

NEY CARTER DO CARMO BORGES

AÇÃO DO VENENO DA ARANHA

***Phoneutria nigriventer* EM MÚSCULO LISO**

VASCULAR DE COELHO

**Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.**

ORIENTADOR - PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

**CAMPINAS
1992**

B644a

16376/BC

ÍNDICE

| | Página |
|----------------------------|--------|
| Resumo | 03 |
| Lista de Abreviaturas | 04 |
| Lista de Figuras | 06 |
| Lista de Materiais | 08 |
| Introdução | 10 |
| Materiais e Métodos | 17 |
| Resultados | 20 |
| Discussão | 47 |
| Referências Bibliográficas | 51 |
| Abstract | 57 |

" O valor do homem está no seu incansável espírito de busca"

MOKITI OKADA

À Márcia, Bruno, Diego, e Jr., pelo amor oferecido, o qual possibilitou a realização desta tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela oportunidade de não só apreender conhecimentos científicos, mas principalmente o seu sentimento de fraternidade.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, a sensibilidade no saber ensinar assuntos às vezes um tanto distante para mim e o seu apoio em todos os momentos da realização desta tese.

Aos Drs. Stephen Hyslop, Rossana Anderson Marangoni, Marcelo Muscará, Elen Landucci, pela inestimável colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Airton Fernando de Paula e Dora Ponciano ambos do Departamento de Farmacologia, pela forma sempre prestativa de apoiar esta tese.

Aos Profs. Drs. Benedito Oliveira, Sérgio Marangoni, Gilberto Domont, José Camillo Novello, pela carinhosa acolhida no Departamento de Bioquímica, propiciando-nos a complementação do fracionamento do veneno.

Ao Prof. Dr. José Roberto Giglio e ao biólogo Carlos Alberto Vieira, pela realização dos primeiros fracionamentos do veneno e pela orientação durante a realização do protocolo prático.

Por fim, a Fundação Mokiti Okada e aos Srs. Tetsuo Watanabe, Katsumi Yamamoto, Katsumi Moryama, Sadao Yamashita, Léo Rodrigues, pelo esforço, carinho, compreensão e apoio, essenciais para a realização desta etapa.

RESUMO

Esta tese descreve a atividade contrátil em músculo liso vascular de coelho do veneno da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer*. O endotélio dos vasos foi retirado mecanicamente e os mesmos foram montados em um sistema de cascata, superfundidos com solução de Krebs aquecida (37 °C) e oxigenada (95% O₂ + 5% CO₂). O *Phoneutria nigriventer* (0.3 - 30 µg) produziu contrações dependentes da dose em artérias (pulmonar, mesentérica e celíaca) e veias (jugular, mesentérica e cava). A atividade contrátil do veneno em tecidos venosos e na artéria pulmonar não foi alterada quando o mesmo foi submetido a diálise (20-72h) ou quando os tecidos foram perfundidos com metisergida, indicando que tal atividade não depende da serotonina contida no veneno. A atividade contrátil nas artérias mesentérica e celíaca foi abolida com a diálise do veneno ou com o uso da metisergida, indicando a serotonina como principal agente espasmogênico nestes tecidos. A tetrodotoxina e a fenoxibenzamina não afetaram significativamente a contração induzida pelo *Phoneutria nigriventer*, sugerindo que o efeito contrátil independe da ativação de canais de sódio e da liberação de catecolaminas das terminações nervosas da parede do vaso. A atividade contrátil do *Phoneutria nigriventer* apresentou uma redução significativa quando incubado com tripsina, indicando que o veneno contém polipeptídeos responsáveis pela atividade espasmogênica. Após o fracionamento parcial do veneno através de filtração em gel de Sephadex G-10 e cromatografia de troca iônica, obtivemos 8 frações as quais revelaram atividade contrátil em tecido liso vascular. A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida-tricina mostrou que o massa molecular destas frações está situado entre 8-50 kDa.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| PN | Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i> |
| PN _D | Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i> dialisado |
| VCC | Veia cava de coelho |
| VJC | Veia jugular de coelho |
| VMC | Veia mesentérica de coelho |
| APC | Artéria pulmonar de coelho |
| AMC | Artéria mesentérica de coelho |
| ACC | Artéria celiaca de coelho |
| ET ₁ | Endotelina-1 |
| 5-HT | Serotonina |
| 5-HT _D | Serotonina dialisada |
| TTX | Tetrodotoxina |
| Ver | Veratrina |
| Adr | Adrenalina |
| PBZ | Fenoxibenzamina |
| AC | Acetilcolina |
| AII | Angiotensina II |
| BK | Bradicinina |
| SP | Substância P |
| BPF | Fator potenciador da bradicinina |

| | |
|----------------------|--|
| U46619 | 11 α -9 α -epoximetano prostaglandina H ₂ |
| Bay-K 8644 | Metil-1,4-diidro 2,6-dimetil-3-nitro-4,2-trifluorometilfenilpiridina-5-carboxilato |
| Anti-BK ₂ | Ac,DHyp ³ ,Gly ⁶ ,D-Phe ⁷ ,Leu ⁸ |
| Tris | Tris (hidroximetil) aminometano |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| Tricina | N-Tris (hidroximetil-glicina) |

Lista de Figuras

| Fig | Pag | Título |
|-----------------|-----|--|
| 1 | 26 | Esquema de superfusão de músculo liso em cascata |
| 2 | 27 | Atividade em músculo liso vascular de coelho |
| 3 | 28 | Envolvimento de receptores de serotonina |
| 4 | 29 | Envolvimento de receptores histaminérgicos H ₁ |
| 5 _a | 30 | Efeito do veneno dialisado |
| 5 _b | 31 | Efeito do veneno dialisado |
| 6 | 32 | Envolvimento de alfa receptores |
| 7 | 33 | Envolvimento de canal de sódio voltagem-dependente |
| 8 | 34 | Envolvimento de canais sensíveis a dihidropiridinas |
| 9 | 35 | Envolvimento de receptores muscarínicos |
| 10 | 36 | Envolvimento de receptores de bradicinina |
| 11 | 37 | Envolvimento de receptores de angiotensina |
| 12 | 38 | Comparação entre ET ₁ e o PN |
| 13 | 39 | Efeito da incubação do veneno com tripsina |
| 14 _a | 40 | Efeito da variação do pH na atividade do veneno |
| 14 _b | 41 | Efeito da variação do pH na atividade do veneno |
| 15 | 42 | Efeito do aquecimento |
| 16 | 43 | Efeito da incubação do veneno com plasma e sangue de coelho. |

- 17 44 Filtração do veneno em Sephadex G-10
- 18 45 Cromatografia por troca iônica
- 19 46 Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida-tricina

Lista de Materiais

| Substância | Procedência |
|---------------------------------|---|
| Adrenalina | Sigma Chemical Co., St.Louis, EUA |
| Acetilcolina | Sigma Chemical Co.,St.Louis, EUA |
| Atropina | Sigma Chemical Co.,St.Louis, EUA |
| Angiotensina II | Sigma Chemical Co.,St.Louis, EUA |
| Bradicinina | Sigma Chemical Co.,St.Louis, EUA |
| Banho de circulação refrigerada | Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA |
| Coomassie blue | Bio-Rad Labs., Richmond, California, USA |
| Histamina | Sigma Chemical Co.,St.Louis, EUA |
| Mepiramina | May & Baker, Essex, GB |
| Metisergida | Sandoz, Basel, Suíça |
| Nicardipina | Sigma Chemical Co.,St.Louis, EUA |
| Nifedipina | Sigma Chemical Co.,St.Louis, EUA |
| PN | Instituto Butantan, SP, BR |
| Saralasinina | Sigma Chemical Co.,St.Louis, EUA |
| Serotonina | Sigma Chemical Co.,St.Louis, EUA |
| Sais p/ tampão Krebs-Ringer | Merck, RJ, BR |

| | |
|------------------------------------|---|
| Sistema Mighty Small II SE 250 | Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA. |
| Tampão anódico | Bio-Rad Labs., Richmond, California, USA |
| Tampão catódico | Bio-Rad Labs., Richmond, California, USA |
| Tiopental sódico | Abbott, SP, BR |
| Tetrodotoxina | Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA |
| Membrana de diálise (12-14 kDa) | Philip Harris Scientific, London, UK |
| Verapamil | Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA |
| Marcadores de massa molecular | Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA |
| <i>Doações</i> | |
| U46619 | Upjohn Co., Kalamazoo, EUA |
| Fenoxibenzamina | Smith, Kline & French, Stevenage, GB |
| Bay-K 86644 | Bayer, Alemanha |
| Anti-BK ₂ | Dr. Domenico Regoli, Universidade Sherbrooke, Canadá |

INTRODUÇÃO

A *Phoneutria nigriventer* é conhecida popularmente pelo nome de *aranha armadeira* porque, quando exposta em situações de perigo, arma o bote apoiando-se nas patas traseiras e erguendo as dianteiras, procurando picar a vítima (Bucherl, 1971; Lucas, 1988). Aranhas do gênero *Phoneutria* habitam folhagens como palmeiras e bananeiras, daí serem também conhecidas como *aranha das bananas*. As aranhas do gênero *Phoneutria* são solitárias, errantes, crepusculares e noturnas (Bucherl, 1971).

Estes aracnídeos pertencem à ordem Araneida, sub-ordem Labidognatha, família Ctenidae, sub-família Phoneutriinae, gênero *Phoneutria* (Perty, 1833); no passado foram inicialmente classificadas no gênero *Ctenus* (Walckenaer, 1837); (von Eickstedt, 1969, 1978/79; von Eickstedt & Bucherl, 1969). Em 1936, Mello-Leitão revisou os ctenídeos brasileiros e revalidou o gênero *Phoneutria*, distinguindo-o de *Ctenus* pela presença de uma escópula na face interna dos artículos do palpo. Apresentam como características morfológicas a disposição dos seus oito olhos em três fileiras, visualizados no plano frontal sobre o cefalotórax, sendo dois na primeira, próximo às quelíceras, quatro na segunda e dois na terceira fileira. Esses olhos garantem a visão de tudo o que se passa ao redor da aranha (Bucherl et. al., 1969; Bucherl, 1971; Lucas, 1969; Schiapelli & Pikelin, 1966).

As aranhas do gênero *Phoneutria* distribuem-se essencialmente na América do Sul, havendo relatos de casos esporádicos de acidentes por estes aracnídeos na América Central (Costa Rica), provavelmente por migração da

espécie colombiana (Trejós et al., 1971). No Brasil, o gênero *Phoneutria* está distribuído em diversas regiões (Lucas, 1988):

1- *Phoneutria fera* (Perty, 1833)- Amazonas;

2- *Phoneutria nigriventer* (Keiserling, 1891)- Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul;

3- *Phoneutria reidy* (Pickard-Cambridge, 1887)- Amazonas, Pará e Roraima;

4- *Phoneutria keiserling* (Pickard-Cambridge, 1897)- Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Na região Centro-Sul encontram-se principalmente as espécies *Phoneutria nigriventer* (predominante no interior) e *Phoneutria keyserling* (predominante no litoral), (Lucas, 1988).

Sintomatologia do envenenamento causado por *Phoneutria nigriventer*

A *P. nigriventer* é responsável por 71% dos acidentes de araneísmo no Brasil (Ministério da Saúde, 1989), que ocorrem principalmente nas regiões centro-oeste e sul do Brasil (Lucas, 1988).

Nos acidentes humanos provocados pela picada de *P. nigriventer* são relatados, na maioria das vezes, apenas sinais e sintomas locais, acompanhados de alterações sistêmicas como dor, que é o sintoma mais freqüente e geralmente surge logo após a picada, (Vital Brazil & Vellard, 1926 a, b; Diniz, 1963). A dor provocada pelo veneno é intensa e irradia-se para o segmento proximal à picada, sendo acompanhada por fasciculações musculares locais, câimbras, hiperestesia, paralisia espástica, convulsões

tônicas, sialorréia, hipersecreção nasal e brônquica, sudorese fria, taquicardia, arritmias cardíacas, hipertensão e/ou hipotensão arterial, hipotermia, vômitos, perturbações da acuidade visual, lacrimejamento, priapismo e, mais raramente, diarreia, retenção urinária e constipação intestinal nos dias subseqüentes à picada (Vital-Brazil & Vellard, 1926 b; Schenberg & Pereira-Lima, 1962, 1971, 1978; Lucas, 1988). Em 1925, Vital-Brazil & Vellard observaram hemorragia alveolar, ocular (coelhos) e hepática (ratos). A peçonha de *P. nigriventer* difere de outras peçonhas de aranhas, como por exemplo a do gênero *Loxosceles*, (Heineken and Lowe, 1835, apud Lucas, 1988; Schenone & Letonja, 1975; Cardoso et al., 1990) por não produzir edema local, necrose, coagulação sanguínea ou hemólise, difere também dos venenos de escorpiões por não provocar convulsão em camundongos (Vital-Brazil & Vellard, 1925). As principais complicações do envenenamento humano são caracterizadas por choque neurogênico, priapismo, edema pulmonar, parada cardiorespiratória e, eventualmente, morte que acomete frequentemente crianças abaixo de 10 anos (Schenberg & Pereira Lima, 1962, 1971, 1978; Bucarechi et al., 1987).

Efeitos farmacológicos causados pelo veneno de *P. nigriventer*

Em músculos esqueléticos de ratos, Barrio (1955) relatou o aparecimento de fibrilações e espasmos musculares, paralisia e asfixia. Estes efeitos foram atribuídos à presença de duas frações do veneno, separadas, isoladas e caracterizadas por eletroforese em papel Whatman. Posteriormente, foram isolados dois polipeptídeos através de eletroforese (Whatman) e cromatografia em papel de filtro Whatman, que possuíam a capacidade de contrair íleo isolado de cobaio e útero de rata (Diniz, 1963). Em preparações neuromusculares de fêmur de gafanhoto, o veneno de *P.*

nigriventer provoca o aparecimento de potencial de ação repetitivo no nervo crural e fasciculações musculares sendo tais efeitos decorrentes da presença de um polipeptídeo (5.5 a 5.9 kDa) que contém grande quantidade de cisteína (Entwistle et al., 1982). A injeção intraneural desse veneno em ratos induz o aparecimento de potencial de ação repetitivo das fibras nervosas causando subsequentemente o bloqueio de condução das mesmas; tais distúrbios fisiopatológicos são associados com edema transitório do axoplasma nodal de Ranvier (Cruz-Höfling et al., 1986; Love & Cruz-Höfling 1986) e formação de vacúolos no espaço periaxonal das fibras nervosas mielinizadas (Cruz-Höfling et al., 1985). Em preparações neuromusculares de nervo frênico-diafragma de rato, o veneno de *P. nigriventer* causa despolarizações não uniformes das membranas musculares e aumento na frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura. Estes efeitos são abolidos na presença de tetrodotoxina ou com redução da concentração do sódio no meio nutritivo, indicando que o veneno de *P. nigriventer* ativa o canal de sódio voltagem-dependente da membrana de fibras nervosas e musculares (Fontana & Vital Brazil, 1985; Vital Brazil, 1987). Em aurículas isoladas de cobaia, o veneno induz efeitos inotrópicos e cronotrópicos negativos, seguidos de aumento na frequência e tensão das contrações espontâneas. A tetrodotoxina abole o cronotropismo e inotropismo sugerindo que tais efeitos sejam decorrentes da liberação de acetilcolina e noradrenalina das terminações nervosas autonômicas consequentes da ativação de canais de sódio nos terminais nervosos (Vital Brazil et al., 1988). Este veneno contém ainda quatro polipeptídeos neurotóxicos sendo que a neurotoxina Tx1 (8 kDa), foi purificada e sua estrutura primária definida; esta neurotoxina apresenta concentração de 14 meia-cistinas (Diniz et al., 1990). Recentemente, foram isoladas do veneno

de *P. nigriventer*, através de filtração em gel e cromatografia de fase reversa, 3 frações neurotóxicas, letais em camundongos, e diferentes entre si com relação à massa molecular (6 a 9 kDa), composição e seqüência do N-terminal (Rezende Jr. et al., 1991).

Toxinas como Instrumentos de Pesquisa

As toxinas têm sido instrumentos valiosos no esclarecimento de fenômenos farmacológicos e fisiopatológicos. O conhecimento do modo e mecanismo de ação de toxinas de venenos animais ou de origem vegetal evoluiu consideravelmente nas últimas décadas. Isto é devido, de um lado, a seu isolamento em estado de pureza e conhecimento de sua estrutura química; de outro, ao emprego de métodos de investigação não disponíveis ou pouco divulgados no passado.

Desde que os canais de sódio foram primeiramente descritos (Hodgkin & Huxley, 1952), grande parte dos estudos sobre estas estruturas tem sido facilitados pelo uso de neurotoxinas tais como tetrodotoxina (Narahashi, et. al., 1966), saxitoxina (Narahashi, 1974), veratridina (Horackova & Vassort, 1973), batracotoxina (Tokuyama, et. al., 1969), aconitina (Wiesner, et. al., 1969) e toxinas α e β de escorpiões (Miranda, et. al., 1970) que se ligam com alta afinidade e especificidade ao canal de sódio promovendo inibição do transporte iônico, ativação persistente, inativação lenta ou ainda potencializando sua ativação (Catterall, 1986).

Em 1965, Ferreira denominou de fator potenciador da bradiginina (BPF) um grupo de substâncias de natureza peptídica presentes no veneno da serpente *Bothrops jararaca*. O fator potenciador da bradiginina era capaz de inibir a atividade da cininase plasmática, potenciar a atividade espasmogênica de músculo liso isolado, produzir aumento na vasodilatação

periférica e permeabilidade vascular. O fator potenciador da bradicinina era ainda capaz de aumentar a meia vida da bradicinina circulante (Ferreira & Vane, 1967). O conhecimento da estrutura desses peptídeos, em particular o sítio de ação do BPF_{5a} na enzima conversora de angiotensina (Cushman et al., 1977), culminou com o desenvolvimento de um novo grupo de anti-hipertensivos, os inibidores da enzima conversora de angiotensina ou cininase II.

Recentemente, toxinas de baixo peso molecular provenientes de aranhas da família Araneidae (sub-ordem Labidognatha) estão sendo descritas como potentes antagonistas dos receptores L-glutaminérgicos. A ativação desses receptores causam uma variedade de propriedades fisiofarmacológicas como bloqueio e paralisia neuromuscular, sendo encontrados no sistema nervoso central, músculos esqueléticos e viscerais de muitos animais invertebrados (Jackson & Usherwood, 1988; Skinner et.al., 1989).

O veneno das aranhas contém diversas classes de neurotoxinas (Geren & Odell, 1984; Geren, 1986). Uma das poucas aranhas que causa acidentes letais aos homens é a aranha australiana *Atrax robustus* (Sutherland, 1978). Os sinais e sintomas desse envenenamento em humanos são similares àqueles descritos para a *P. nigriventer* e incluem principalmente falência circulatória e respiratória, diarreia, vômitos, fasciculações musculares generalizadas, edema pulmonar e dor. O polipeptídeo neurotóxico responsável pelos efeitos letais ao homem é a robustoxina (4.8 kDa), a qual foi isolada e tem sequência conhecida de 42 resíduos de aminoácidos (Sutherland, 1978).

Os objetivos desta tese são:

1- Caracterizar farmacologicamente a ação do veneno de **P. nigriventer** em músculo liso vascular de coelho através do uso de diferentes agonistas e antagonistas.

2- Caracterização parcial das frações vasoativas do veneno de **P. nigriventer** através de cromatografia e determinação do peso molecular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Superfusão de músculo liso vascular em cascata

Coelhos machos (2-3 kg), albinos (New Zealand) foram anestesiados com tiopental sódico (40mg/kg, e.v.) e exsanguinados via artéria carótida. Após laparotomia, as artérias mesentérica (AMC), celíaca (ACC) e pulmonar (APC) e as veias cava (VCC), jugular (VJC) e mesentérica (VMC), foram removidas e colocadas em solução nutriente de Krebs-Ringer. O tecido endotelial de cada vaso foi removido através da inserção de um cateter de polietileno na luz dos mesmos. A remoção do endotélio funcional foi verificada através da ausência de relaxamento induzida por acetilcolina (10^{-5} M) em tecidos pré-contraídos com U46619 (10 nM). Os vasos foram cortados em espiral, montados em cascata (Vane, 1964) e superfundidos com solução de Krebs (95%O₂/5%CO₂), a um fluxo constante de 5 ml/min (Figura 1). Os tecidos foram ligados a alavancas auxotônicas conectadas em transdutores isotônicos para músculo liso (Harvard; Paton, 1957) e as respostas registradas em um polígrafo Watanabe (Model WTR 381). O veneno de *P. nigriventer* e os agonistas foram injetados na forma de *bolus*; os antagonistas foram infundidos (0.1 ml/min) sobre o tecido. A composição da solução tampão Krebs-Ringer (mM) foi a seguinte: NaCl 118, NaHCO₃ 25, glucose 5.6, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄.7H₂O 1.17 e CaCl₂.6H₂O 2.5. Foram realizados experimentos em número estatisticamente significativo, sendo . a administração de agonistas e do PN.

Diálise

O veneno de *P. nigriventer* (3-4ml de uma solução 2mg/ml em salina) foi dialisado contra 2 litros de solução salina 0.9%, em tubos de diálise com exclusão molecular de 10-12 kDa, por um período de 24 - 72 h, a 4-6 °C. A solução de diálise foi trocada quatro vezes durante este período. Retirou-se uma alíquota da solução de veneno antes de iniciar a diálise para comparação subsequente com o material dialisado.

Fracionamento do veneno de *P. nigriventer*

Fracionamento em Sephadex G-10

A amostra do veneno de *P. nigriventer* (900mg do veneno dessecado) foi suspensa em 4ml de ácido acético a 2% (v/v) em temperatura ambiente (20-25 °C) e centrifugada a 2000 r.p.m. por 10 min em centrífuga clínica. Foi obtido um resíduo insolúvel, cinza escuro, da ordem de 30mg. A solução sobrenadante, amarelo marron (caramelo) foi esfriada a 5 °C e submetida a filtração em coluna 2.5 cm x 190 cm de Sephadex G-10 (40-120 µM Sigma Chem. Co.) com fluxo de 13 ml/h. Foram coletadas amostras de 10 ml até o tubo 28, e de 5 ml a partir do tubo 29. Nesta primeira etapa oito frações (S_I-S_{VIII}) foram delineadas, liofilizadas, e testadas em músculo liso vascular de coelho .

Eletroforese em gel de SDS-Poliacrilamida-Tricina

O método utilizado foi o descrito por Shager & Jagow (1987). Foi utilizado um sistema Mighty Small II SE 250 (géis 16 x 10 cm), acoplado a um banho de circulação refrigerada RCB-300. A partir de uma solução estoque de acrilamida 46.5 % (m/v) e bisacrilamida 3% (m/v) foram obtidos géis de separação de 16.5 %, sobrepostos por uma camada de gel (2

cm) à 10 % e um gel de concentração a 4 %. Foram utilizados dois tampões de corrida, o tampão anódico a 0.2 M Tris-HCl em pH 8.9 e o tampão catódico a 0.1 M Tris, 0.1 M Tricina, 0.1 % SDS. As amostras entre 20-50 µg foram dissolvidas em 20 µl de tampão Tris-HCl com pH 6.8 na concentração de 0.0625 M, contendo 2 % de SDS, 10 % (v/v) de glicerol e 0.001 % de azul de bromofenol. O gel foi corado em coomassie blue, 0.1 % em ácido acético - metanol - água (1: 8: 10 v/v) .

Cromatografia da Fração S_I por Troca Iônica.

A fração ativa S_I do veneno de *P. nigriventer* com massa de 450 mg foi equilibrada com 3.5 ml de tampão acetato de amônio 0.05 M, pH 5.0, clarificada por centrifugação e cromatografada em CM- Celulose-52 microgranular (Whatman).

A coluna (2.5 cm x 55 cm) foi previamente equilibrada com o mesmo tampão, fluxo de 20 ml/hr a 5 °C, seguindo-se uma eluição por etapas com concentrações crescentes do tampão acetato de amônio (0.1M - 3M), pH 5, iniciada a partir de volume efluente igual a 150ml. Cada nova fração assim obtida foi liofilizada, redissolvida em ácido acético a 2% (v/v) e dessalificada a 5 °C numa coluna de 2 cm x 200 cm de Sephadex G-10-120 equilibrada com o mesmo solvente, e novamente liofilizada. Foram obtidas 16 frações (C_I-C_{XVI}), coletadas a 5 °C, 5ml/tubo. Frações C_I-C_{III} foram dessalificadas por liofilização direta. A fração C_V, insolúvel em ácido acético, foi dessalificada em hidróxido de amônio 0.05M.

RESULTADOS

Atividade em músculo liso vascular de coelho

O veneno de *P. nigriventer* (1-30 μg) produziu contrações dose-dependentes, na AMC (n=109), ACC (n=73), APC (n=91), VMC (n=60), VCC (n=85) e VJC (n=41). O efeito contrátil foi caracterizado por início de ação rápido e curta duração, (Figura 2). Sendo "n" a soma de todos os experimentos para cada tecido.

Envolvimento de receptores de serotonina

A Figura 3 ilustra a contração induzida pela serotonina (3-1000 ng), adrenalina (30 ng) e veneno de *P. nigriventer* (0.3-1 μg) em VCC, VMC e AMC, antes e durante a infusão contínua do antagonista de serotonina, metisergida (5 μM). Demonstramos que a metisergida reduziu marcadamente a atividade contrátil da serotonina na AMC. A atividade contrátil do veneno de *P. nigriventer* não foi significativamente alterada na VCC e VMC, entretanto na AMC, seus efeitos foram praticamente abolidos. A contração induzida pela adrenalina não foi significativamente alterada durante a infusão de metesergida.

Envolvimento de receptores histaminérgicos H₁

Histamina (1-3 μg), adrenalina (0.1 μg) e o veneno de *P. nigriventer* (3-10 μg) causaram contrações dependentes da dose em VCC. O antagonista de histamina, mepiramina (0.35 μM), inibiu as contrações induzidas pela histamina, sem afetar a resposta contrátil causada pelo veneno de *P.*

nigriventer e adrenalina (Figura 4, n=3). Resultados similares foram obtidos em APC, AMC, ACC, VJC e VMC (n=3).

Efeito do veneno dialisado

Na Figura 5_a demonstramos que o veneno de *P. nigriventer* (3-10 µg) induziu contrações dependentes da dose em APC e AMC (n=3). A resposta contrátil induzida pelo veneno dialisado (30 µg, 24 h) foi abolida na AMC sendo preservada na APC.

Resultados obtidos na APC e VJC (Figura 5_b) mostraram que o veneno de *P. nigriventer* (10-30 µg), serotonina (5-HT, 0,03-0,1 µg), e o dialisado do veneno de *P. nigriventer* (30 µg, 48 hs) induziram contrações em APC e VJC. A serotonina dialisada (10 µg) apresentou redução significativa de sua resposta contrátil.

Envolvimento de alfa receptores

A Figura 6 ilustra a contração induzida pela adrenalina (10-30 ng) e pelo veneno de *P. nigriventer* (1-3 µg) na VCC em presença do antagonista de receptores alfa-adrenérgicos, fenoxibenzamina. Ao término da infusão do antagonista (0,05 µM; 30 min), a curva dose-resposta da adrenalina foi deslocada para a direita em 2-3 ordens de magnitude enquanto que a curva dose-resposta do veneno não foi significativamente alterada. Na Tabela 1 mostramos os valores de DE₅₀ do veneno de *P. nigriventer* em diferentes tecidos vasculares antes e após da infusão de fenoxibenzamina, n=5.

Tabela-I

Valores de DE_{50} (μg) do veneno de *P. nigriventer* na ausência e presença de fenoxibenzamina (PBZ).

| | VCC | VMC | APC | AMC |
|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| antes PBZ | 1.1 ± 0.3 | 4.2 ± 5 | 4.5 ± 1.1 | 5.2 ± 2.6 |
| depois PBZ | 1.3 ± 0.2 | 9.8 ± 4.3 | 7.5 ± 2.1 | 9.6 ± 6.7 |

Envolvimento do canal de sódio voltagem-dependente

Conforme demonstrado na Figura 2, o veneno de *P. nigriventer* (3-30 μg) e o agonista de canal de sódio, veratrina (100 μg), apresentaram um padrão de contração diferente em VCC e AMC. Pode ser observado que, enquanto o veneno de *P. nigriventer* contraiu ambos os tecidos vasculares, a veratrina foi muito mais potente na VCC. Na Figura 7 demonstramos que as contrações induzidas pela veratrina (60 μg) foram abolidas com a infusão do antagonista de canal de sódio, tetrodotoxina (3 μM), em VCC; entretanto, o mesmo não afetou as contrações induzidas pelo veneno (1-3 μg).

Envolvimento de canais de cálcio sensíveis à dihidropiridina.

O agonista de canal de cálcio, Bay-K 8644 (3-10 μg), e o veneno de *P. nigriventer* dialisado (10 μg) causaram contrações dependentes da dose em APC (Figura 8, n=3). Entretanto, em VMC o Bay-K 8664 não apresentou atividade contrátil, enquanto que o veneno de *P. nigriventer* manteve sua atividade contrátil.

Envolvimento de receptores muscarínicos

A acetilcolina (0.3-3 μg), e o veneno de *P. nigriventer* (1-3 μg) causaram contrações dependentes da dose na VCC. A infusão do antagonista de receptor muscarínico, atropina (3.5 μM), inibiu significativamente as contrações induzidas pela acetilcolina, sem contudo afetar a resposta espasmogênica causada pelo veneno de *P. nigriventer* (Figura 9, n=3). Resultados semelhantes foram obtidos em AMC e ACC.

Envolvimento de receptores de bradicinina

A Figura 10 ilustra a contração induzida pela bradicinina (1-10 ng), pelo análogo de tromboxano, U46619 (30 ng), e veneno de *P. nigriventer* (3-30 μg) na VJC, antes e durante infusão do antagonista de bradicinina (0.5 μM). Na presença desse antagonista, houve inibição significativa das contrações induzidas pela bradicinina, sem afetar aquelas induzida pelo veneno de *P. nigriventer* e U46619. Resultados similares foram obtidos em VCC (n=3).

Envolvimento de receptores de angiotensina

As contrações induzidas pela angiotensina II (0.003-0.01 μg) foram abolidas pelo seu antagonista específico, saralasinina (0.5 μM) em VCC (Figura 11). Entretanto, as contrações induzidas pelo veneno de *P. nigriventer* (10 μg), não foram significativamente modificadas na presença deste antagonista. Resultados similares foram obtidos em APC, AMC, ACC, e VJC (n=3). A saralasinina não modificou a atividade contrátil induzida pela adrenalina (0.1 μg)

Comparação entre ET₁ e o veneno de *P. nigriventer*

O perfil contrátil entre ET₁ (75-250 ng) e o veneno de *P. nigriventer* (3-10 µg) em APC, revelam que ambos apresentam um perfil de contração diferente; enquanto as contrações induzidas pela ET₁ são demoradas; aquelas induzidas pelo veneno de PN são de curta duração. Isto indica que o veneno não atua em receptores de ET₁. Resultados similares foram obtidos em outros três experimentos (Figura 12).

Efeito da incubação do veneno com tripsina

O veneno de *P. nigriventer* (30 µg) foi incubado com a tripsina (1000 u/ml, 37°C, 30 min) e testado na VMC. A incubação resultou em uma redução significativa da atividade contrátil do veneno (Figura 13, n=3).

Efeito da variação do pH do veneno

O veneno acidificado (pH 1 - pH 5.6, 0.3-1µg), incubado durante 5 min a 37°C, sendo o ensaio biológico realizado em pH 5.6, não apresentou modificação no seu perfil contrátil em VMC. O veneno alcalinizado (pH 13.8 - pH 5.6) incubado por 5 min a 37°C sendo o ensaio biológico realizado em pH 5.6, apresentou redução significativa na sua atividade contrátil (Figura 14_a). Resultados similares foram obtidos em APC (Figura 14_b). Os resultados foram repetidos em três outros experimentos.

Efeito do aquecimento

O aquecimento do veneno (10 µg, 90°C) durante 3, 10 ou 30 min não alterou a sua atividade contrátil em APC quando comparado ao veneno não aquecido (Figura 15). Os resultados foram repetidos em outros três experimentos.

Efeito da incubação do veneno com plasma e sangue de coelho

Quando incubado com plasma ou sangue total de coelho (37°C, 30-60 min) e testado em VMC, a atividade contrátil do veneno de *P. nigriventer* (1 µg) não foi significativamente modificada (Figura 16). Estes resultados foram repetidos em três outros experimentos.

Identificação do(s) componente(s) vasoativos presentes no veneno

Cromatografia do veneno em Sephadex G-10

A fração S_I (3-30 µl) apresentou atividade contrátil em vários segmentos de músculo liso vascular tais como VCC (n=3), VJC (n=2), VMC (n=2), AMC (n=2), ACC (n=2), APC (n=2). As contrações induzidas pela Fração SVII nas artérias pulmonar e mesentérica foram abolidas pelo pré-tratamento dos tecidos com metisergida (0.5 mM). As frações S_{II}, S_{III}, S_{IV}, S_V, S_{VI} e S_{VIII} também apresentaram atividade contrátil em todos os tecidos vasculares examinados (Figura 17). As frações obtidas em filtração de Sephadex G-10 foram precedidas da letra S para diferenciar das frações oriundas da cromatografia de troca iônica as quais foram precedidas da letra C.

Cromatografia por Troca Iônica

As frações C_{VII-VIII}, C_{IX}, C_{X-XI} (3-30 µg) apresentaram atividade espasmogênica de forma equipotente em APC (n=4) e VMC (n=7), (Figura 18).

Eletroforese em gel- SDS -TRICINA

As frações C_{VII-VIII} apresentaram massa molecular de 8 - 14 kDa, a fração C_{IX} de 8 - 14 kDa e a fração C_{X-XI} de 12 - 50 kDa, (Figura 19).

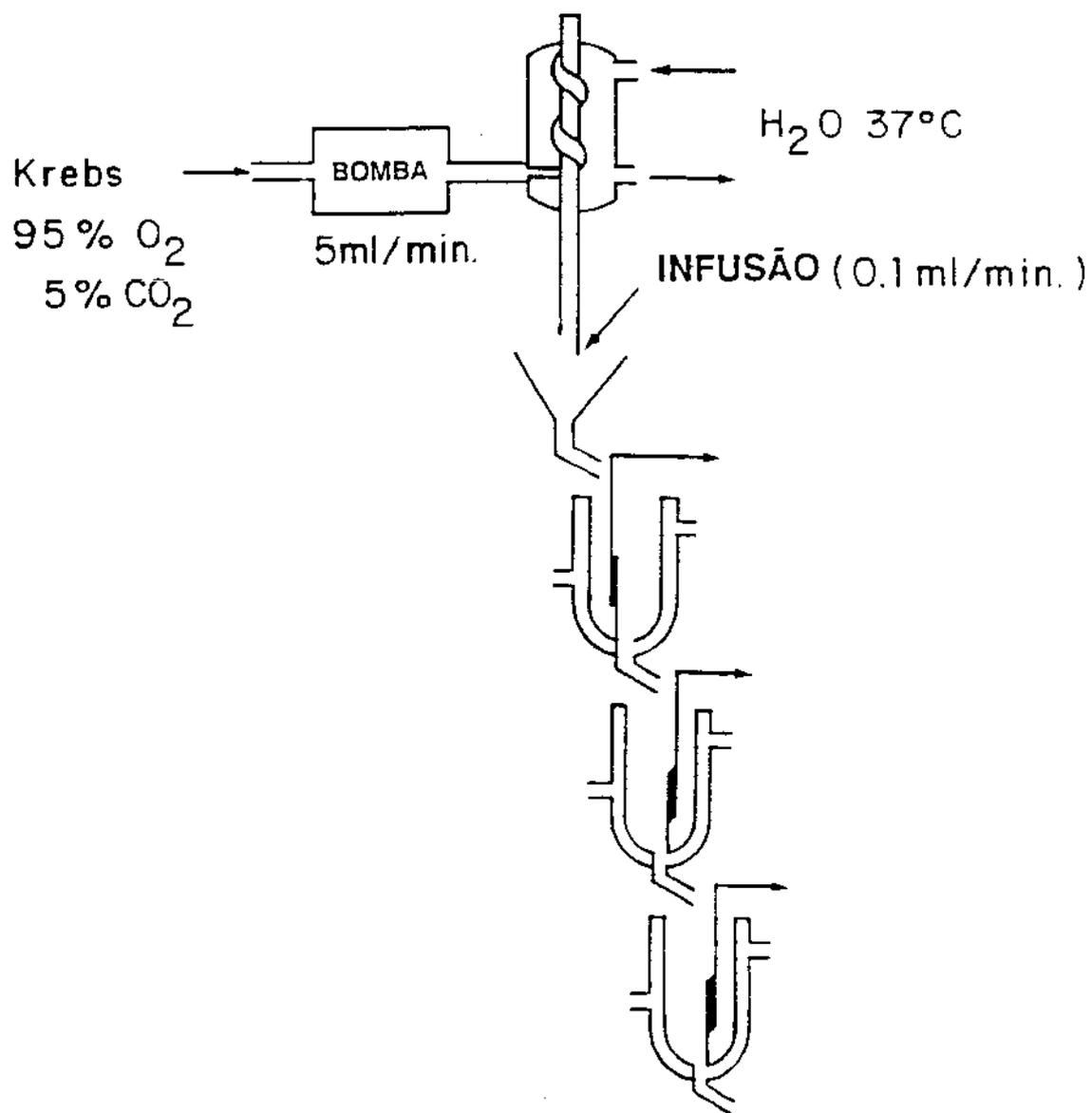


Figura 1 - Esquema de superfusão de músculo liso em cascata.

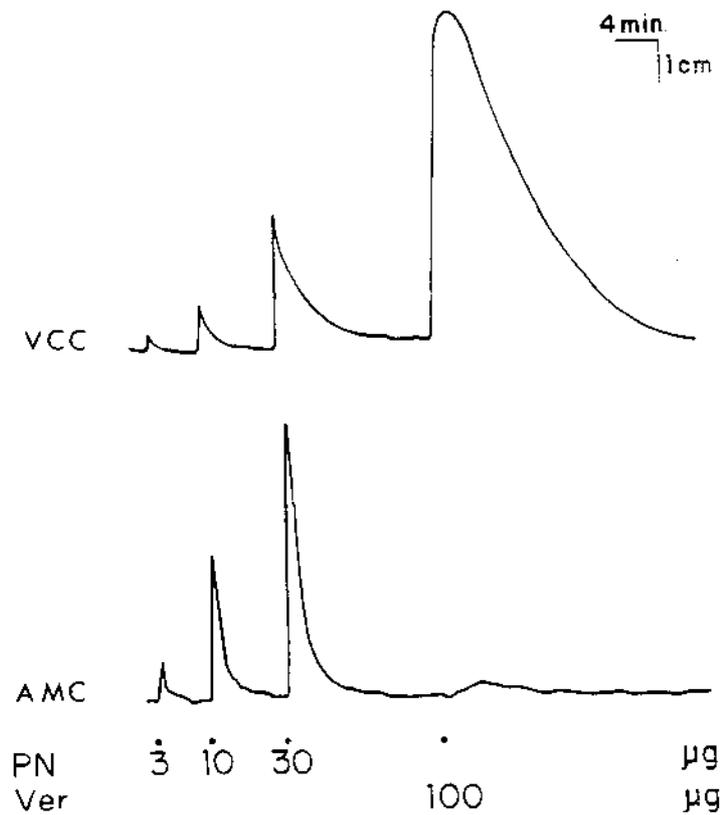


Figura 2- Perfil contrátil do PN e veratrina em VCC e AMC. Os tecidos desprovidos de endotélio foram cortados em segmentos espirais e superfundidos em cascata com solução de Krebs-Ringer (5 ml/min, 37 °C) conforme descritos em métodos. Note a contração rápida induzida pelo PN em VCC e AMC. Resultados similares foram obtidos em outros cinco experimentos.

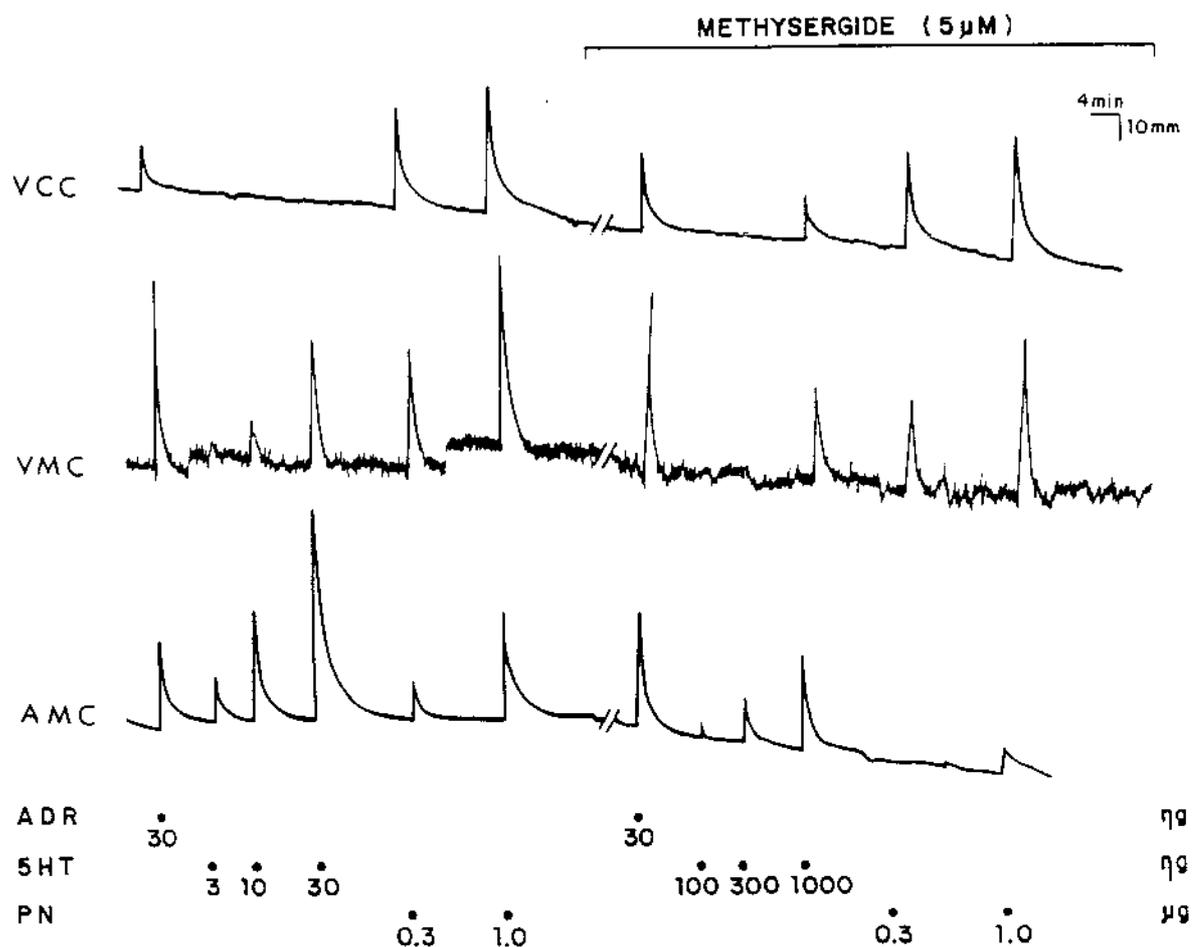


Figura 3 Efeito da metisergida sobre atividade contrátil do PN em VCC, VMC e AMC. Estes tecidos foram superfundidos em cascata conforme descrito em Material e Métodos. Observe que na AMC o PN apresentou uma atividade contrátil significativamente reduzida, mantendo atividade contrátil em VCC e VMC. Resultados similares foram obtidos em outros três experimentos.

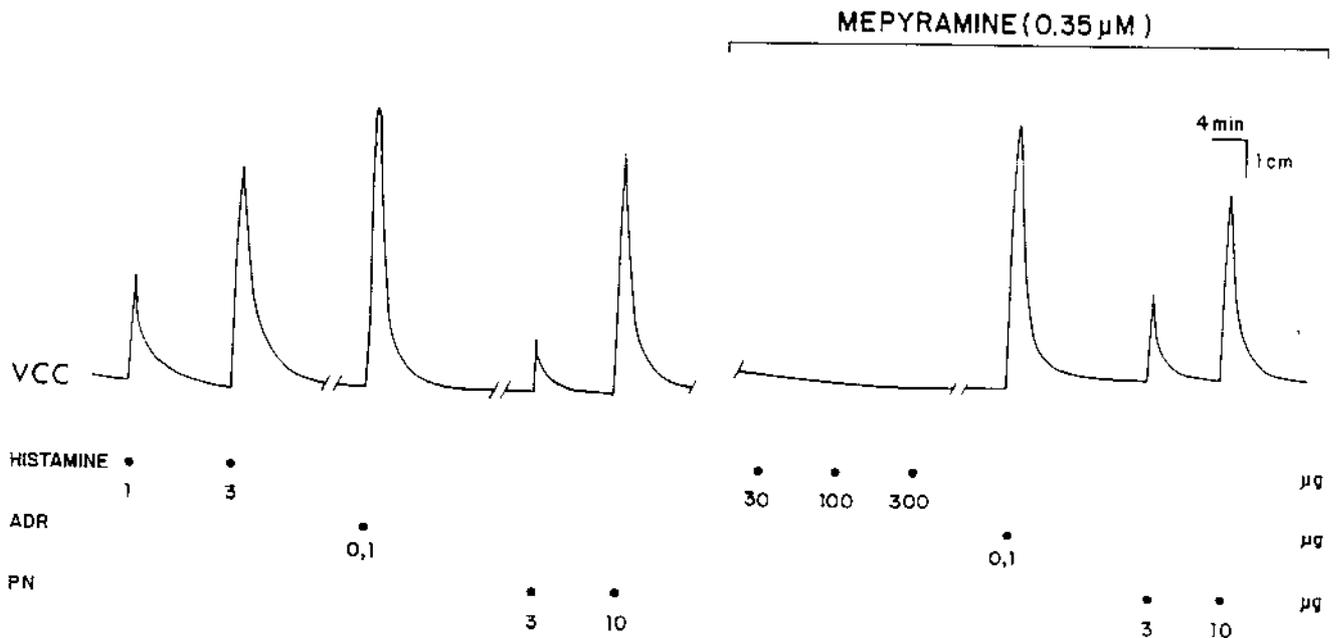


Figura 4- Efeito da mepiramina sobre atividade contrátil do PN em VCC. O tecido foi superfundido em cascata conforme descrito em Métodos. Observe que as contrações induzidas pelo veneno de PN não foram afetadas significativamente pela mepiramina. Resultados similares foram obtidos em outros três experimentos.

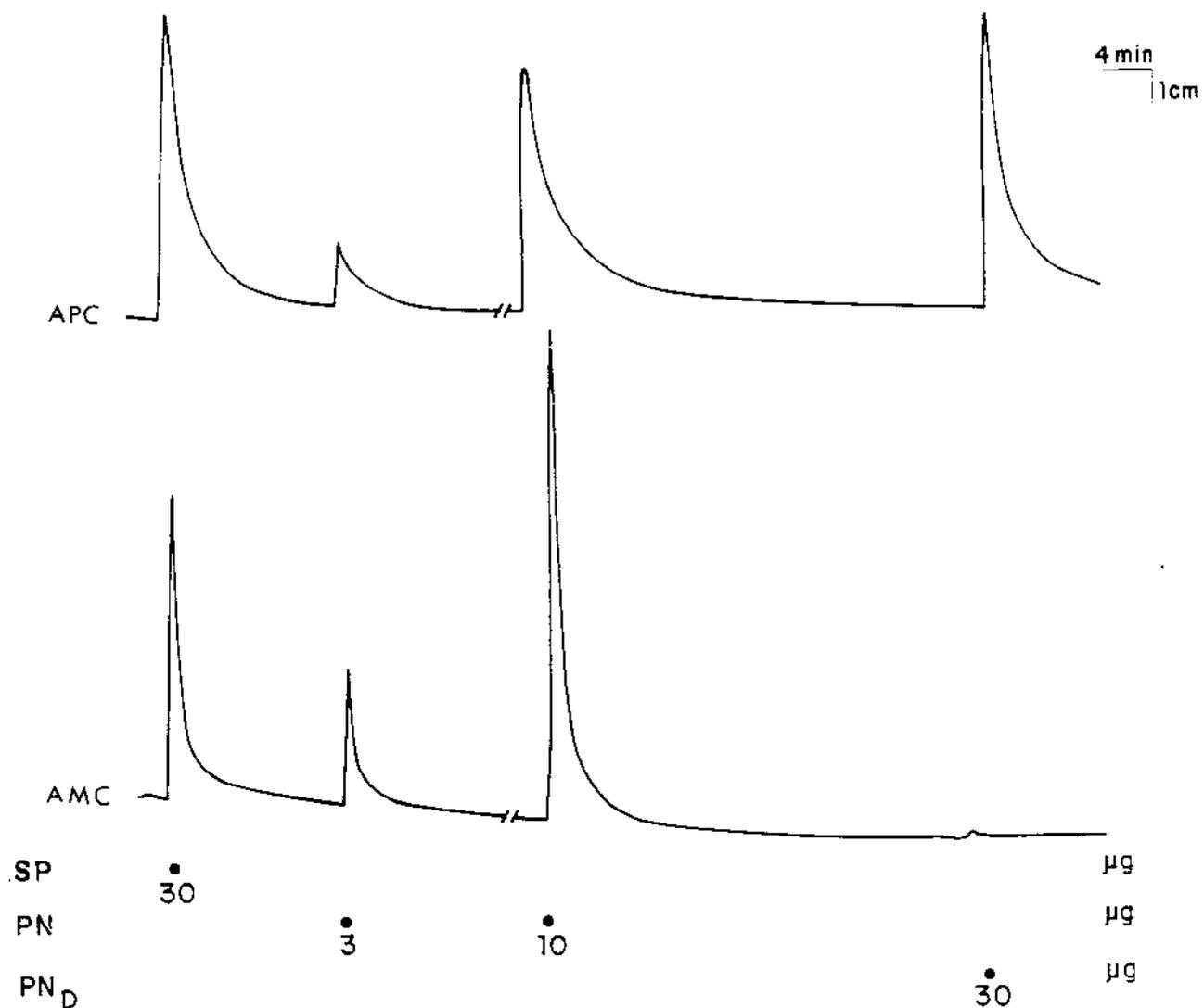


Fig 5_a- O efeito da diálise sobre atividade contrátil do PN em APC e AMC. Estes tecidos foram superfundidos em cascata conforme descrito em Métodos. Note que em AMC o veneno de PN apresentou atividade contrátil abolida após a diálise. Resultados similares foram obtidos em outros três experimentos.

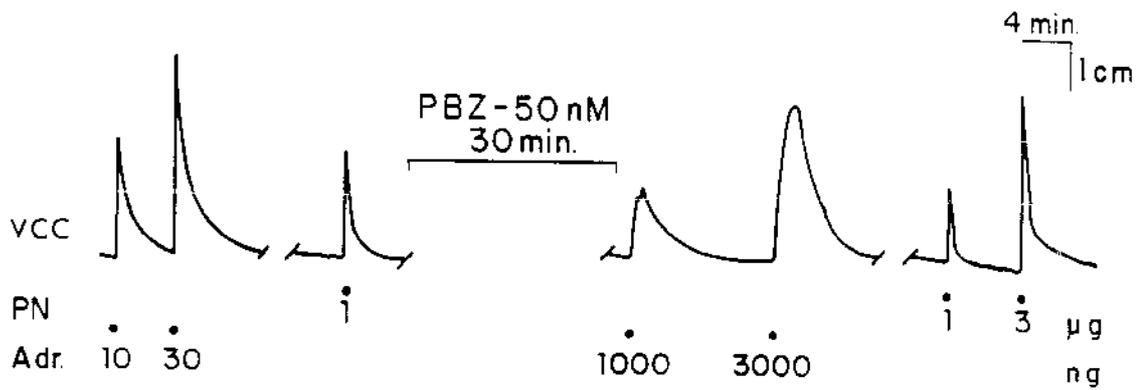


Figura 6- Efeito da fenoxibenzamina sobre atividade contrátil do PN em VCC. Este tecido foi superfundido em cascata conforme descrito em Métodos. Chamamos atenção para a manutenção do efeito contrátil do PN em presença da PBZ. Resultados similares foram obtidos em três outros experimentos.

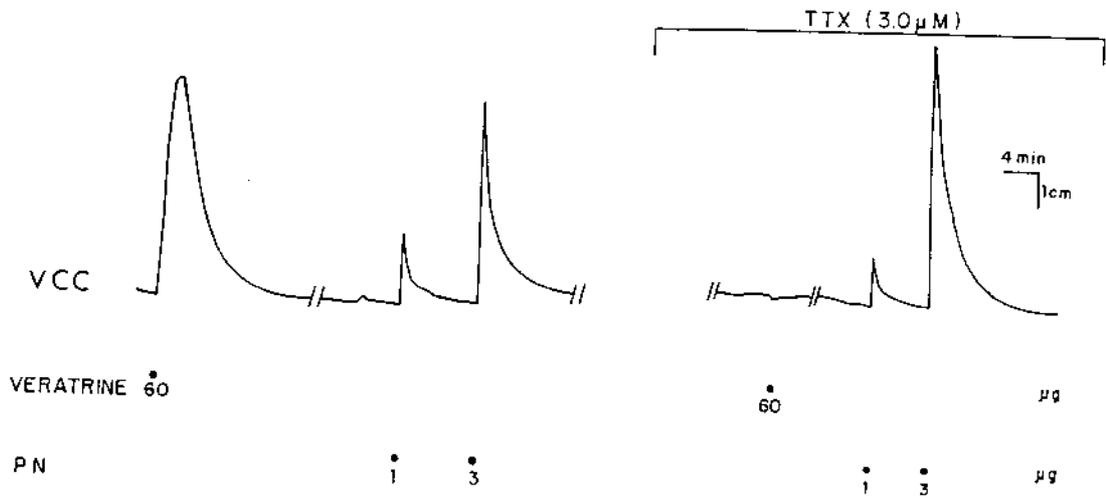


Figura 7- Efeito da tetrodotoxina sobre a atividade contrátil do PN em VCC. Este tecido foi superfundido em cascata conforme descrito em Métodos. Observe que TTX não afetou a contração induzida pelo PN. O traçado apresentado é representativo de três experimentos realizados.

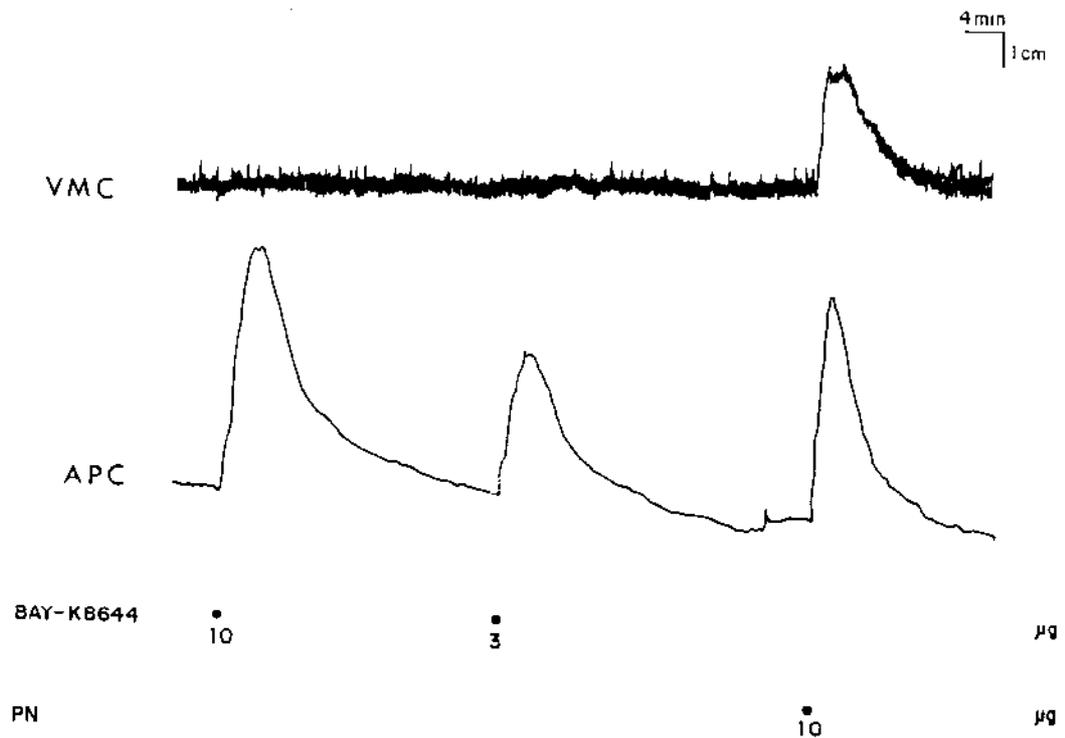


Figura 8- Perfil contrátil do PN e Bay-K 8644 em VMC e APC. O tecido foi superfundido em cascata conforme descrito em Métodos. Note que o veneno de PN contraiu VMC e APC, enquanto o Bay-K 86644 contraiu somente APC. Este resultado foi observado em três outros experimentos.

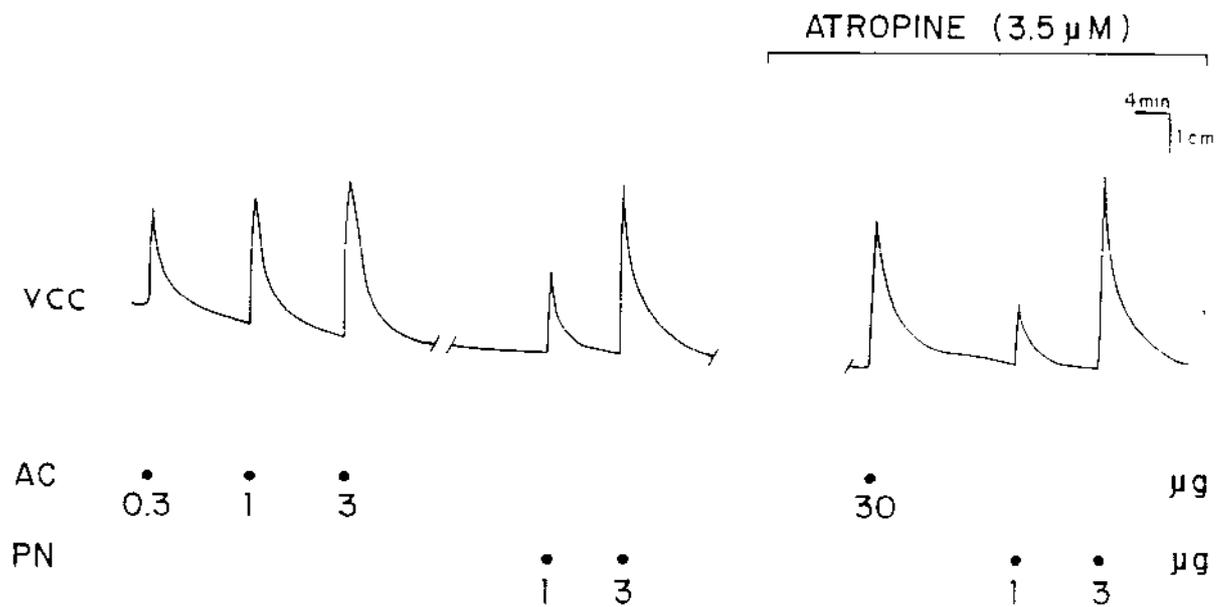


Figura 9- Efeito da atropina sobre atividade contrátil do PN em VCC. O tecido foi superfundido em cascata conforme descrito em Métodos. Note que a contração induzida pelo PN não foi afetada pela atropina. Resultados similares foram obtidos em outros três experimentos.

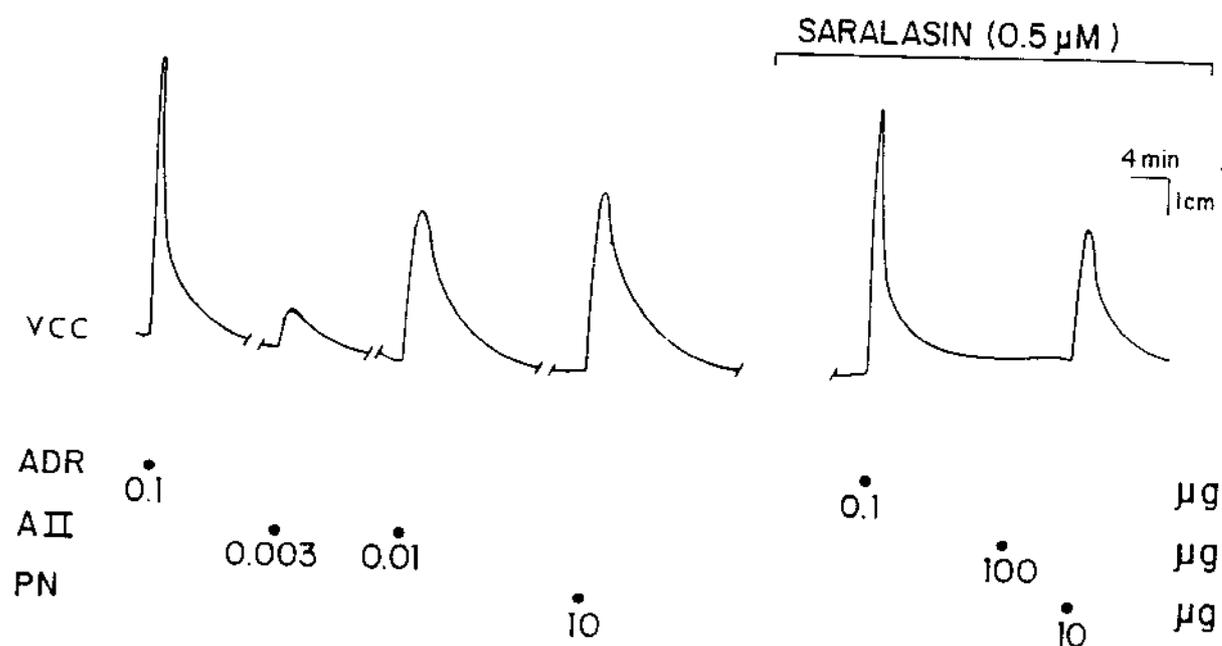


Figura 11- Efeito da saralasin sobre atividade contrátil do PN em VCC. O tecido foi superfundido em cascata conforme descrito Métodos. Observe que o PN manteve a sua contração após a infusão de saralasin. Resultados similares foram obtidos em outros três experimentos.

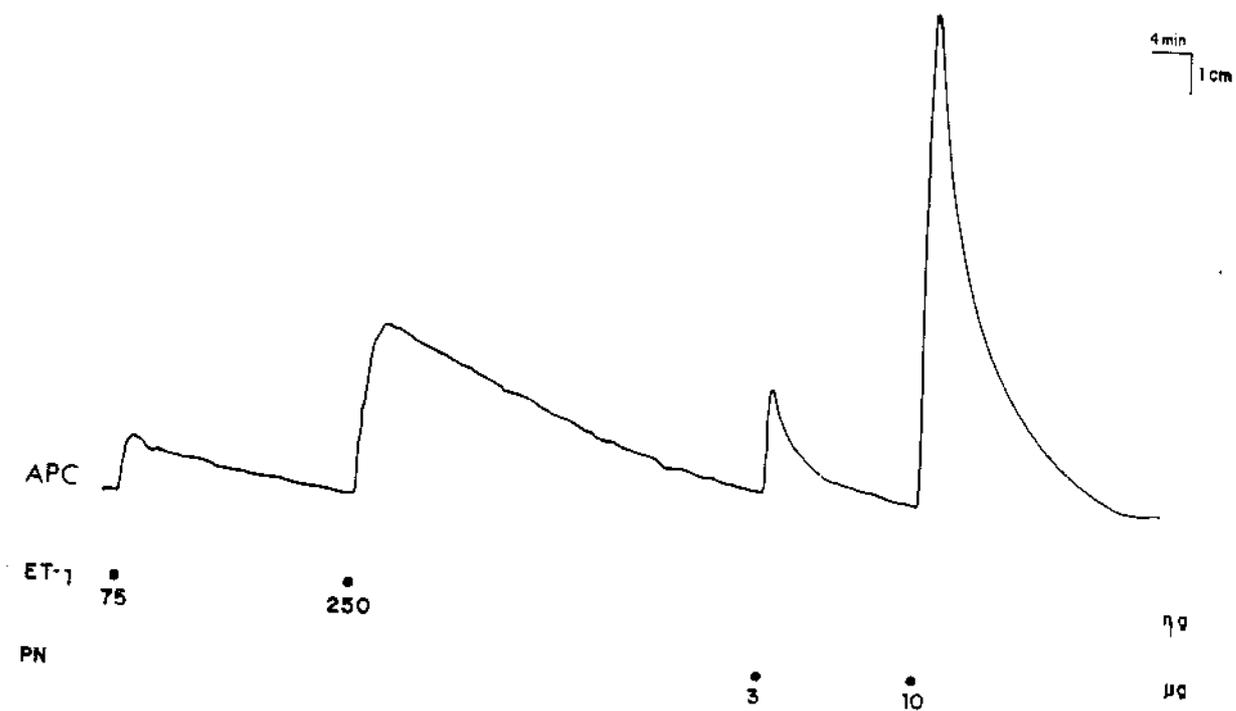


Figura 12 - Comparação entre o perfil contrátil da ET_1 e o PN. Note que a contração do PN em APC é rápida enquanto que a contração da ET_1 é de longa duração.

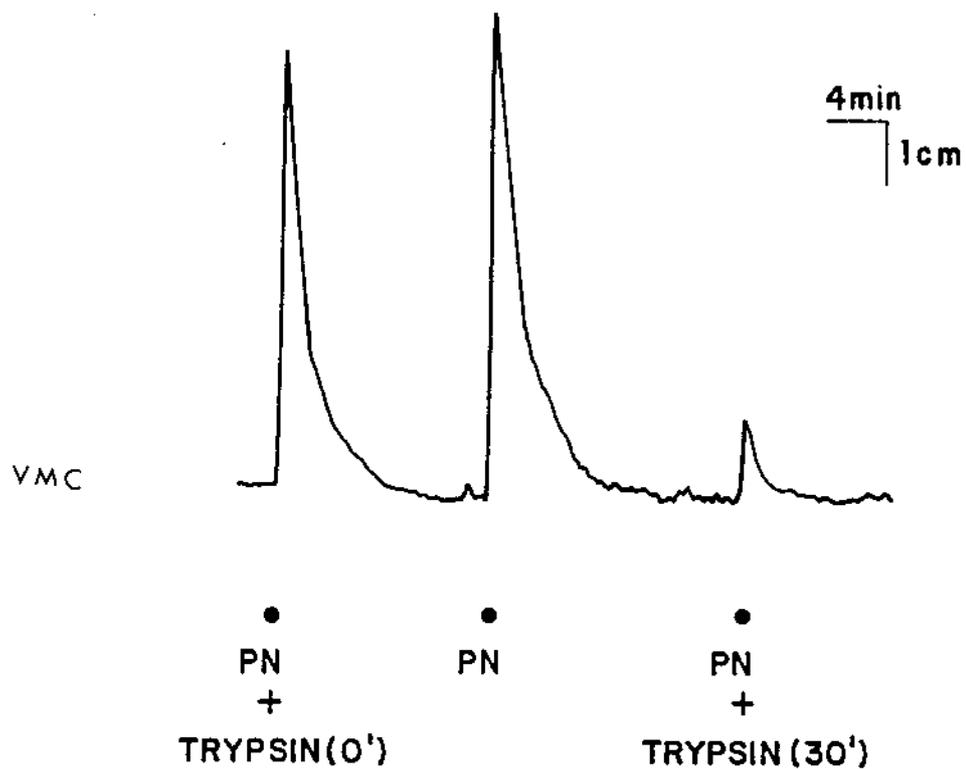


Figura 13- Efeito da incubação do veneno do PN (30 μ g) com tripsina (1000 u/ml, 37°C, 30 min) em tecido liso vascular (VMC). Este tecido foi superfundido em cascata e com incubação do veneno como descrito em Métodos. Observe a redução significativa da atividade contrátil do PN em VMC após a incubação com tripsina. Estes resultados foram repetidos em três outros experimentos.

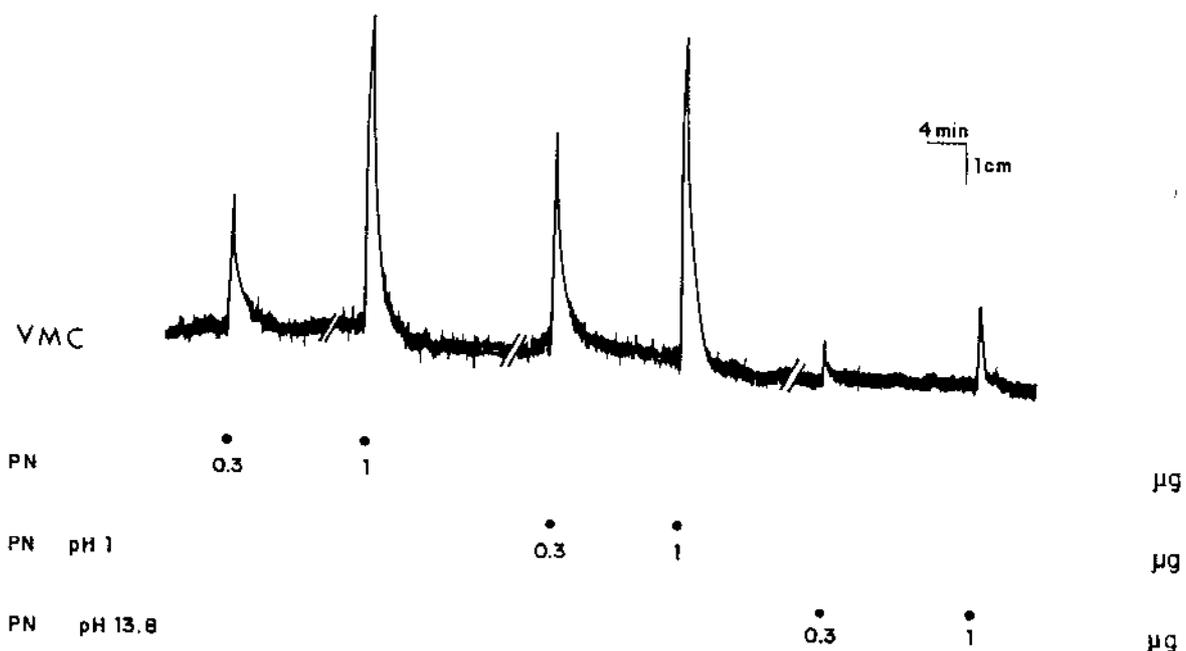


Figura 14_a- Efeito da variação do pH na contração induzida pelo PN em VMC. O tecido foi superfundido em cascata conforme descrito em Métodos. Note que a alcalinização do veneno reduziu significativamente a atividade contrátil do PN. Os resultados foram repetidos em três outros experimentos.

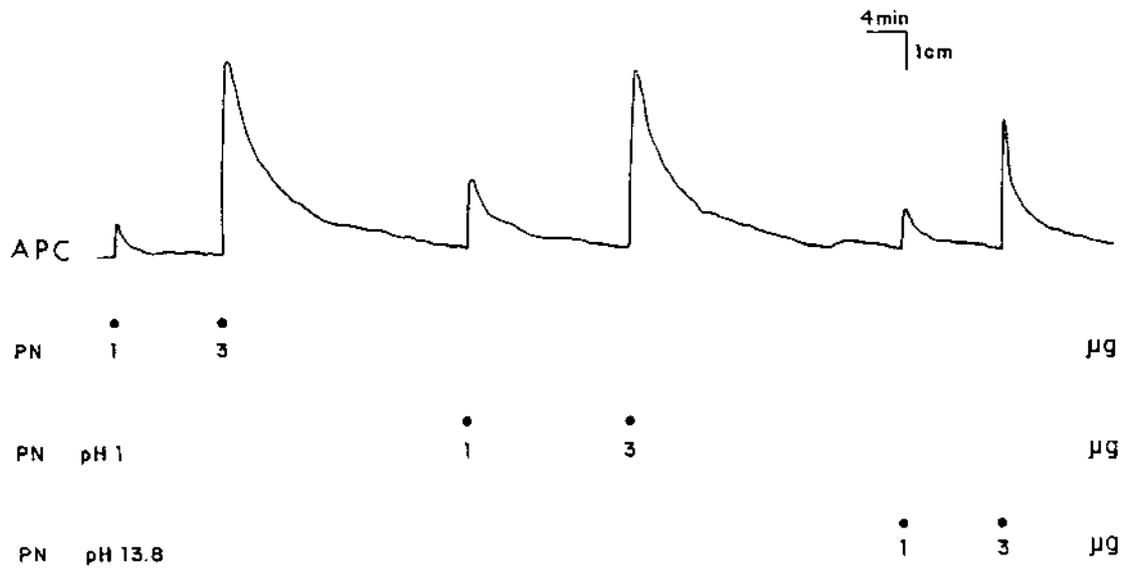


Figura 14_b- Efeito da variação de pH na contração induzida pelo PN em APC. O tecido foi superfundido em cascata conforme descrito em Métodos. Note que a acidificação do veneno não afetou a contração induzida pelo PN. Estes resultados foram repetidos em três outros experimentos.

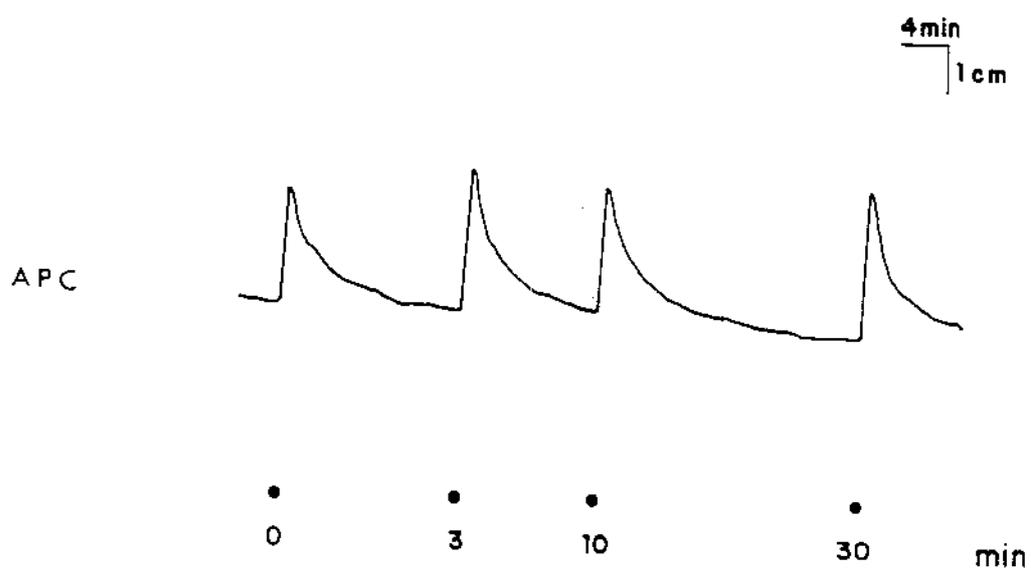


Figura15- Efeito do aquecimento (90 °C) na contração induzida pelo PN (10 µg) em APC. O tecido foi superfundido em cascata conforme descrito em Métodos. Observe que o aquecimento não afetou a contração induzida pelo veneno. Os resultados foram repetidos em três outros experimentos.

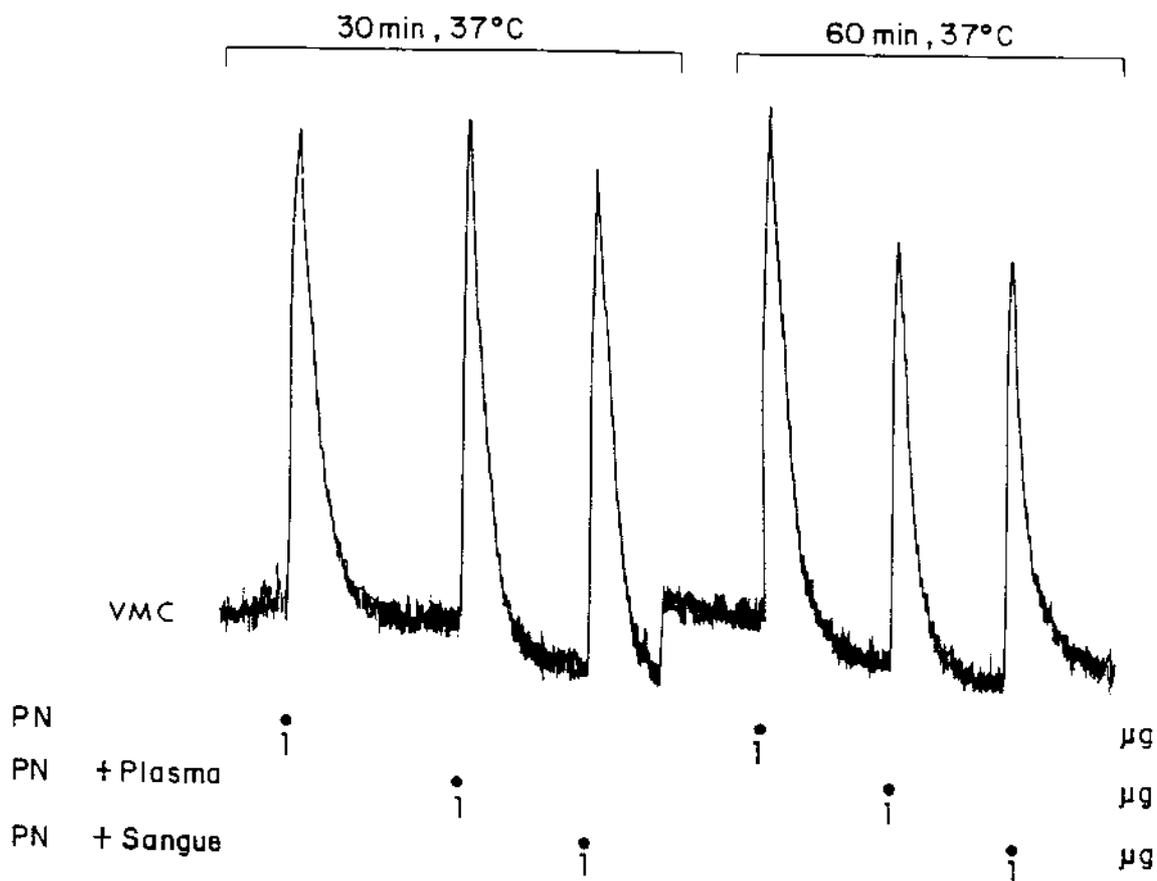


Fig 16- Efeito da incubação do PN com plasma e sangue de coelho em VMC. O PN (1 µg) foi incubado com 1ml de plasma e sangue de coelho respectivamente durante 30 min e 60 min, à 37 °C. Note que a incubação com plasma e sangue total de coelho não afetou a atividade contrátil do PN em VMC. Estes resultados foram repetidos em três outros experimentos.

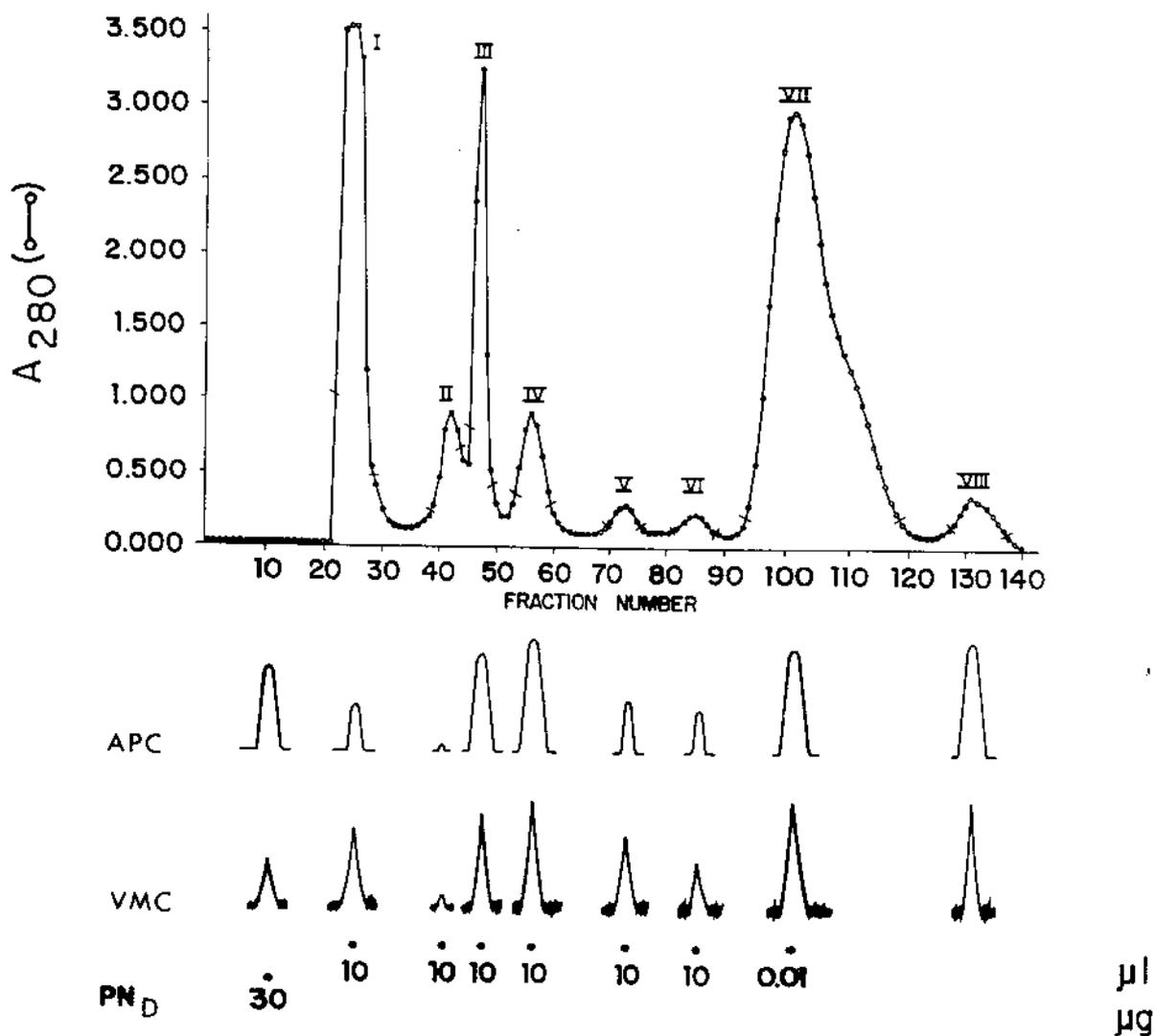


Figura 17- Atividade em músculo liso vascular de coelho das frações (S_I-S_{VII}) provenientes da separação do PN bruto por Sephadex G-10. A coluna (2.5 x 190 cm) foi equilibrada com ácido acético a 2% (v/v). Amostra do veneno foi diluída em ácido acético a 2% e filtrada em gel com fluxo de 13ml/h. As frações foram coletadas a 5°C a 5ml por tubo. Observe que todas as frações apresentaram atividade contrátil em APC e VMC. A fração VII é serotonina quase pura (eletroforese de alta voltagem, resultado não mostrado).

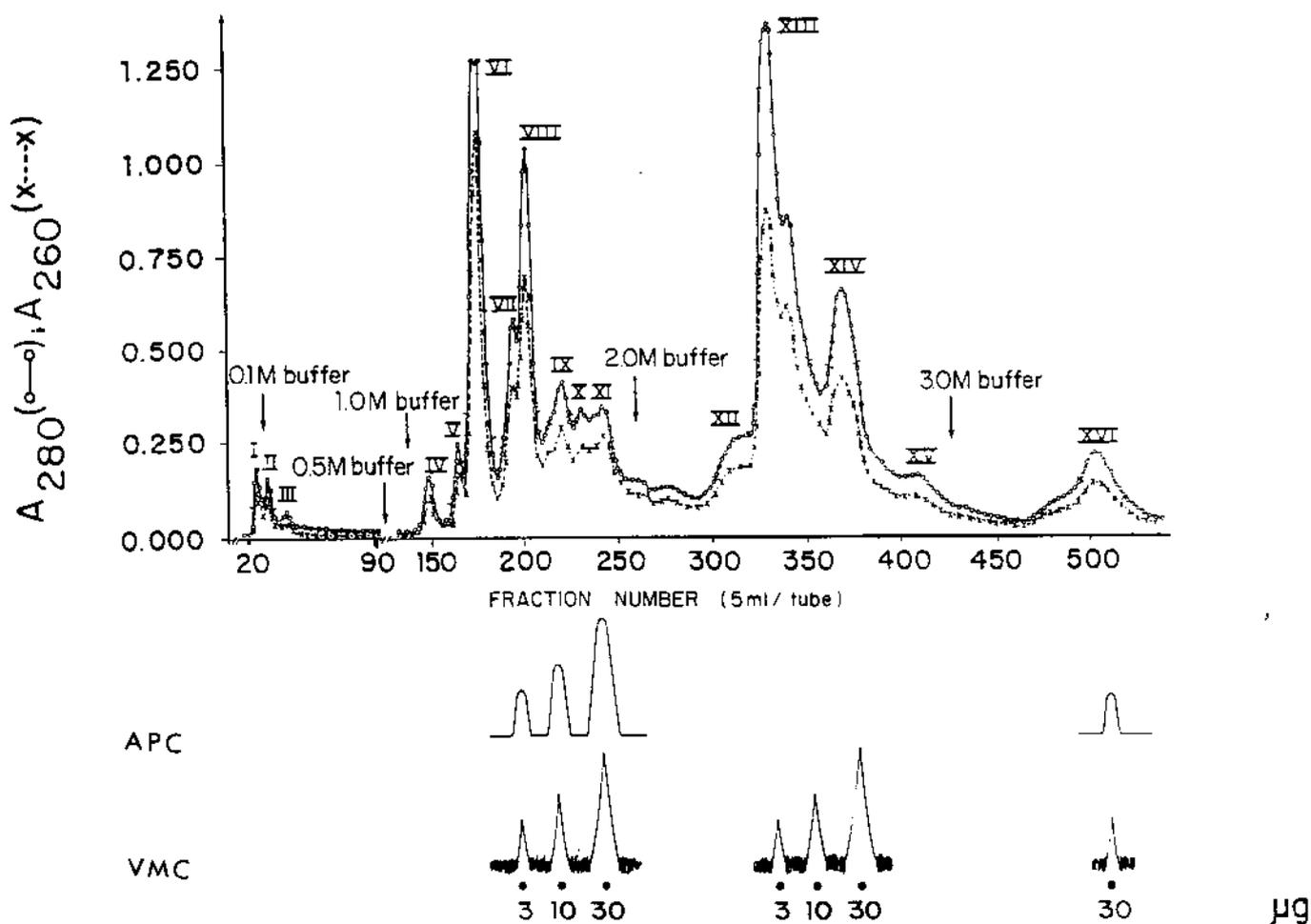


Figura 18- Atividade em músculo liso vascular das frações ($C_I - C_{XVI}$) provenientes da cromatografia por troca iônica da Fração S_I do PN bruto. A coluna (2.5 cm x 55 cm) foi equilibrada com tampão acetato de amônio 0.05 M, pH 5, com fluxo de 20ml por tubo; a seguir foi feita a eluição em concentrações crescentes do tampão (0.1 M - 3 M) com pH 5. As frações foram coletadas a 5°C, 5ml por tubo. Note que somente as frações C_{VII-XI} , C_{XIII} e C_{XVI} apresentaram atividade contrátil em APC ou VMC. Estes resultados foram repetidos em três experimentos. O perfil cromatográfico foi identificado em 260 nm para localização de nucleotídeos.

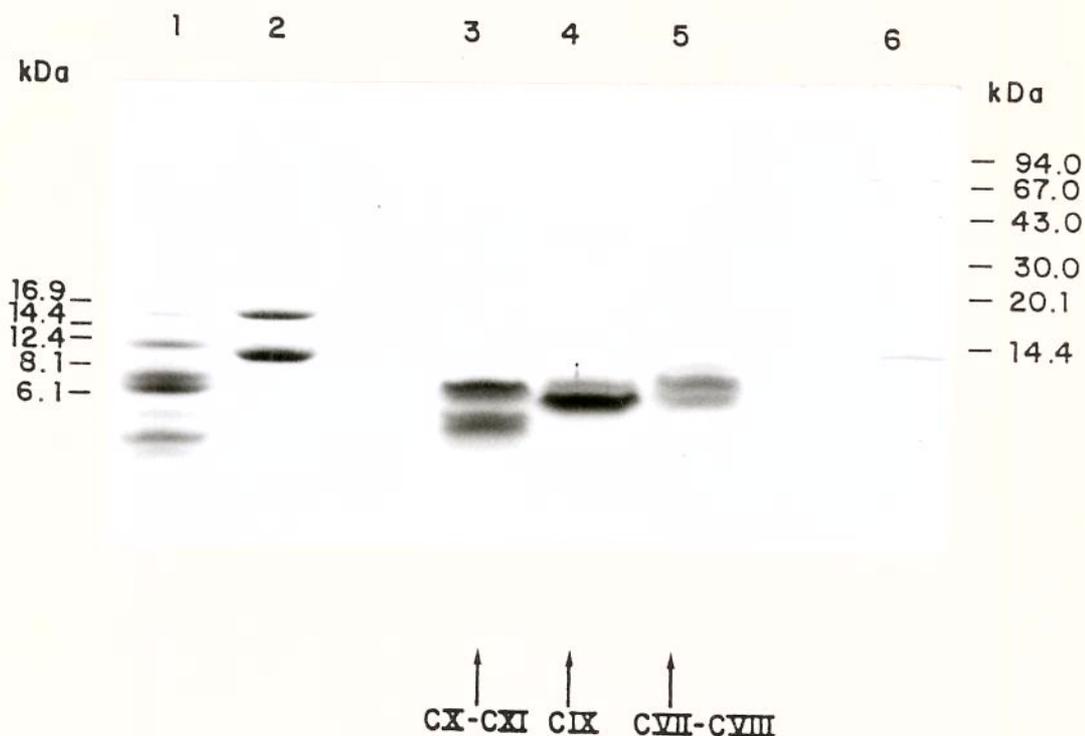


Figura 19- Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida-tricina. Nas frações que apresentaram atividade contrátil em músculo liso vascular como $C_{VII-VIII}$ a massa molecular está compreendida entre 8 - 14 kDa, na fração C_{IX} a massa molecular está compreendida entre 8 - 12 kDa, enquanto a fração C_{X-XI} apresentou massa molecular de 8 - 50 kDa. Os marcadores de massa molecular da linha 1 são : mioglobina polipeptídeo (backbone) - 16.9 kDa, mioglobina (fragmento I + II) - 14.4 kDa, mioglobina (fragmento I) - 8.1 kDa, mioglobina (fragmento II) - 6.2 kDa ; da linha 2 são : mioglobina - 16.9 kDa, citocromo (coração de cavalo) - 12.4 kDa; da linha 3, 4, 5 são : fração C_{X-XI} , C_{IX} , $C_{VII-CVIII}$ do PN; da linha 6 são : fosforilase b - 94 kDa, albumina - 67 kDa, ovoalbumina - 43 kDa, anidrase carbônica - 30 kDa, inibidor de tripsina - 20.1 kDa, lactoalbumina α - 14.4 kDa.

DISCUSSÃO

Nesta tese demonstramos que o veneno de *P. nigriventer* apresenta atividade espasmogênica em músculo liso vascular de coelho. Após realizarmos a purificação parcial (Sephadex G-10 e cromatografia de troca iônica) do veneno de *P. nigriventer*, obtivemos três frações que apresentaram atividade espasmogênica em músculo liso vascular as quais apresentaram algumas bandas eletroforéticas com massa molecular acima de 12 kDa em eletroforese de gel-tricina. Constatamos, em nossos experimentos, que o fator responsável pela atividade contrátil em artérias mesentérica e celiaca foi a serotonina, pois ocorreu redução significativa da atividade espasmogênica na presença de metisergida ou quando o veneno foi dialisado. Este resultado confirma os resultados apresentados por Schenberg & Pereira Lima (1966) que demonstraram no veneno de *P. nigriventer* quantidades variáveis de histamina (0.06 - 1%) e serotonina (0.03 - 0.25%). Esta última foi de fato identificada na fração VII da filtração em Sephadex G-10.

A atividade espasmogênica induzida pelo veneno de *P. nigriventer* em artéria pulmonar e veias jugular, cava e mesentérica não foi reduzida com metisergida ou diálise do veneno, sugerindo a presença no veneno de outras substâncias responsáveis pela contração destes tecidos. Esta(s) substância(s) apresentaram as seguintes características: termoestabilidade, sensibilidade à tripsina e atividade espasmogênica presente após diálise e incubação com sangue e plasma de coelho. Estas particularidades sugerem que estas substâncias possuem natureza peptídica. Schenberg e Pereira-Lima (1971) demonstraram que o veneno de *P. nigriventer* em íleo isolado de cobaia apresentava termoestabilidade e era hidrolizado por enzimas

proteolíticas. Vários peptídeos foram isolados do veneno de *P. nigriventer* (Diniz, et al. 1990; Entwistle, et al., 1982; Rezende, Jr. et al., 1991). Entretanto, todos os peptídeos até o momento caracterizados apresentam peso molecular entre 6-9 kDa, indicando que a atividade espasmogênica observada em músculo liso vascular é devida a peptídeos de composição ainda não identificada.

Os peptídeos até agora identificados apresentam atividade neurotóxica, sendo o mecanismo proposto ativação de canais de sódio de terminação nervosa, com consequente liberação de acetilcolina e catecolaminas (Vital-Brazil, et. al., 1988). Nossos resultados indicam que a atividade espasmogênica induzida pelo veneno de *P. nigriventer* apresenta mecanismo(s) de ação diferentes, visto que o antagonista canais de sódio voltagem-dependente (tetrodotoxina) não mostrou atividade inibitória, assim como o bloqueador adrenérgico alfa, fenoxibenzamina. O uso dos antagonistas de canais de cálcio dihidropiridínicos (Fleckentein, et. al., 1975; Schramm, et. al., 1989) permitiu também afastar o envolvimento destes canais como mecanismo de ação do veneno, (Resultado não mostrado).

A endotelina-1 (ET₁) é um potente peptídeo vasoconstritor de artérias e veias de coelho (de Nucci et al., 1988), isolado de cultura de células endoteliais de aorta de porco (Yanagisawa et al., 1988). Este peptídeo tem homologias com toxinas α -escorpiônicas, conotoxinas, apaminas e principalmente com as sarafotoxinas, toxina esta encontrada no veneno da serpente *Atractaspis engaddensis* (Graur, et. al., 1988/89; Kloog & Sokolowsky, 1989). Entretanto, a comparação no ensaio biológico da atividade contrátil em artérias e veias do veneno de *P. nigriventer* com a ET₁ revelou que apresentam características distintas, pois as contrações induzidas pelo veneno de *P. nigriventer* em músculo liso vascular é de

curta duração, e não prolongada como aquela induzida pela ET₁, afastando, deste modo, a ativação dos receptores de ET₁ como mecanismo de ação do veneno de *P. nigriventer* nestes tecidos.

Com relação a possível relevância da atividade espasmogênica em musculatura vascular aqui descrita, é interessante notar que o veneno de *P. nigriventer* causa aumento da permeabilidade vascular *in vivo* em pele de coelho e rato (Marangoni, et al., 1991). Em ambas as espécies estudadas, o aumento de permeabilidade vascular foi observado com o veneno dialisado sugerindo que este efeito farmacológico seja devido a presença de peptídeos não difusíveis. Outras evidências de envolvimento vascular com o veneno de *P. nigriventer* é o priapismo observado em cães (Schenberg & Pereira Lima, 1966) e em crianças (Jorge & Ribeiro, 1989). A atividade eretogênica foi atribuída a presença de "eretina", peptídeo(s) ainda não identificado quimicamente (Rossi, et. al., 1989; Afeche, et. al., 1990).

O estudo das toxinas permite que a *causa mortis* oriunda do envenenamento por estas toxinas seja apropriadamente tratado. A *causa mortis* do envenenamento humano causado pela peçonha da *P. nigriventer* inclui edema agudo de pulmão e choque neurogênico (Secretária de Saúde do Estado de São Paulo, 1982; Bucarechi, et al. 1987; Jorge & Ribeiro, 1989).

Na fisiopatologia da formação do edema pulmonar (Houssay, 1975), dentre outros mecanismos, encontramos a insuficiência cardíaca que propicia o aumento da congestão venosa levando ao dano capilar e conseqüente aumento de sua permeabilidade, acarretando desequilíbrio pressórico e formação de edema. A liberação de neurotransmissores de terminações nervosas autonômicas em aurículas isoladas de cobaio induzida pelo veneno de *P. nigriventer* (Vital-Brazil, et. al., 1988)

favoreceria o aparecimento de arritmias cardíacas com a formação subsequente de edema pulmonar cardiogênico. Nossos resultados, demonstrando a presença de peptídeos vasoativos no veneno de *P. nigriventer*, juntamente com as evidências da alteração de permeabilidade vascular observada na pele de coelho e rato (Marangoni, et al., 1991), oferece mecanismos de ação alternativos para o edema pulmonar observado no envenenamento humano.

Em estudos posteriores com utilização de cromatografia líquida de alta eficiência, analisador e sequenciador de aminoácidos, acoplados ao ensaio biológico aqui descrito, pretendemos isolar os polipeptídeos responsáveis pela atividade contrátil do veneno de *P. nigriventer* em músculo liso vascular. O conhecimento da estrutura química destes peptídeos e sua utilização como ferramenta farmacológica possibilitará não só um melhor conhecimento dos fenômenos fisiopatológicos do envenenamento humano causado pela *P. nigriventer* mas também utilizá-lo para desenvolvimento de novos fármacos.

Referências Bibliográficas

- Afeche, S.C., Nagamori, A., Magnoli, F.C., Rossi, S.T., Scavone, C., Godoy, M.N., Pereira Lima, F.A. & Schenberg, S. (1990). Isolamento do componente do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* que induz ereção peneniana. V Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambú, 472P.
- Barrio, A. (1955). Spastic action of the venom of the spider *Phoneutria fera*. *Acta Physiol. Latinoamer.* **5**, 132-143.
- Bucarechi, F., Zambrone, F.A.D., Vieira, R.J. & Bueno, L.H.I. (1987). Acidentes por *Phoneutria* sp: Estudo retrospectivo de 41 casos. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Pediatria, São-Paulo, tema livre 37.
- Bucherl, W. (1971). Acúleos que matam. No mundo dos animais peçonhentos. 1ª ed., Melhoramentos. São-Paulo, 35-45.
- Bucherl, W., Lucas, S. & von Eickstedt, V.D. (1969). Spiders of the family Ctenidae, subfamily Phoneutriinae. *Mem.Inst. Butantan* **34**, 47-66.
- Cardoso, J.L.C., Wen, F.H., França, F.O.S., Warrell, D.A. & Theakston, R.D.G. (1990). Detection by enzyme immunossay of *Loxosceles gaucho* venom in necrotic skin lesions caused by spider bites in Brazil. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hygiene* **84**, 608-609.
- Catterall, W.A. (1986) Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 953-985.
- Cruz-Höfling, M.A., Love, S., Brook, G. & Duchen, L.W. (1985). Effects of *Phoneutria nigriventer* spider venom on mouse peripheral nerve. *Quart. J. Exp. Physiol.* **70**, 623-640.
- Cruz-Höfling, M. A., Love, S., Duchen, L.W. (1986). Morphological abnormalities in myelinated nerve fibres caused by *Leiures*, *Centruroides*, and *Phoneutria* venoms and their prevention by tetrodotoxin. *Quart. J. Exp. Physiol.* **71**, 115-122.
- Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. & Ondetti, M.A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* **16**, 5484-5491.

de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T., Vane, J.R. (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9797-9800.

Diniz, C.R. (1963). Separação de proteínas e caracterização de substâncias ativas em venenos de aranhas do Brasil. *An. Acad. Brasileira de Ciências* **35**, 283-291.

Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Rezende, L. Jr, Kelly, P., Fischer, S., Reimann, F., Oliveira, E.B. & Richardson, M. (1990). The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the Brazilian armed spider, *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Letts.* **263**, 251-253.

Entwistle, I.D., Johnstone, R.A.W., Medzihradszky, D. & May, T.E. (1982). Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. *Toxicon* **20**, 1059-1067.

Ferreira, S.H. (1965). A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol.* **24**, 163-169.

Ferreira, S.H. & Vane, J.R. (1967). The detection and estimation of bradykinin in the circulating blood. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **29**, 367-377.

Fleckenstein, A., Nakayama, K., Fleckenstein-Grun, G. & Byon, Y.K. (1975). Interactions of vasoactive ions and drugs with Ca-dependent excitation-contraction coupling of vascular smooth muscle. In: *Calcium transport in contraction and secretion*, ed. E. Carafoli et al., pp. 555-566, , Amsterdam: North-Holland.

Fontana, M.D. & Vital-Brazil, O. (1985). Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **18**, 557-565.

Geren, C.R. (1986). Neurotoxins and necrotoxins of spider venom, *J. Toxicol. Toxin Rev.* **5**, 161-170.

Geren, C.R. & Odell, G.V. (1984). Biochemistry of the spider venom, In: *Handbook of Natural Toxins. Vol. 2.* ed. Tu, A. pp. 441-453. New York : Dekker.

Graur, D., Bdolah, A., Wollberg, Z., & Kochva, E. (1988/89). Homology between snake venom sarafotoxins and mammalian endothelins. *Isr. J. Zool.* **35**, 171-175.

Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952). Quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500-544.

Houssay, B. A. (1975). Función de los capilares. In: *Fisiología Humana*. Buenos-Aires: Libreria El Ateneo Editorial. pp 269-282.

Horackova, M., & Vassort, G. (1973). Ionic mechanism of inotropic effect of veratrine on frog heart. *Pflugers Arch.* **341**, 281-284.

Jackson, H. & Usherwood, N.R. (1988). Spider toxins as tools for dissecting elements of excitatory amino acid transmission. *Trends Neurosci.* **11**, 278-283.

Jorge, M.T. & Ribeiro, L.A.(1989). Acidentes causados por animais peçonhentos. In: *Doenças transmissíveis*. Amato-Neto, V., Baldy, J.L.S.- , São-Paulo: Sanvier. pp 133-141.

Kloog, Y. & Sokolovsky, M. (1989). Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 212-214.

Love, S. & Cruz-Höfling, M.A. (1986). Acute swelling of nodes of Ranvier caused by venoms with slow inactivation of sodium channels. *Acta Neuropathol.* **70**, 1-9.

Lucas, S. (1969). Aranhas da Família Ctenidae, Subfamília Phoneutriinae. *Mem. Inst. Butantan.* **34**, 37-41.

Lucas, S. (1988). Spiders in Brazil. *Toxicon* **26**, 759-772.

Marangoni, R. A., Antunes, E., Brain, S. & de Nucci, G. (1991). Aumento de permeabilidade vascular induzido pelo veneno de *P. nigriventer* em pele de rato e coelho. VI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambú, 354P.

Mello - Leitão, C. (1936). Contribution à l'étude des Ctenides du Brésil. *Festschrift für Prof. Dr. Embrik Strand.* **1**, 1-31.

Mey, J. G. & Vanhoutte, P. M. (1982). Na⁺-K⁺ exchanges in canine arterial and venous smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **243**, H551 - H559.

Ministério da Saúde. (1989). Acidentes araneídicos: contribuição ao estudo da morbidade. Boletim 22.

Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, H., Rochat, C., Lissitzky, S. (1970). Purification of animal neurotoxins. *Eur. J. Biochem.* **16**, 514-523.

Narahashi, T. (1974). Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiol. Rev.* **54**, 813-889.

Narahashi, T., Anderson, N.C., Moore, J.W. (1966). Tetrodotoxin does not block excitation from inside the nerve membrane. *Science* **153**, 765-767.

Paton, W. D. M. (1957). A pendulum auxotonic lever. *J. Physiol. (London)* **137**, 35P.

Rezende, L. Jr., Cordeiro, M.N., Oliveira, E.B. & Diniz, C.R. (1991). Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "Armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* **29**, 1225-1233.

Rossi, S.T., Afeche, S.C., Scavone, C., Magnoli, F.C., Pereira Lima, F.A., Schenberg, S. (1990). Alterações comportamentais induzidas pela administração intracerebral do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. IV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambú, 303P.

Secretaria de Saúde do Estado de São-Paulo (1982). Normas gerais para o tratamento de acidentes humanos por animais peçonhentos. 20P.

Schagger, H. & Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

Schenberg, S. & Pereira Lima, F.A. (1962). Estudo farmacológico do veneno de *Phoneutria fera*. *Ciência e Cultura* **14**, 237P.

Schenberg, S. & Pereira Lima, F.A. (1966). Pharmacology of the polypeptides from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Mem. Inst. Butantan* **33**, 627-638.

Schenberg, S. & Pereira Lima, F.A. (1971). *Phoneutria nigriventer* venom: pharmacology and biochemistry of its components. In *Venoms animals and their venoms*. Vol.3. ed. Bucherl, W. & Buckley E.E. pp. 279-297. New York: Academic Press.

Schenberg, S. & Pereira Lima, F.A. (1978). Venoms of the Ctenidae. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol 48. ed. Heffter - Heuber New Series. pp. 217 - 244. Berlin: Springer-Verlag.

Schenone, H. & Letonja, T. (1975). Notas sobre la biología y distribución geográfica de las arañas del género *Loxosceles*. *Bol. Chil. Parasit.* **30**, 27-29.

Schiapelli, R. D. & de Pikelin, B. S. G. (1966). Estudio comparativo de *Phoneutria fera* (Perty, 1833) y *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) (Aranea: Ctenidae). *Mem. Inst. Butantan* **33**, 675-682.

Schramm, M., Thomas, G., Towart, R. & Franckowiak, G. (1983). Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca^{2+} channels. *Nature* **303**, 535.

Skinner, W. S., Adams, M. E., Quistad, G. B., Kataoka, H., Cesarin, B. J., Enderlin, F. E. & Schooley, D. A. (1989). Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider *Aperta*. *J. Biol. Chem.* **264**, 2150-2155.

Sutherland, S.K. (1978). Venoms of the Ctenidae. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 48, ed. Heffter - Heuber new Series. pp. 127-148. Berlin: Springer-Verlag.

Tokuyama, T. Daly, J. & Witkop, B. (1969). The structure of batrachotoxin, a steroidal alkaloid from Colombian arrow poison frog, *Phylobates aurotaenia*, and partial synthesis of batrachotoxin and its analogs and homologs. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 3931-3938.

Trejós, A., Trejós, R. & Zeldón, R. (1971). Aracnidismo por *Phoneutria* en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **19**, 241-249.

Vane, J.R. (1964). The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br. J. Pharmacol.* **23**, 360-373.

Vital Brazil & Vellard, J. (1925). Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. I. *Mem. Inst. Butantan* **2**, 5-77.

Vital Brazil & Vellard, J. (1926a). Contribuição ao estudo do veneno das aranhas .II. *Mem. Inst. Butantan* **3**, 3-77.

Vital Brazil & Vellard, J. (1926b). Contribuição ao estudo do veneno das aranhas .III. *Mem. Inst. Butantan* **3**, 243-294.

Vital Brazil, O., Leite, G.B. & Fontana, M.D. (1988). Modo de ação da peçonha da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaia. *Ciência e Cultura* **40**, 181-185.

Vital Brazil, O. (1987). Spider venoms acting on the sodium channel. *Mem. Inst. Butantan* **49**, 25-33.

von Eickstedt, V.R.D. (1969). Aranhas da Família Ctenidae, Subfamília Phoneutriinae. *Mem. Inst. Butantan* **34**, 33-36.

von Eickstedt, V.R.D. & Bucherl, W. (1969). Aranhas da Família Ctenidae, Subfamília Phoneutriinae. *Mem. Inst. Butantan* **34**, 43-45.

von Eickstedt, V.R.D. (1978/79). Estudo sistemático de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) e *Phoneutria keyserlingi* (Pickard-Cambridge, 1897) (Araneae; Labidognatha; Ctenidae). *Mem. Inst. Butantan* **42/43**, 92-126.

Wiesner, K., Kao, W., & Jay, E.W.K. (1969). The relation V_{max} to I_{Na} , G_{Na} and h_{inf} in a model of the cardiac Purkinje fiber. *Biophys. J.* **25**, 407-420.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yasaki, Y., Goto, K. & Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411-415.

Abstract

The effects produced by *Phoneutria nigriventer* ("armed spider") venom (PNV) in rabbit vascular smooth muscle have been investigated. De-endothelialized vascular strips were superfused in a cascade system with oxygenated (95% O₂ /5% CO₂) and warmed (37°C) Krebs' solution at 5 ml/min. PNV (0.3-30 µg) produced dose-dependent contractions in both venous and arterial tissues (cava, mesenteric and jugular veins and pulmonary, mesenteric and coeliac arteries, respectively). Methysergide did not significantly affect PNV-induced contractions in venous tissues or in pulmonary artery indicating that serotonin is not involved. Furthermore, dialysis of the venom for up to 48 h did not alter this contractile activity. Neither tetrodotoxin nor phenoxybenzamine significantly affected PNV-induced contractions suggesting that voltage-dependent sodium channel activation and endogenous catecholamine release from vessel wall autonomic nerve endings are also not involved in the PNV response. The incubation with trypsin reduced significantly PNV-induced contractions suggesting that the venom contains polypeptides. Following gel-filtration, ion-exchange chromatography and tricine SDS- PAGE electrophoresis of the PNV, 8 fractions (mw 8-50 kDa) with contractile activity were isolated.