNA plasm. (\mu g)}}$$

Eficiência de transformação esperada: $\geq 1 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia/ μ g (ufc/ μ g) de plasmídeo super enovelado (“supercoiled”) – pUC 19.

Os protocolos para a clonagem dos plasmídeos recombinantes mutantes foram os mesmos utilizados para o DNA plasmídico recombinante.

4.2.22.4. Seleção dos clones mutantes

Os clones mutantes foram selecionados por análises de sequenciamento como descrito no item 4.2.2.15 e os protocolos de clonagem do DNA plasmideal mutante e expressão das proteínas recombinantes mutantes foram os mesmos utilizados para o DNA e proteína recombinante, descritos anteriormente.

Métodos – Parte 3

4.2.2.23. Avaliação da atividade biológica por medida da ereção peniana

O procedimento para a determinação da ereção peniana foi a medida da pressão intracavernosa, segundo Mills, Stopper, Wiedmeier (1994) adaptado por Nunes, 2008, Nunes et al. (2008)- Figura 13 (A-E). Os animais foram anestesiados com uretana (1400mg/Kg, intraperitoneal) e colocados sobre uma manta térmica para que a temperatura corporal fosse mantida a 37°C (Fig 13 B e C). Posteriormente, a artéria femoral foi canulada com um tubo de polietileno, contendo salina heparinizada (9:1 ml), para uma contínua monitoração da pressão arterial média (PAM) e o catéter foi conectado a um transdutor de pressão (Fig. 13 A, B e C).

Para monitorar continuamente a PIC, a pele e a túnica albugínea que recobrem o corpo cavernoso foram removidos e uma agulha fina (calibre 23) foi inserida no corpo cavernoso esquerdo (Fig. 13 A e B), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Fig 13 E), por meio de uma cânula de polietileno com salina heparinizada.

O gânglio pélvico maior (GPM) do animal foi exposto através de uma incisão mediana suprapubiana no abdome e a ereção peniana obtida a partir de estímulos elétricos por um eletrodo bipolar de prata no GPM (Fig. 13 A, B, C e D), o que produziu alterações na pressão intracavernosa (PIC), que foram registradas. Os efeitos da estimulação ganglionar sobre a razão PIC/PAM foram avaliados em diferentes voltagens (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,2; 1,5; 2,0; 2,5 V). Cada pulso teve a

duração de 5 ms e uma frequência de 12 Hz. O tempo de 1 min. foi aguardado entre um estímulo e outro.

A toxina recombinante foi administrada por via subcutânea. Após a administração aguardou-se o tempo necessário (20 min.) antes que a segunda sequência estimulatória fosse iniciada. Os dados foram apresentados como relação entre PIC/PAM e a diferença de potencial utilizada para estimular o gânglio pélvico maior, de acordo com a sequência proposta (Fig 14).

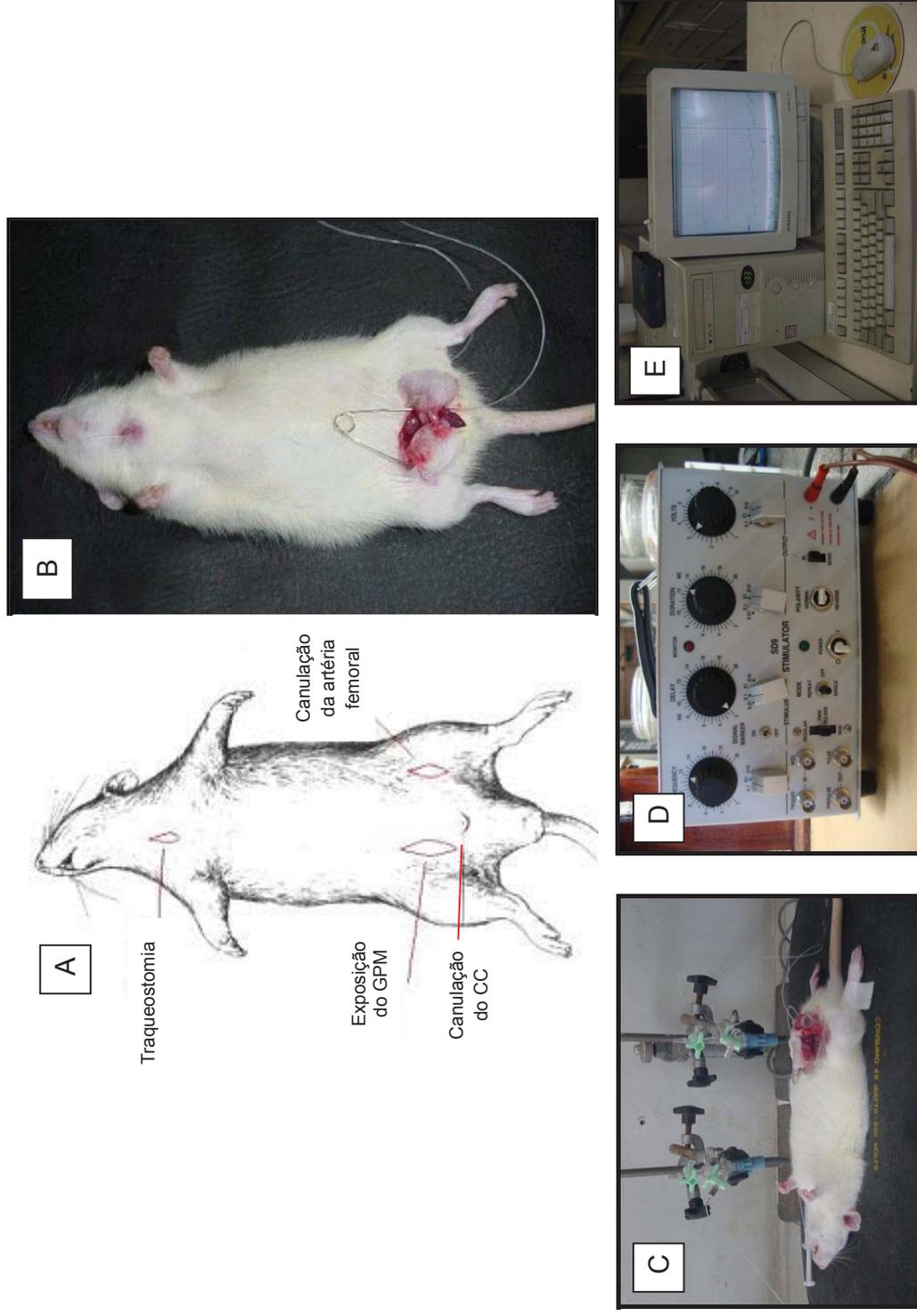


Figura 13: Representações do método cirúrgico e dos aparelhos utilizados na indução/registro da ereção peniana em ratos normais. **A e B)** Representação esquemática dos passos cirúrgicos (cannulação de artéria femoral, exposição do GPM e cannulação do corpo cavernoso). **C)** Rato após cirurgia preparado para estimulação do GPM e administração de drogas. **D)** Estimulador elétrico. **E)** Sistema de aquisição de dados.

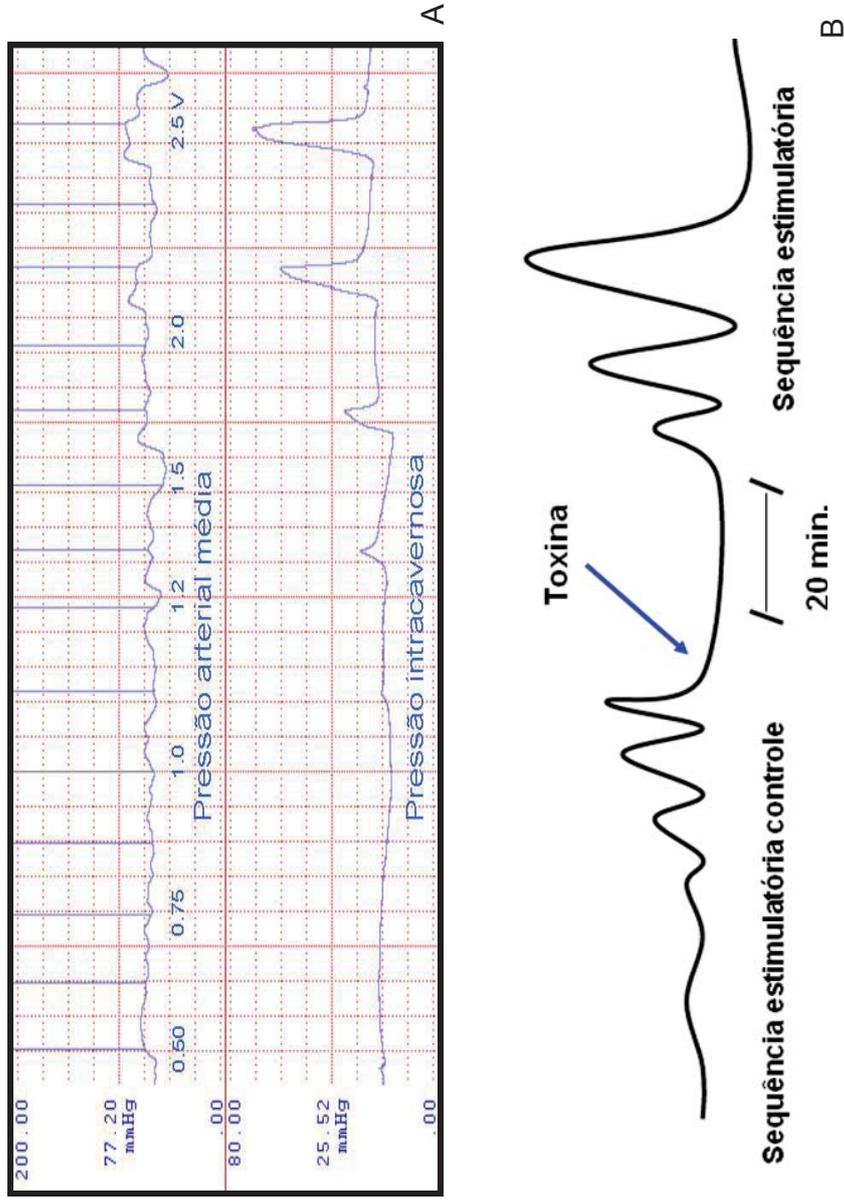


Figura 14: Avaliação da função erétil. **A)** Registros da pressão arterial média e pressão intracaverosa. **B)** Protocolo esquemático realizado para a investigação dos efeitos toxina recombinante na função erétil de ratos pela razão PIC/PAM.

Métodos – Parte 4

4.2.2.24. Liberação de L-glutamato em sinaptosomas

4.2.2.24.1. Obtenção de sinaptosomas

Ratos adultos (200-300g) foram decaptados, os cérebros rapidamente removidos, imersos em solução de homogeneização (sacarose 0,32 M, EDTA 1 mM e Dithiotreitol 0,25 mM, pH=7,4 com NaOH 0,1 M) e mantidos no gelo, em seguida foram utilizados no preparo dos sinaptosomas, como previamente descrito por Dunkley et al. (1988).

Cada hemisfério cerebral foi separado sobre papel filtro, umedecido com solução de homogeneização e mantidos em banho de gelo. Os hemisférios foram dissecados até a completa retirada da substância branca, hipocampo e cerebelo, mantendo-se apenas o córtex. Os córtex foram colocados em um tubo (Thomas Company- B19982) contendo 5 ml de solução de homogeneização. Eles foram então homogeneizados a 4°C em movimentos “up and down” por quatro vezes (homogeneizador Potter-Elvehjem) com intervalos de 2 min. entre cada uma para evitar aquecimento.

A suspensão de extrato do córtex cerebral foi centrifugada (Centrífuga Hitachi - Himac CR21GII, Rotor R20A2) a 4°C, 3000 g (1080 x g), por 10 min. O sobrenadante coletado e colocado em tubos contendo um gradiente descontínuo de Percoll (Sigma-EUA) na ordem decrescente de 23%, 15%, 10% e 3% (v/v). Após o gradiente foi centrifugado (Hitachi - Himac CR21GII, Rotor R20A2) a 4°C, 39000 g durante 15 min. Posteriormente, retirou-se cuidadosamente, as frações 3 e 4, que continham sinaptosomas e membranas e apenas sinaptosoma, respectivamente; colocando-as em tubos de centrifuga (SORVALL Tube, PP- F, 50 ml), sendo então lavadas com um volume final de 45 ml de KRH

Os sinaptosomas foram coletados (sedimento branco), ressuspensos em 1200 µl de solução de Krebs- Ringer- Hepes (KRH NaCl 0,124 M, KCl 4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, Hepes 25 mM, Glicose 10 mM pH 7,4 com NaOH 5 M), homogeneizados e centrifugados (Hettich MIKRO 200 R) durante 30 seg. a 9 500 g, a 4°C. As soluções contendo os sinaptosomas tiveram a sua quantidade de proteínas determinada pelo método descrito no item 4.2.2.17.

4.2.2.24.2. Controle da integridade sinaptosomal por dosagem da atividade da enzima Lactato Desidrogenase

A dosagem da atividade da enzima citosólica, lactato desidrogenase foi feita segundo Kubowitz; Ott (1943). Essa enzima é considerada um marcador citoplasmático, encontrada no meio extracelular, apenas após a lise da membrana plasmática. A enzima lactato desidrogenase (LDH) catalisa a redução do piruvato em lactato, de acordo com a reação da fig. 15:

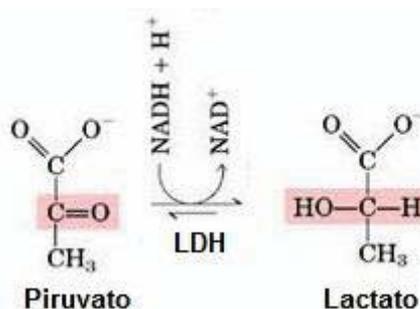


Figura 15: Reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase. A enzima lactato desidrogenase (LDH) catalisa a reação de redução do piruvato à lactato, utilizando o NADH como o agente oxidante.

As seguintes soluções foram preparadas antes da reação. A solução A: contendo 50 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e a solução B: 50 mM de Na_2HPO_4 . A solução B teve o seu pH acertado para 7,4 com a solução A. Preparou-se, imediatamente antes do uso, uma solução de NADH (6,3 mM)

A reação da LDH foi acompanhada por leitura das absorvâncias a um comprimento de onda de 365 nm em espectrofotômetro (Fluorímetro Synergy 2 Biotek) considerando-se que o NADH adicionado ao meio pode ser convertido a NAD^+ e medida que esse se forma ocorre uma diminuição da absorvância. Como controle usou-se 1% de Triton X 100, q.s.p 300 μl , que é um agente que desfaz a integridade da membrana plasmática, causando o rompimento celular e liberação de todo com conteúdo citoplasmático.

O protocolo da reação está apresentado na tab. 10:

Tabela 09: Protocolo da reação da lactato desidrogenase

Tempo (min.)	Substância (µl)	Observação
1	260 µl de tampão fosfato 50mM pH=7,4, com 0,6 mM de piruvato de sódio	37°C, aguarda-se a estabilização
1	10 µl NADH 0,063 mM	
1	30 µl da solução de sinaptosomas	
60	2 x 10 ⁻⁸ M Toxinas e mutantes	Intervalo: 14 seg.entre as leituras

4.2.2.24.3. Liberação de L-glutamato

Da solução obtida no item anterior, contendo os sinaptosomas, foi preparada uma mistura contendo: 10% de solução de sinaptosoma, NADP 1mM (concentração final), BSA 0,1% e KRH com 1mM de CaCl₂ até um volume final de 300 µl. A liberação de L-glutamato foi analisada conforme proposto por Nicholls et al. (1987).

A liberação de L-glutamato foi determinada pelo método fluorimétrico (Fluorímetro Synergy 2 Biotek), considerando-se a reação de oxidação do L-glutamato pela enzima glutamato desidrogenase (GDH), em que o NADP⁺ adicionado ao meio pode ser convertido a NADPH. Este composto, quando excitado a 340/11 nm, emite uma fluorescência que é quantificada e detectada no comprimento de onda 440 nm (KYTAYAMA, SUGUMURA, 2001).

Usou-se um detector espectrofluorimétrico (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader- Biotek- EUA), controlado pelo Software BioTek Gen5™ Reader Control & Data Analysis Software (Biotek- EUA). Os resultados foram normalizados e se considera como controle negativo a mínima liberação de L-glutamato. Como controle positivo usou-se uma solução de KCl (33mM), agente despolarizador da membrana celular, que desencadeia a liberação máxima deste neurotransmissor.

Para os experimentos de liberação de L-glutamato, seguiu-se o protocolo apresentado na tabela 9:

Tabela 10: Protocolo de liberação de L-glutamato

Tempo (min.)	Substância (μ l)	Observação
1	Solução de sinaptosoma 10% em NADP 1mM, BSA 0,1% e KRH com 1mM de CaCl_2	37°C, aguarda-se a estabilização
10	4,5 U GDH	
30	Toxinas e mutantes	Intervalo: 14 seg.entre as leituras

4.2.2.25. Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em dias independentes, em triplicatas. Os resultados foram obtidos por análise de variância utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Os resultados da avaliação biológica por medida da ereção peniana foram analisados por dupla variância seguida de teste de Bonferroni. Os resultados de determinação da liberação do conteúdo de L-glutamato foram analisados por simples variância. Consideraram-se como diferenças estatísticas entre os grupos valores de $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Como visto, o envenenamento pela peçonha da aranha *P. nigriventer* pode causar priapismo, sugere-se que pelo menos duas de suas toxinas, PnTx2-5 e PnTx2-6, sejam as responsáveis por esta atividade tóxica. Estas toxinas apresentam 89% de similaridade em suas sequências de aminoácidos e estimulam o relaxamento de músculos lisos de corpos cavernosos de coelhos, ratos e camundongos induzindo, desta forma, ereção peniana (REGO et al., 1996, YONAMINE, TRONCONE, CAMILLO, 2004; ANDRADE et al., 2008; VILLANOVA et al., 2009; NUNES et al., 2008, 2009, 2010a, 2011 a; b).

O uso destas moléculas em ensaios experimentais é limitado, devido à pequena quantidade de peçonha produzida pelas aranhas, dificuldades em coletá-las no campo, e de reprodução e manutenção em condições de cativeiro. Além disto, ocorrem perdas materiais durante o processo de purificação destes peptídeos. Desta forma, numa tentativa de diminuir estes empecilhos, neste trabalho isolou-se e clonou-se o cDNA que codifica a toxina madura PnTx2-6, expressando-a em *Escherichia coli*, visando-se obter maiores quantidade de toxina para viabilizar os testes de investigação do seu modo de ação. A proteína recombinante foi denominada rPnTx2-6. Produziu-se também, mutantes desta toxina visando um maior entendimento da estrutura e função desta molécula.

Embora algumas toxinas possam ser sintetizadas quimicamente, a produção de peptídeos por meio de técnicas de DNA recombinante permite contornar vários problemas encontrados na síntese química, como por exemplo, a limitação no número de resíduos do peptídeo alvo, a formação de agregados de aminoácidos hidrofóbicos, a complexidade na incorporação à proteína crescente de alguns resíduos de aminoácidos como metionina, triptofano e cisteína (KULIOPOLUS, WALSH, 1994; DOBELI et al., 1998; CASTILHO, 2004

Para viabilizar a produção de proteínas recombinantes, vários critérios são essenciais como: a facilidade na manipulação da célula hospedeira a ser transformada ou transfectada com o vetor recombinante, a estabilidade e solubilidade da proteína, assim como a velocidade e o rendimento da purificação (WILLIAMSON et al., 2000). A escolha do hospedeiro para a produção de proteínas

em organismos heterólogos depende, principalmente, das propriedades e do destino final da proteína expressa (JONASSON et al., 2002).

A bactéria gram negativa *E. coli* é o microorganismo mais usado na expressão heteróloga de proteínas. Dentre os motivos para isto estão: o seu rápido crescimento, a necessidade de um meio de cultivo simples e de baixo custo e a expressão em linhagens bem caracterizadas e estabelecidas (REDDI; BHATTACHARYA; KUMAR, 2002). Segundo Carey (1996), *E. coli* é capaz de produzir proteínas em níveis tão altos quanto de 10 a 40% de sua massa celular total.

Neste trabalho, a expressão heteróloga da proteína PnTx2-6 foi realizada neste microorganismo. Para isto, isolou-se o RNA total da glândula venenifera da aranha *Phoneutria nigriventer* (90 µg- fig. 16). Ao se observar a figura 16 verifica-se que a banda referente ao RNA ribossômico 28s parece estar ausente no RNA isolado. Isto ocorre, pois o mecanismo de transcrição do rRNA de *Phoneutria nigriventer* é similar ao descrito para alguns insetos (SHINE; DALGARNO, 1973), no qual o precursor do rRNA é clivado nos produtos 18s, 5,8s e 28s. Posteriormente, o rRNA 28s tem uma clivagem adicional em duas subunidades, denominadas 28s α e 28s β , com tamanhos moleculares aproximadamente iguais ao da subunidade 18 s (indicada pela seta na fig. 16).

A transcrição do mRNA, isolado da glândula venenifera, para o cDNA foi feita a partir de 4 µg de RNA total. O mRNA não foi anteriormente purificado, pois a técnica de RT-PCR utilizada, disponibilizava oligo (dT) que hibridizavam com a cauda 3' poli (A) do mRNA. Esta cauda é encontrada na grande maioria de mRNAs de eucariotos, e esses constituem cerca de 1-2% do RNA total.

A primeira fita do DNA complementar foi obtida através da reação enzimática da transcriptase reversa (RT). Amplificações posteriores do cDNA de fita simples, por PCR, usando-se iniciadores específicos (tab. 1) para o cDNA da toxina PnTx2-6 permitiram a obtenção do cDNA de fita dupla, denominado também de cDNA PnTx2-6. Esta PCR possibilitou a inserção neste cDNA, de sítios de clivagens para as enzimas de restrição 5' *Nco*1 e 3' *Xho*1 e apresentou um produto de tamanho molecular de 176 pb, que se refere ao cDNA que codifica a toxina madura PnTx 2-6 (fig. 17). Para a clonagem posterior do cDNA da toxina no vetor de expressão

pET32c (+) utilizou estas duas endonucleases de restrição (fig. 18 e 19) e a enzima T4 DNA ligase.

O vetor de expressão, escolhido neste trabalho pET, ao contrário dos sistemas baseados em promotores de *E. coli* (por exemplo, lac, tac, P_L), utiliza o promotor T7 para direcionar a expressão dos genes alvo. A RNA polimerase da *E. coli* não reconhece este promotor T7, desta forma não há praticamente nenhuma transcrição do gene alvo, na ausência de uma fonte de T7 RNA polimerase e a etapa de clonagem é assim efetivamente separada da etapa de expressão (Manual do pET, 10^a Ed.- Novagen).

Estas técnicas de DNA recombinante, usadas para obter e associar genes, tem permitido a expressão de quantidade relevantes de proteínas (LA VALLIE, MCCOY, 1995; RAI, PADH, 2001; JONASSON et al., 2002). Porém, em se tratando de peptídeos, isso nem sempre acontece, visto que um dos problemas em expressá-los em *E. coli* é a susceptibilidade destes à proteólise por enzimas do citoplasma bacteriano (MURBY; UHLEN; STAHL, 1996). Uma das estratégias para sanar este problema é produzir os peptídeos fusionados a uma proteína carreadora, que neste trabalho, foi a tiorredoxina (Trx). Esta proteína pode mascarar as propriedades físicas do peptídeo e, em alguns casos, facilitar a purificação da proteína de fusão (UHLEN et al., 1992, STAHL et al., 1999).

Seguindo-se a clonagem do cDNA codificador da PnTx2-6 no vetor pET32c(+), o produto agora denominado pET32c (+)- PnTx2-6 foi transformado em duas linhagens de *E. coli*: DH5 α e BL21(DE3)pLysS. Para o propósito de propagação plasmidial, células quimiocompetentes DH5 α , foram transformadas com o vetor recombinante pET32c (+)- PnTx2-6. A verificação dos clones recombinantes foi feita por PCR, usando-se os iniciadores que anelavam nas extremidades do cDNA codificador da PnTx2-6, denominados PnTx2-6 Fw e Rv (Tab. 1) e os iniciadores que anelavam na região do cDNA flanqueado por porções do vetor de expressão, denominados S-Tag e T7 terminator (Tab. 2). Todos os clones testados, após análises da PCR por gel de agarose (figs. 21 e 22), apresentaram bandas (176 e 300 pb, respectivamente, para o cDNA e para a região deste flanqueado pelo vetor) que indicavam que o inserto foi clonado no vetor de expressão. O vetor contendo o inserto possui 5998 pb, como ilustrado na fig. 20.

O sequenciamento, posterior, do vetor recombinante pET32c (+)- PnTx2-6 revelou que este estava com a janela aberta de leitura correta e não houve diferenças entre as sequências do cDNA clonado e aquela descrita para a região codificante da toxina madura (tab.13 -fig 23). Desta forma, Células da linhagem BL21(DE3)pLysS foram transformadas visando-se a expressão da proteína de fusão recombinante. Após esta transformação, a presença do DNA recombinante também foi confirmada por PCR (fig. 24).

A toxina PnTx2-6 foi então expressa em fusão com a tiorredoxina (Trx) e com uma sequência de 6 histidinas, esta estrutura foi denominada proteína de fusão PnTx2-6 ou rTrx-PnTx2-6. A proteína de fusão expressa apresentou-se na forma solúvel no citoplasma de *E. coli* com $MM_{calc} \sim 22,5$ KDa, sendo visualizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (v/v) na faixa entre 20-25 kDa, quando comparada ao padrão de massa molecular (fig. 25- coluna 2).

A expressão em *E. coli* frequentemente gera proteínas na forma insolúvel, aglomeradas nos chamados corpos de inclusão, isto ocorre pelo fato de que os níveis de expressão de uma proteína heteróloga são bem maiores do que a sua expressão nativa, sendo desta forma frequente a ocorrência de um *pool* de proteínas mal enoveladas que podem se agregar (REDDI; BHATTACHARYA; KUMAR, 2002). Entretanto, existem várias formas de minimizar-se a formação destes corpos de inclusão em *E. coli* como, a redução da velocidade de síntese protéica, que pode ser obtida usando-se baixas temperaturas para o crescimento bacteriano e a co-expressão com foldases. Outra estratégia adotada é fusionar a proteína alvo a um parceiro altamente solúvel como Trx, CaBP, GST (LA VALLIE et al., 1995), MBP, Nus A, CAP (SHIH et al., 2002).

A produção de proteínas na forma solúvel no citoplasma é vantajosa por não necessitar de passos adicionais de solubilização e reenovelamento. Entretanto, estes processos não garantem que as características físicas e funcionais da proteína reenovelada sejam as mesmas da proteína nativa. Além disso, o custo do sistema de produção é encarecido e o rendimento pode ser insatisfatório (JONASSON et al., 2002).

A estratégia de fusionar a proteína recombinante à proteína Trx foi adotada visando à expressão da proteína na forma solúvel. É interessante destacar que diversos trabalhos (SKOSYREV et al., 2003; SACHDEV, CHIRGWIN, 1998;

JAYAKUMAR et al., 1996; SHIH et al., 2002; FRORATH et al., 1992; HAMMARSTRON et al., 2002, CASTILHO, 2004) mostram que cada proteína ou peptídeo comporta-se diferentemente ao ser associada à uma determinada proteína carreadora, desta forma, a expressão de quaisquer outras proteínas fusionadas à Trx não garantem a solubilidade destas moléculas.

Em análises posteriores, o sobrenadante, contendo a proteína de fusão recombinante foi submetido a dois passos de purificação: cromatografia de afinidade contendo níquel imobilizado e cromatografia de gel filtração. No primeiro passo cromatográfico (fig. 26) a proteína de fusão recombinante eluiu no gradiente entre 9% e 65% da tampão de eluição (B). Esta fração foi separada em três regiões que foram analisadas em gel de poliacrilamida e apenas a terceira região, denominada rTrx-PnTx2-6 apresentou a proteína de fusão recombinante com maior grau de pureza.

Embora a fração rTrx-PnTx2-6 tenha eluído da cromatografia de afinidade com alguns contaminantes, a natureza destes contaminantes não foi investigada. Entretanto acredita-se que o fato desta eluição ter ocorrido com um gradiente linear do tampão de eluição pode-se sugerir que esses contaminantes representem produtos de degradação da proteína de fusão, ou uma terminação precoce da tradução do cDNA, formando proteínas truncadas.

Seguindo-se a cromatografia de afinidade, realizou-se uma cromatografia de gel filtração. Esta permitiu melhorar o grau de pureza (ver eletroforese fig. 27-coluna 3) e a troca de tampão, passo importante pois o imidazol presente no tampão de eluição é considerado um inibidor da enzima enteroquinase usada na clivagem da proteína de fusão.

Após estes dois passos cromatográficos, a concentração protéica foi de 2 mg/ml (tab. 14). A clivagem da proteína de fusão foi então realizada, com a enzima enteroquinase (Ek). Neste trabalho, utilizou-se uma Ek recombinante, que consiste da subunidade catalítica da holoenzima, expressa em *Pichia pastoris*, de massa molecular 26,3 KDa (LA VALLIE et al., 1995).

Uma desvantagem da expressão da rTrx-PnTx2-6 é o fato de sua proteína de fusão representar a maior parte da massa total. Sendo assim, há necessidade do uso de uma protease para a liberação da PnTx2-6 recombinante. O uso da enteroquinase foi problemático e se tornou um fator limitante na obtenção da

rPnTx2-6 já que após a clivagem, a recuperação da toxina recombinante foi baixa. Além disto, esta a Ek, é uma protease de custo elevado aumentando os custos de produção da proteína recombinante.

Depois de inúmeros ensaios enzimáticos variando-se a quantidade de enzima, o tempo e a temperatura de incubação, o tempo de clivagem foi estabelecido em 16 h a 22°C, utilizando-se a relação de 1,0 U de enzima para 0,155 mg de proteína de fusão, estando a solução protéica a 1,2 mg/ml.

Devido a precipitação da proteína de fusão no tampão recomendado pelo fabricante para a digestão com Ek, foi necessário também, alterar a concentração de NaCl na solução protéica. A quantidade máxima de sal utilizada, sem que houvesse interferência na atividade enzimática, foi de 0,05 M de NaCl. Concentrações superiores a esta inativaram a Ek. A solução protéica (1,2 mg/mL de Milli Q/TFA 0,1%) usada nos testes posteriores foi tamponada com 50 mM Tris-HCL pH=8,0, contendo 0,05 M NaCl, 10 mM CaCl₂, e 0,1 % de Tween 20 (v/v). A reação foi incubada a 22°C por 16 h.

Vários fatores podem afetar a especificidade da clivagem, assim como a estabilidade da proteína alvo, como a temperatura e a duração em que se dá a reação (JENNY; MANN; LUBLAD, 2003). Verificou-se que clivagens por longos períodos (acima de 18h) e com altas concentrações de enzima (acima de 0,5 U/ µg de proteína de fusão) parecem ter causado a clivagem em sítios não específicos na sequência protéica, dando origem a produtos que não eram a proteína recombinante de interesse, quando analisados por espectrometria de massas. Outro aspecto a ser considerado nas reações de clivagem da proteína de fusão é a escolha do tampão em que a reação ocorrerá, considerando-se cuidadosamente, o pH e a força iônica.

Os produtos da clivagem com a enzima Ek foram submetidos à purificação em cromatografia de fase reversa (fig. 28). A toxina rPnTx2-6 eluiu com 30,9% de acetonitrila/ TFA 0,1%. Após a purificação da toxina recombinante PnTx2-6, análises por espectrometria de massas evidenciaram a presença de apenas uma espécie molecular de 5486, 29 Da (fig. 29), que é semelhante à massa calculada 5486, 24 Da. As análises por espectrometria de massas sugerem que as cisteínas presentes na proteína rPnTx2-6 estão oxidadas, já que não se observou nenhum acréscimo de massas além daquele esperado devido aos aminoácidos excedentes no seu N-terminal, em comparação com a toxina nativa.

A toxina recombinante foi testada quanto a sua ação na função erétil de ratos controle normotensos anestesiados. A curva (fig. 30 e 51A) da relação de PIC/PAM em relação à voltagem apresentou valores maiores da razão PIC/PAM, após a injeção subcutânea (12µg/Kg) da toxina recombinante, em relação à curva controle obtida antes da injeção da toxina. Este resultado indica que a toxina recombinante potencia a ereção após estimulação gangliônica, uma ação semelhante àquela encontrada para a toxina nativa (Nunes et al.2008), o que pode ser observado na Fig. 51B.

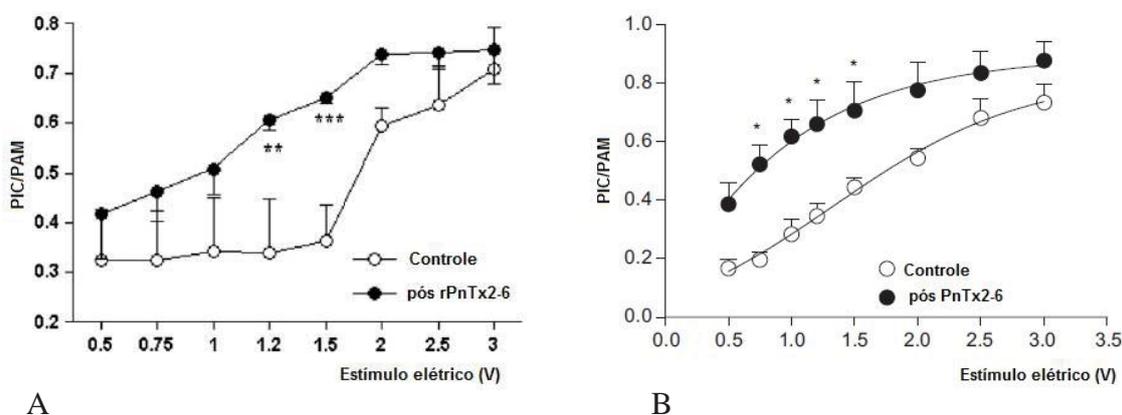


Figura 51: Comparação dos resultados de indução de ereção peniana por estimulação gangliônica em ratos controle normotensos antes e após injeção subcutânea da rPnTx2-6 (A) e da PnTx2-6 nativa (B). Estímulos elétricos (0,5-3 V) induziram aumento na razão PIC/PAM (A n= 3 e B n=6) que foi potenciada nos animais injetados (sc) com rPnTx2-6 (12µg/Kg) e PnTx2-6 nativa (12µg/Kg). ** p < 0,01 e *** p < 0,001 (Two way Anova, seguido de Teste Bonferroni). O gráfico B para fins comparativos foi retirado de Nunes et al, 2008. Sc = injeção sub cutânea

Matavel (2004), Matavel e colaboradores (2009) compararam a estrutura e as propriedades eletrofisiológicas das toxinas PnTx2-6 e PnTx2-5, da peçonha de *P. nigriventer*. Estas duas toxinas apresentam o mesmo número de resíduos de aminoácidos, com apenas 5 destes sendo diferentes. Essa diferença em suas sequências deve possivelmente, explicar suas diferentes propriedades de ligação no canal para sódio (MATAVEL et al., 2009). Matavel e colaboradores (2009) observaram também, que as duas toxinas modificam as correntes para sódio de maneira similar, atrasando a cinética de inativação e gerando uma corrente persistente após pulso de 20 ms, o que os levaram a inferir que esta diminuição na velocidade de inativação é o que determina a excitabilidade e pode causar os

sintomas do envenenamento por *P. nigriventer*. Estes efeitos, no canal para sódio, foram similares aos descritos para AaHII, toxina de *Androctonus australis* Hector (ROCHAT et al., 1972; FONTECILLA-CAMPS, HABERSETZER-ROCHAT, ROCHAT, 1998; para revisão ver POSSANI et al., 1999) e BmKMI toxina de *Buthus martensii* Karsch (Ji et al., 1996; POSSANI et al., 1999); ambas α toxinas de escorpião que se ligam ao sítio 3 de canais para sódio. Resultados obtidos por Matavel (2004), em experimentos com sinaptosomas cerebrais de ratos, mostraram ainda que a PnTx2-6 desloca apenas 31% da toxina AaHII, uma alfa toxina da peçonha do escorpião africano (*Androctonus australis* Hector). A partir destes resultados, a autora sugeriu que PnTx2-6 liga-se ao macrosítio 3 do canal para sódio, o qual possuiria alguns resíduos de aminoácidos que também se ligam a AaHII, mas por ligações distintas, não havendo, então, uma sobreposição exata dos sítios destas toxinas. Outra possibilidade proposta para o deslocamento parcial da toxina AaHII, é que a PnTx2-6 não modifique, ou modifique com diferentes afinidades, todas as isoformas dos canais para sódio das preparações utilizadas, e, finalmente, a autora propõe que as duas toxinas possuam diferentes sítios no canal para sódio. Sugere-se ainda, a possibilidade de que a ligação de PnTx2-6 cause uma alteração alostérica modificando a ligação da AaHII. Estas três possibilidades não chegaram a ser comprovadas, já que a autora não expressou as isoformas do canal para sódio para os referidos testes com a toxina.

A estrutura tridimensional provável das toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6, foi proposta após análises por bioinformática e estudos de modelagem molecular (MATAVEL et al., 2009) comparando-se as sequências de ambas as toxinas com as de outras 11 toxinas ricas em cisteínas. Após estas análises, os autores propuseram que ambas as toxinas isoladas da peçonha de *P. nigriventer*, têm três folhas β antiparalelas formadas pelos resíduos de aminoácidos: Gln₈-Cys₁₀, Gly₂₁-Cys₂₅, Cys₂₉-Gln₃₃ e uma pequena α -hélice nas posições 35 (Asn na PnTx2-5 e Tyr na PnTx2-6) a 39 (Ala em ambas as toxinas) e que o coro hidrofóbico proposto para as toxinas PnTx2-6 e PnTx2-5, são formados pelas sequências ₃₅YFWIAWY₄₁ e ₃₅NFLIAWY₄₁, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos por Matavel et al (2009), com a proposta da estrutura destas duas toxinas; estudos dos códons mais frequentemente utilizados pela *E. coli* (MALOY, STEWART, TAYLOR, 1996) na tradução de determinados

resíduos de aminoácidos, como também da análise dos códons no DNA do cDNA codificador das toxinas maduras PnTx2-5 e PnTx2-6 (tab. 21); permitiu que estratégias fossem desenvolvidas para a inserção de mutações sítio-dirigidas na região codificante da toxina recombinante PnTx2-6, gerando após a expressão proteínas mutantes.

Tabela 21: Diferenças nos aminoácidos e alguns códons usados na tradução do DNA e expressão das toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 na glândula da aranha *Phoneutria nigriventer*

Posição do AA	PnTx2-5 (AA-códon)	PnTx2-6 (AA-códon)
AA ₉	Treonina (AAC)	Prolina (CCC)
AA ₁₂	Valina (GTA)	Glutamato (GAA)
AA ₃₅	Asparagina (AAC)	Tirosina (TAC)
AA ₃₇	Leucina (TTG)	Triptofano (TGG)
AA ₄₅	Serina (AGC)	Asparagina (AAC)

Baseada em Matavel (2004), com referências de Matavel et al., 2002 e Penaforte (2000)

Nos experimentos de mutação sítio dirigida, modificaram-se, *in vitro*, algumas bases nitrogenadas no cDNA da toxina PnTx2-6, clonado no vetor de expressão pET32c(+). Estas mutações foram as responsáveis pelas modificações, após a expressão das proteínas, dos resíduos de aminoácidos presentes na PnTx2-6, nas posições 35 e 37, para aqueles aminoácidos presentes na toxina PnTx2-5 ou pelo aminoácido alanina.

Nas análises por gel de agarose (fig. 31-35, colunas 2), observa-se que os produtos das PCR apresentaram uma única banda acima de 5000 pb quando comparada ao padrão de tamanho molecular 250 pb, esta banda refere-se ao vetor de expressão recombinante mutante, em sua forma linear. Seguindo-se as análises dos DNAs mutantes, fez-se a transformação destes em células quimiocompetentes da linhagem DH5 α T1^R. O DNA de cada mutante foi então precipitado, purificado e posteriormente analisado em gel de agarose (fig. 31-35, colunas 3), apresentando três bandas, que se referem ao vetor recombinante mutante em sua forma circular. Cada clone mutante teve sua sequência de DNA confirmada (tab. 15 a 19) e estas corresponderam à região codificadora da toxina PnTx2-6, exceto na região da substituição dirigida das bases nitrogenadas, sugerindo que os experimentos de mutação sítio dirigidas foram satisfatórios. Após transformações subsequentes dos

clones mutantes em células *E. coli* da linhagem BL21DE3(pLysS) e confirmação das colônias recombinantes por PCR (fig. 36), as células transformantes foram usadas nos experimentos de expressão das toxinas mutantes.

Os clones obtidos até o momento foram denominados de acordo com a substituição de aminoácidos das prováveis estruturas protéicas após a indução da expressão: Y35N35 (substituição dos aminoácidos Tyr₃₅ por Asn₃₅), W37L37 (substituição Trp₃₇ por Leu₃₇), Y35A35 (substituição Tyr₃₅ por Ala₃₅), W37A37 (substituição Trp₃₇ por Ala₃₇) e Y35A35W37A37 (substituições Tyr₃₅ por Ala₃₅ e Trp₃₇ por Ala₃₇).

As proteínas mutantes foram expressas na forma de proteínas de fusão, nas mesmas condições que rTrx-PnTx2-6. A expressão de todos os mutantes foi acompanhada e confirmada por eletroforeses em géis de poliacrilamida, como ilustrado nas fig. 37-41, e as proteínas de fusão mutantes obtidas até o momento (fig 37-41 coluna 3), apresentaram uma banda evidente na faixa de massa molecular entre 20-25 KDa. As massas moleculares das proteínas de fusão mutantes foram também calculadas para a confirmação dos dados obtidos experimentalmente e apresentam coerência com as mesmas (tabela 20)

As proteínas de fusão mutantes foram purificadas usando-se os mesmos passos cromatográficos da rTrx-PnTx2-6. As cromatografias de afinidade ilustradas nas fig.42-46 foram realizadas em *steps*, diferenciando-se do gradiente linear usado na purificação da proteína de fusão recombinante. Essa mudança foi obtida após vários testes de purificação das proteínas mutantes e se fez necessária para aperfeiçoar a purificação dessas proteínas. A análise dos perfis cromatográficos demonstra que estes tem diferentes perfis de eluição a uma absorvância de 280 nm. O rendimento e a quantidade de cada proteína mutante também foram diferentes, sendo a proteína de fusão mutante Y35N35, após dosagem de proteínas, a que apresentou maior rendimento. É provável que a substituição de um aminoácido aromático e hidrofóbico (Tyr) por um aminoácido neutro e hidrofílico (Asn) tenha levado a um aumento da solubilidade da proteína de fusão no tampão utilizado no experimento, influenciando ainda em todo o entorno químico, provavelmente modificando a estrutura tridimensional da proteína de fusão.

Em contrapartida, a proteína de fusão mutante W37A37 foi a que ocorreu em menor quantidade após dosagens protéicas posteriores aos dois primeiros passos

cromatográficos. Isto se deve, provavelmente, à substituição de um aminoácido aromático e hidrofóbico, nesse caso, exposto ao solvente (Trp) (ver MATAVEL et al., 2009), por um aminoácido apolar, com cadeia lateral não cíclica e também hidrofóbico (Ala). Possivelmente isto tenha prejudicado a solubilidade da proteína de fusão, ou ainda modificado a sua estrutura tridimensional. Em outra vertente, é possível também que a modificação possa ter acarretado a produção de uma molécula tóxica para *E. coli*, resultando assim em menor expressão da mesma. É necessário considerar ainda que algumas modificações no DNA possam mudar o nível de expressão de alguns genes (SUN et al., 2003).

A expressão diferenciada de toxinas mutantes já foi observada por outros autores (ZILBERBERG et al., 1997; SUN et al., 2003). Após experimentos de mutação sítio dirigida, em uma toxina semelhante às α toxinas (do tipo “*alfa like*”), a BmKM1 (do escorpião *Buthus martensii* Karsh), observou-se que o mutante com substituição de Trp₃₈ para Gly, não era expresso. Além disto, a expressão era instável em um mutante com substituição de Tyr₅ para Gly (SUN et al., 2003).

O mutante W37L37 (fig. 43) teve a concentração protéica bastante expressiva. Acredita-se que isso ocorreu, provavelmente, porque com a substituição do triptofano, um aminoácido aromático, para uma leucina, que forma interações hidrofóbicas no interior das proteínas estabilizando as suas estruturas, o que pode ter acarretado um aumento da solubilidade da proteína de fusão mutante. Já em relação ao mutante Y35A35 (fig. 44), a substituição parece ter sido favorável para a solubilidade do produto protéico. Sendo que, neste caso, a substituição de um aminoácido com cadeia lateral cíclica (Tyr) por uma alanina, pode ter facilitado a internalização do resíduo hidrofóbico.

Estas diferenças nos perfis de purificação das proteínas recombinante e na quantidade de proteína recuperada após as cromatografias, podem ter ocorrido devido a cinco fatores prováveis: às modificações dos resíduos de aminoácidos terem acarretado a produção de proteínas tóxicas para *E. coli*, as proteínas de fusão estarem insolúveis formando corpos de inclusão, as proteínas terem se agregado formando dímeros ou trímeros, essas proteínas serem insolúveis no tampão de ligação (usado no primeiro passo cromatográfico) ou ainda, o fato de as mutações nas bases nitrogenadas do cDNA codificante da toxina madura, ter acarretado problemas de tradução desse cDNA.

Várias dificuldades foram encontradas nos experimentos de clivagem da proteína de fusão com a enzima enteroquinase. Houve precipitação, seja das moléculas recombinantes mutantes, ou mesmo da enzima Ek, no tampão de clivagem. Por isso decidiu-se fazer apenas testes de microclivagens com as proteínas de fusão mutantes e analisá-los após a purificação por colunas ziptip de fase reversa C18. Todos os mutantes foram testados, mas apenas para dois deles obtiveram-se resultados satisfatórios após análises em espectrometria de massas (fig. 47 e 48). Este processo ainda precisa ser aperfeiçoado. As massas moleculares experimentais para os mutantes Y35N35 e Y35A35W37A37 foram respectivamente, 5422,5 e 5282,9 Da. Estas massas diferem-se, apenas em poucos dáltons, das massas calculadas para cada um destes mutantes, o que provavelmente, ocorre pelo erro estatístico aceito durante a calibração do aparelho.

As proteínas de fusão mutantes foram testadas quanto à formação de corpos de inclusão, que se presentes, estariam no precipitado após, o rompimento das células por choque térmico e sonicação, com posterior centrifugação. Essas análises foram feitas por PAGE-SDS em condições desnaturantes, nas quais se utilizaram amostras do precipitado celular, bem como do sobrenadante límpido. A partir desses resultados, infere-se que a pouca quantidade, após a cromatografia de afinidade, do mutante W37A37 e a quantidade diminuída de outros mutantes, não está relacionada com a formação de corpos de inclusão, já que as proteínas de fusão recombinantes mutantes estão presentes apenas no sobrenadante límpido.

As proteínas de fusão mutantes, obtidas neste trabalho, foram testadas quanto a sua capacidade de liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos (fig. 50). Estes testes já estavam padronizado em nosso Laboratório e foram utilizados para verificar a liberação de L- glutamato pela proteína nativa PnTx2-6 (Carolina Nunes, mestrado em andamento). Assim este teste foi utilizado como padrão de controle da atividade da toxina expressa, bem como de seus mutantes.

Como controle positivo dos experimentos usou-se KCl (33mM), que por ser um agente despolarizante da membrana, causa a abertura dos canais para cálcio dependentes de voltagem, induzindo o influxo de cálcio nos sinaptosomas, que mobiliza as vesículas sinápticas, levando à liberação do neurotransmissor na fenda sináptica (SUDHOF, 1995). Verificou-se também a viabilidade dos sinaptosomas por

medida da atividade (representada em porcentagem) da enzima lactato desidrogenase (LDH). Esta enzima, se presente no meio extracelular, indica o rompimento da membrana plasmática, neste caso, dos sinaptosomas. As proteínas de fusão recombinantes e mutantes foram testados quanto à atividade LDH e todos os testes indicam que estas moléculas não afetam a integridade da membrana sinaptosomal (fig. 49).

Vários estudos mostraram que algumas das frações ou toxinas isoladas da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* atuam sobre a liberação e/ou captação de diferentes neurotransmissores (ROMANO-SILVA et al., 1993; GOMEZ et al., 1995; PRADO et al., 1996; GUATIMOSIN et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 1997; MIRANDA et al., 1998 e 2001; REIS et al., 1999; MAFRA et al., 1999; VIEIRA et al., 2003; 2005; CASTRO Jr. et al.; 2008).

A fração PhTx3 e suas toxinas, são exemplos de toxinas purificadas da peçonha de *P. nigriventer*, que alteram a liberação ou captação de alguns neurotransmissores (GOMEZ et al., 1995; Prado et al., 1996; GUATIMOSIN et al., 1997; MIRANDA et al., 1998 e 2001; REIS et al., 1999, VIEIRA et al., 2003 e 2005; PINHEIRO et al., 2006; CASTRO Jr et al., 2008). Além desta fração, aquela denominada PnTx4 e suas toxinas semi-purificadas também bloquearam a captação de L-glutamato em sinaptosomas de cérebro de rato, provavelmente, por um aumento na corrente de sódio, causando uma reversão no transportador de glutamato (MAFRA et al. 1999) Toxinas inseticidas como a PnTx4(6-1) estimulou a liberação de L-glutamato em junções neuromusculares de baratas (FIGUEIREDO et al., 1997) e retardou a inativação da corrente para Na^+ de axônio isolado de inseto, porém foi inativa em canais para sódio de mamíferos (De LIMA et al., 2002). Já a toxina PnTx4(5-5) inibiu a corrente de sódio através do receptor de glutamato NMDA (FIGUEIREDO et al., 2001, para revisão ver BORGES et al., 2009).

A fração PhTx2, foi testada quanto à sua ação na liberação de neurotransmissores. Esta fração é a que contem a toxina PnTx2-6, expressa em organismo heterólogo neste trabalho. Os estudos com esta fração demonstraram que ela aumenta a concentração de íons cálcio e sódio no interior de sinaptosomas cérebro corticais de ratos, estimulando a liberação de L-glutamato (ROMANO-SILVA et al., 1993) e acetilcolina (MOURA et al., 1998).

Os autores observaram também que a liberação de L-glutamato desencadeada por esta fração, é composta de um componente lento, provavelmente devido à reversão do transportador de L-glutamato, ação dependente de sódio; e um componente rápido, que é dependente da entrada de cálcio para o interior dos sinaptosomas. Estes efeitos foram abolidos por tetrodotoxina (TTX 5 μ M), uma toxina bloqueadora de canais para sódio (ROMANO-SILVA et al., 1993). Em recente trabalho, em andamento em nosso laboratório (Carolina Nunes, dissertação de mestrado), observou-se que a toxina PnTx2-6 também libera L- glutamato ($EC_{50}=2 \times 10^{-8}$ M), de sinaptosomas cérebro corticais de ratos, sendo esta liberação dose dependente da toxina e inibida por TTX (5 μ M). Estes experimentos sugerem ainda que a liberação seja dependente de cálcio extracelular, pois ao utilizar-se EGTA (5 μ M), um quelante deste íon, ocorreu uma diminuição na liberação de L-glutamato.

Pelo relatado até o momento, ressalta-se que a grande maioria destas moléculas ativas, presentes nas peçonhas de artrópodes, como as encontradas na peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, são neurotoxinas, que possuem variados efeitos, muitas delas agindo em canais iônicos e alterando a dinâmica de captação/liberação de diferentes neurotransmissores. No cérebro, um neurônio pode ser afetado tanto por estímulos inibitórios, quanto por estímulos excitatórios, advindos de axônios de vários neurônios. A transmissão de impulsos neurais através das sinapses é consequência da liberação controlada de vários neurotransmissores, como por exemplo, o glutamato. O glutamato é uma molécula que se comporta como neurotransmissor excitatório e está presente no cérebro de mamíferos. Ele é um aminoácido não essencial que não atravessa a barreira hematoencefálica, não sendo fornecido pela circulação ao tecido cerebral. Em contrapartida, ele é sintetizado nas terminações neuronais (porção pré-sináptica) a partir da glutamina, por ação da enzima glutaminase. Este neurotransmissor também pode ser formado pela ação da α -cetoglutarato aminotransferase.

A via glutamatérgica pode ser relacionada à memória e à plasticidade cerebral (OZAWA, KAMIYA, TSUKUKI, 1998), à transdução de sinais do sistema nervoso central, como também à injúria cerebral (BUGGY et al., 2000), à isquemia, à tolerância e dependência química às drogas, à neuropatia da dor, ansiedade e depressão (CAROBREZ, 2003), como também à proliferação e migração celular. Esta via foi também relacionada aos mecanismos de facilitação da ereção peniana

por ativação de neurônios de diferentes áreas do cérebro (neurônios ocitocinérgicos do núcleo paraventricular, neurônios dopaminérgicos mesolímbicos da área tegmental ventral e neurônios glutamatérgicos no subículo ventral do hipocampo) (MELIS, ARGOLAS, 2011). O L-glutamato liberado na região do núcleo paraventricular ativa a entrada de íons cálcio nas células, o que estimula a produção de óxido nítrico (NO), a partir da L-arginina, pela ação da óxido nítrico sintase neuronal. Ainda não se sabe se a toxina PnTx2-6 teria ação sobre este sistema no cérebro, com igual potência comparada à injeção periférica, relativa aos estudos de potenciação da ereção que foram todos realizados com injeções subcutâneas da toxina (NUNES, 2008, NUNES et al., 2008) Entretanto, os primeiros testes de toxicidade, com injeções i.c. da toxina foram os que indicaram que a mesma induz priapismo. Não se sabe também se a toxina injetada, periféricamente, atravessaria a barreira hemato-encefálica. Estudos neste sentido são necessários para esclarecer tais possibilidades. O que se propõe é que a toxina injetada tanto pela via periférica, como central, induz priapismo. E as doses utilizadas no estudo do priapismo em ratos (injeção su-cutânea- Nunes e colaboradores, 2008), foram proporcionais às utilizadas em camundongos para os testes de toxicidade (injeção intra cerebral). Além do mais, estudos de Villanova e cols (2009) mostram que injeções diretas de doses de 1µg/ kg desta toxina no corpo cavernoso de camundongos são ainda capazes de ativar a ereção.

Os experimentos preliminares neste trabalho, mostram que a proteína de fusão rPnTx2-6-Trx induz a um aumento na liberação de L-glutamato, (cerca de 30% em relação ao controle sem toxina) e estes valores são comparáveis àqueles da liberação desencadeada pela PnTx2-6 nativa. Assim, verifica-se que, aparentemente, a proteína de fusão ligada à toxina, não estaria interferindo com a ação da mesma no processo de liberação de L-glutamato e na ligação ao canal para sódio. Observou-se também que as proteínas de fusão mutantes apresentaram valores inferiores de liberação de L-glutamato, quando comparadas com as toxinas nativa e de fusão recombinante, mostrando que, como previsto pelos estudos de modelagem molecular (MATAVEL et al., 2009) os resíduos mutados, isto é tirosina e triptofano, devem ter papel essencial na afinidade da toxina pelo seu sítio no canal para sódio ou na parte estrutural destas toxinas. Entretanto, é necessário que testes da ação da toxina expressa e de seus mutantes, sejam realizados em canais para

sódio, por exemplo, estudos de patch-clamp e também testes de toxicidade em camundongos, para uma avaliação mais precisa de suas atividades. Além destes estudos, ensaios de liberação de L-glutamato apenas com a proteína de fusão, sem a porção relativa à sequência da toxina ou mutantes, são também necessários, visando-se determinar se esta porção não causa nenhum efeito na liberação deste neurotransmissor. Por outro lado, é extremamente importante que a clivagem da toxina expressa e de seus mutantes, seja aprimorada, de forma a se obterem tais moléculas isoladas, isto é sem as proteínas de fusão realizando-se os testes de atividade biológica em canais para sódio, de liberação de L-glutamato e de toxicidade em camundongos. O teste dos mutantes, sem a proteína de fusão, na atividade de ereção será também um estudo a ser desenvolvido.

Em experimentos iniciais para a determinação da EC_{50} das proteínas de fusão recombinantes e mutantes na liberação de L-glutamato, a ação destas moléculas mostra uma tendência a ser concentração dependente, mas ensaios complementares são necessários para a obtenção de dados consistentes.

A partir dos resultados deste trabalho conclui-se que a toxina PnTx2-6 foi expressa de forma ativa reproduzindo o efeito da toxina nativa no processo da ereção e que proteína de fusão recombinante aparentemente atua de forma similar à toxina nativa na liberação de L-glutamato em sinaptosomas. Verificou-se também, que as substituições dos aminoácidos Tyr₃₅ e Trp₃₇ levaram à diminuição da liberação de L-glutamato, enfatizando-se a importância destes dois resíduos de aminoácidos para a função biológica da toxina, possivelmente, alterando a estrutura da molécula e /ou a sua afinidade de ligação ao canal para sódio.

Avaliamos que a metodologia desenvolvida neste trabalho proporcionará a obtenção de maiores quantidades destas moléculas para a continuação dos estudos farmacológicos e de relação estrutura-função, como também para a obtenção de outros derivados ativos e talvez menos tóxicos com a expectativa do uso destas moléculas como possíveis modelos de fármacos.