SORAIA MARIA DO NASCIMENTO

MOLÉCULAS BIOATIVAS DO VENENO DA ARANHA MIGALOMORFA Avicularia juruensis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo 2016

SORAIA MARIA DO NASCIMENTO

MOLÉCULAS BIOATIVAS DO VENENO DA ARANHA MIGALOMORFA Avicularia juruensis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Pedro Ismael da Silva Junior

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Nascimento, Soraia Maria do. Moléculas biotivas do veneno da aranha migalomorfa *Avicularia juruensis* / Soraia Maria do Nascimento. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Estudo de venenos.

Versão do título para o inglês: Bioactive molecules from the venom of mygalomorph spider Avicularia juruensis

1. Avicularia juruensis 2. Veneno 3. Moléculas bioativas 4. Peptídeos antimicrobianos - PAMs 5. Metaloproteinase I. Silva Junior, Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0110/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Soraia Maria do Nascimento.

Titulo da Dissertação: Moléculas biotivas do veneno da aranha migalomorfa Avicularia juruensis.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a, considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a)	() Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome:		
	Instituição: .		
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição: .		
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição: .		
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição: .		



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil

Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505 ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 20 de agosto de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Moléculas bioativas de veneno da aranha Migalomorfa *Avicularia juruensis*", protocolo nº. I-1119/13, sob a responsabilidade de Pedro Ismael da Silva Jr. e Soraia Maria do Nascimento, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

L. Santoro T. Mardel Coordenador da CEUAIB

Aos meus pais, Luiz e Conceição, e à minha irmã, Juliana, meus alicerces! Nada teria conseguido sem o apoio e a dedicação de cada um de vocês. Também ao meu namorado, Raí, que tornou estes últimos quatro anos ainda mais felizes!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Luiz e Conceição, e à minha irmã, Juliana, por todo o amor, dedicação e suporte que sempre me deram. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível!

Ao Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior, por ter me acolhido em seu laboratório e ter acreditado na minha capacidade de realizar este trabalho. Por todos os seus ensinamentos, orientação e confiança em mim depositada.

Aos meus amigos do Setor de Química de Proteínas, sempre presentes nessa jornada, dando apoio e também garantindo momentos de diversão! Aos atuais: Thiago, Laura, Andrea Grespan, Andrea Roa, Carol, Débora, Elisa, Katie, Sandra e Rosa. E aos que não estão mais no laboratório, mas que não deixaram de ser importantes: Gabriela, Pedro Godoy, Ivan e Thais. Muito obrigada pela ajuda e amizade de todos vocês. Peço perdão se me esqueci de alguém, somos uma família muito grande!

A todos os alunos e pesquisadores dos demais setores do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, que sempre me ajudaram quando precisei, em especial Dra. Milene, Dra. Ana Karina, Eduardo e Débora, que me ajudaram tantas vezes a esclarecer as mais diversas dúvidas. Também a todos os funcionários, sem exceções, que sempre atenderem aos meus pedidos e que são essenciais para o bom funcionamento do laboratório. Um agradecimento especial ao Ismael, que sempre me auxiliou quando precisei usar os espectrômetros de massa.

À equipe do setor de Genômica e Transcriptômica, Mariana, Nancy, Dra. Úrsula, Dr. Milton e Dr. Inácio, pela realização da etapa de análise transcriptômica.

À Dra. Solange Serrano, antiga diretora do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, e à Dra. Mônica Lopes Ferreira, atual diretora, por permitirem que eu realizasse meu trabalho neste laboratório.

Ao Dr. Rogério Bertani, Dra. Caroline Fukushima e Alex, do Laboratório de Ecologia e Evolução, que sempre foram atenciosos quando precisei de ajuda na identificação de alguma espécie.

Aos colaboradores externos, Dr. Rafael Sutti e Thiago Abreu, por me esclarecerem diversas dúvidas. Ao Dr. Thomaz Rocha-e-Silva, por ter me ensinado a fazer a extração do veneno, essencial para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado, Raí, que sempre esteve presente em todos os momentos, me ouvindo, apoiando e ajudando inúmeras vezes. Por ter tornado essa jornada mais leve e ainda melhor. Pelo seu amor, carinho e dedicação!

À minha segunda família: meus sogros Sr. Antônio e D. Ieda, meus cunhados Everton, Erivelton, Rafael e Fábio, minhas cunhadas Kelly, Leila e Débora, e meu sobrinho Victor. Muito obrigada por tudo!

Às minhas eternas amigas de faculdade, Débora, Natália, Annely, Kelly e Hellen, vocês estiveram presentes durante toda a graduação e continuaram sendo tão importantes depois dela.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, que sempre foram prestativos e resolveram meus problemas.

Ao programa de pós-graduação Interunidades em Biotecnologia e ao Instituto Butantan.

Ao CNPq e à FAPESP, pela bolsa auxílio e pelo apoio financeiro ao projeto.

Muito obrigada a todos vocês!

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."

Madre Tereza da Calcutá

RESUMO

Nascimento SM. Moléculas bioativas do veneno da aranha migalomorfa *Avicularia juruensis*. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

As aranhas são animais que habitam diversos ambientes e essa ampla distribuição sugere que elas possuam mecanismos de defesa eficientes, um deles é a produção de veneno, que é produto de vários anos de evolução e tem diversidade molecular estimada em até 12 milhões de compostos. Os venenos de aranhas podem vir a ser boas fontes de moléculas com potencial terapêutico e biotecnológico, já que contêm grande número de componentes biologicamente ativos. Visto estes fatos, esse estudo teve como objetivo analisar moléculas bioativas presentes no veneno da aranha migalomorfa Avicularia juruensis, com foco em peptídeos antimicrobianos - PAMs e enzimas. O veneno foi extraído por estimulação elétrica e, através das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa, ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido e análise por espectrometria de massas, foram identificados e caracterizados sete PAMs: Avilina, que apresentou ação antimicrobiana contra Escherichia coli SBS 363; Juruína (já descrita em outro trabalho) e Juruína_2 (uma isoforma da Juruína), que impediram o crescimento de todos os microrganismos testados; Avinina, Aviensina, Juruenina e Juruensina, que foram eficazes contra as bactérias E. coli SBS 363 e Micrococcus luteus A270. Todos esses peptídeos possuem o motivo "nó de cistina" do tipo inhibitory cysteine knot - ICK em sua estrutura e apresentaram similaridade com neurotoxinas de venenos de outras espécies de aranhas. O perfil eletroforético do veneno de A. juruensis indicou que ele é bastante complexo, possuindo moléculas com massa entre 130 e abaixo de 10 kDa. Comparando-se com o veneno de outras aranhas terafosídeas foi possível observar que em todos eles há a presença de proteínas com massa molecular acima de 100 kDa, com massa aproximada de 40-45 kDa e menores que 15 kDa. Apesar das semelhanças observadas, cada espécie tem um perfil eletroforético específico para seu veneno, que pode ser resultado evolutivo da diversidade alimentar de cada indivíduo. Através dos testes de zimografia e ensaio de atividade caseinolítica observou-se que o veneno de A. juruensis é capaz de degradar a caseína. Utilizando espectrometria de massas e análise transcriptômica foi possível identificar uma metaloproteinase, que possui domínios conservados típicos de proteínas do tipo ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase). Diferentemente da maioria, esta metaloproteinase possui sítio ativo composto pela sequência HMxxHxxGxxH, com uma metionina no lugar do ácido glutâmico, o que parece não afetar sua ação proteolítica. Avaliando os resultados da análise transcriptômica foram identificadas outras cinco metaloproteinases. Elas possuem domínios conservados comuns de ADAMs, MMPs (Matrix Metalloproteinases) e metalopeptidases do tipo astacina-like. A presença de todas estas enzimas é, provavelmente, importante para a digestão extracorpórea do alimento, visto que esta aranha geralmente consome pequenas aves. Os resultados obtidos mostram que o veneno de A. juruensis é rico em compostos de diferentes naturezas que, futuramente, podem vir a ter uma aplicação biotecnológica. O estudo de venenos de aranhas da família Theraphosidae é bastante importante, visto que este é um grupo pouco estudado em comparação a aranhas de importância médica, como as do gênero Latrodectus e Loxosceles.

Palavras-chave: *Avicularia juruensis.* Veneno. Moléculas bioativas. Peptídeos antimicrobianos - PAMs. Metaloproteinase.

ABSTRACT

Nascimento SM. Bioactive molecules from the venom of mygalomorph spider *Avicularia juruensis*. [Master thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The spiders are animals that inhabit almost every environment. This broad distribution suggests they have efficient defense mechanisms, one of them is the venom production, result of several years of evolution. Spider venoms have an estimated molecular diversity within 12 million compounds and can be good sources of molecules with therapeutic and biotechnological potential. Thus, this study aimed to analyze bioactive molecules present in the venom of the mygalomorph spider Avicularia juruensis, focusing on antimicrobial peptides - AMPs and enzymes. The venom was extracted by electrical stimulation. By reverse-phase high performance liquid chromatography, liquid growth inhibition assay and mass spectrometry, seven AMPs were identified and characterized: the Avilina has antimicrobial activity against Escherichia coli SBS 363; Juruin (already described in other work) and Juruin_2 (a Juruin isoform) inhibited the growth of all tested microorganisms; Avinina, Aviensina, Juruenina and Juruensina have antimicrobial activity against E. coli SBS 363 and Micrococcus luteus A270. All these peptides have inhibitory cystine knot motif -ICK and they showed similarity with venom neurotoxins from others spiders species. The electrophoretic profile of A. *juruensis* venom shows that it is quite complex. It has molecules with molecular masses between 130 kDa and below 10 kDa. Compared with the venom of other theraphosidae spiders was observed that all of them have proteins with molecular mass above 100 kDa, with approximate molecular mass of 40-45 kDa and smaller than 15 kDa. Despite the similarities, each species has a specific electrophoretic profile for their venom, which can be an evolutionary result of food diversity of each individual. By zymography and caseinolytic activity assay was noted that the A. juruensis venom is capable to degrade casein. Combining mass spectrometry and transcriptomic analysis yielded the identification of one metalloproteinase, it has typical conserved domains of ADAM proteins (A Disintegrin And Metalloproteinase). Unlike most, this metalloproteinase has active site composed by the HMxxHxxGxxH motif. The substitution of a methionine in the site where a glutamate is usually found apparently does not affect this enzyme function. Studying the results of transcriptomic analysis another five metaloproteinases were identified. These enzymes showed conserved domains typical from ADAMs, MMPs (Matrix Metalloproteinases) and astacin-like metallopeptidases. Because this arboreal species has broad feeding habits, including bird chicks, these metalloproteinases in their venom may be involved in a key role during pre-oral digestion. The obtained results shows that A. juruensis venom is rich in different compounds, which can have a biotechnological application. The study of Theraphosidae spider venom is important to describe its composition, since this group is less studied in comparison to spiders with medical importance, such as Latrodectus spp. and Loxosceles spp.

Kaywords: *Avicularia juruensis.* Venom. Bioactive molecules. Antimicrobial peptides - AMPs. Metalloproteinase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Divisões e estruturas do corpo de um quelicerado
Figura 2 - Disposição das quelíceras de aranhas migalomorfas23
Figura 3 - Disposição das quelíceras de aranhas araneomorfas
Figura 4 - Exemplos de mini proteínas que possuem os três tipos de motivos "nó de cistina"
Figura 5 - Três modelos de desnaturação de membranas celulares causadas por peptídeos antimicrobianos
Figura 6 - A espécie Avicularia juruensis
Figura 7 - Extração de veneno de uma fêmea da espécie Avicularia juruensis
Figura 8 - Representação do ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido
Figura 9 - Fórmula com a qual foi feito o cálculo da porcentagem de hemólise
Figura 10 - Etapas da remoção da glândula de veneno de fêmeas de Avicularia jururensis 44
Figura 11 - Perfil cromatográfico do veneno de <i>Avicularia juruensis</i> , obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa semi-preparativa Júpiter C18 (Phenomenex)
Figura 12 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 3, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu)
Figura 13 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 36, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu)
Figura 14 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 37, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu)
Figura 15 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 38, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu)
Figura 16 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 40, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu)

Figura 17 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 45, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu)
Figura 18 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 49, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu)
Figura 19 - Resultado obtido na análise da fração 3_2 em buscas realizadas com a ferramenta Mascot [®]
Figura 20 - Alinhamento e comparação da Avilina com a theraphotoxina U12-TRTX-Hs1a do veneno da aranha <i>Haplopelma schmidti</i>
Figura 21 - Alinhamento da Avilina com diferentes toxinas do veneno de aranhas que possuem o motivo "nó de cistina" do tipo <i>inhibitory cysteine knot</i>
Figura 22 - Resultado obtido nos ensaios hemolíticos realizados com diferentes concentrações de Avilina
Figura 23 - Gráfico indicando as porcentagens de hemólise das hemácias humanas incubadas com diferentes concentrações de Avilina
Figura 24 - Resultado obtido na análise das frações 36_4, 36_5, 37_3, 37_4, 38_6, 38_7, 40_4 e 40_5 em buscas realizadas com a ferramenta Mascot [®]
Figura 25 - Resultado obtido nas análises por espectrometria de massas das frações antimicrobianas 36_4, 36_5, 37_3, 37_4, 38_6, 38_7, 40_4 e 40_5 feitas no software PEAKS 7.5
Figura 26 - Resultado obtido nas análises por espectrometria de massas das frações antimicrobianas 36_4, 36_5, 37_3, 37_4, 38_6, 38_7, 40_4 e 40_5 feitas no software PEAKS 7.5
Figura 27 - Alinhamento e comparação do <i>contig</i> Ajur67205_seq1 e da Juruína com a hainantoxina HNTX-II-8 do veneno da aranha <i>Haplopelma hainanum</i>
Figura 28 - Determinação das massas moleculares das frações 36_4, 36_5, 37_3, 37_4, 38_6, 38_7, 40_4 e 40_5 através do software MassAnalyzer 1.03
Figura 29 - Resultado obtido no cálculo da massa molecular da Juruína_2
Figura 30 - Resultado obtido na análise por espectrometria de massas da fração antimicrobiana 45_5 feita no software PEAKS 7.5
Figura 31 - Resultado obtido na análise por espectrometria de massas da fração antimicrobiana 45_6 feita no software PEAKS 7.5
Figura 32 - Alinhamento e comparação da Juruenina com as theraphotoxinas Delta-TRTX-Cg1a e U10-TRTX-Cg1a do veneno da aranha <i>Chilobrachys guangxiensis</i>

Figura 34 - Alinhamento da Juruenina e da Juruensina com as theraphotoxinas Delta-TRTX-Cg1a e U10-TRTX-Cg1a do veneno da aranha Chilobrachys guangxiensis, e com as theraphotoxinas U5-TRTX-Hhn1a e U6-TRTX-Hhn1a do veneno da aranha Haplopelma Figura 35 - Determinação da massa molecular da Juruensina, realizada através do software Figura 36 - Resultado obtido na análise por espectrometria de massas da fração Figura 37 - Resultado obtido na análise por espectrometria de massas da fração antimicrobiana 49_8 feita no software PEAKS 7.5......74 Figura 38 - Alinhamento e comparação da Avinina com as hainantoxinas HNTX-XVIII-5 e Figura 39 - Alinhamento e comparação da Aviensina com as hainantoxinas HNTX-XVIII-7 e Figura 40 - Alinhamento da Avinina e da Aviensina com as hainantoxinas HNTX-XVIII-5, HNTX-XVIII.2, HNTX-XVIII-7 e HNTX-XVIII-6 do veneno da aranha Haplopelma Figura 41 - Determinação das massas moleculares da Avinina e da Aviensina através do Figura 42 - Perfil eletroforético do veneno de Avicularia juruensis, analisado sob condições Figura 43 - Perfil eletroforético dos venenos das aranhas terafosídeas Acanthoscurria

Figura 49 - Alinhamento do *contig* Ajur72031_seq10 com três tipos de ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) de Limulus polyphemus e Polistes canadensis, uma

Figura 50 - Regiões de domínios conservados dos *contigs* Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 e Ajur76134_seq1......91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes principais de venenos de aranhas: massas moleculares, função,distribuição entre diferentes famílias e diversidade molecular24

Tabela 2 - Frações isoladas do veneno de Avicularia juruensis que apresentaram atividadeantimicrobiana contra os microrganismos testados.48

Tabela 3 - Frações obtidas na segunda etapa de CLAE-FR que apresentaram atividadeantimicrobiana contra os microrganismos testados.50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a-SCP	Small cationic peptides (com conformação em α-hélice)
Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADAMTSs	ADAM com o motivo tipo thrombospondin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTN	Basic Local Alignment Search Tool - Nucleotídeos
BLASTP	Basic Local Alignment Search Tool - Proteínas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa
СМВ	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
DDH	Disulfide-directed β -hairpin
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
e-value	Expected value
FPKM	Fragments Per Kilobase of Exon Per Million Fragments Mapped
ICK	Inhibitory cysteine knot
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
	(do inglês liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
MMPs	Matrix Metalloproteinases
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PB	Meio de cultura Poor broth
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês phosphate buffered saline)
PDB	Meio de cultura Potato dextrose broth
рН	Potencial hidrogeniônico
pI	Potencial isoelétrico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil

RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RSEM	RNA-Seq Expectation Maximization
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (do
	inglês Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SIAS	Sequence Identity And Similarity
Sisbio	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SVMP	Snake Venom Metalloproteinase
TFA	Ácido trifluoracético (do inglês trifluoroacetic acid)

Unidades de medida

%	Por cento
μg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μΜ	Micromolar
°C	Graus Celsius
Å	Ångström
cps	Íon counts por segundo
Da	Dalton
Hz	Hertz
kDa	Quilodalton
kV	Quilovolts
Μ	Molar
mAU	Mili unidade de absorbância
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mL/minuto	Mililitro por minuto
mM	Milimolar
mm	Milimetro
ms	Milissegundo
mV	Milivolts

m/v	Massa/volume
m/z	Massa/carga
nL	Nanolitro
nL/min	Nanolitro por minuto
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
ppm	Partes por milhão
v/v	Volume/volume
V	Volts
xG	Gravidade

Elementos químicos

Ca^{2+}	Íon de cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CO_2	Dióxido de carbono
HCl	Ácido clorídrico
\mathbf{K}^+	Íon de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
Zn	Zinco

LISTA DE AMINOÁCIDOS

AlaninaA
CisteínaC
Ácido Aspártico D
Ácido Glutâmico E
FenilalaninaF
GlicinaG
HistidinaH
LisinaK
IsoleucinaI
LeucinaL
MetioninaM
AsparaginaN
ProlinaP
GlutaminaQ
ArgininaR
SerinaS
Treonina T
ValinaV
TriptofanoW
TirosinaY

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Venenos de aranhas	24
1.1.1 Compostos de baixa massa molecular	25
1.1.2 Acilpoliaminas	25
1.1.3 Mini proteínas ricas em cisteína	26
1.1.4 Proteínas grandes	27
1.1.5 Enzimas	28
1.1.6 Peptídeos lineares	29
1.1.6.1 Peptídeos antimicrobianos - PAMs	30
1.2 Diversidade do veneno de aranhas	32
1.3 A espécie Avicularia juruensis	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 METODOLOGIA	36
3.1 Animais	36
3.2 Obtenção do veneno	36
3.3 Estimativa da quantidade de proteínas	37
3.4 Fracionamento	37
3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa - CLAE-FR	37
3.4.2 Cromatografia líquida de gel filtração	38
3.5 Bioensaios	39
3.5.1 Ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido	39
3.5.1.1 Concentração mínima inibitória - CMI e concentração mínima bactericida - C	' MB
	40
3.5.1.2 Microrganismos	40
3.5.2 Ensaio hemolítico	40
3.6 Análises bioquímicas	41
3.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE	41
3.6.2 Zimografia em gel de poliacrilamida copolimerizado com caseína	42
3.6.3 Ensaio de atividade caseinolítica	43
3.7 Análise transcriptômica das glândulas de veneno de A. juruensis	43

SUMÁRIO

3.8 Caracterização das moléculas bioativas	45
3.8.1 Digestão proteica em solução (redução, alquilação e tripsinização)	45
3.8.2 Análise por espectrometria de massas	46
3.8.2.1 Buscas em bancos de dados	47
3.8.2.2 Análise bioinformática	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Fracionamento do veneno por CLAE-FR e ensaio de inibição do crescimento microl	viano
em meio líquido	48
4.1.1 Segunda etapa de fracionamento das frações antimicrobianas e ensaio de inibiçã	io do
crescimento microbiano em meio líquido	50
4.1.1.1 Caracterização das frações antimicrobianas	58
4.1.1.1.1 Análise da fração 3_2	58
4.1.1.1.2 Análise das frações 36_4 a 40_5	62
4.1.1.1.3 Análise das frações 45_5 e 45_6	68
4.1.1.1.4 Análise das frações 49_7 e 49_8	72
4.2 Perfil eletroforético do veneno	78
4.3 Zimografia em gel de poliacrilamida copolimerizado com caseína	81
4.4 Cromatografia líquida de gel filtração e ensaio de atividade caseinolítica	82
4.4.1 Caracterização das enzimas identificadas	83
4.4.1.1 Outras metaloproteinases identificadas por análise transcriptômica	89
5 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE	. 108
A - Imagem	. 108
ANEXO	. 116
A - Artigo científico submetido para a revista royal society open science	. 116

1 INTRODUÇÃO

As aranhas formam um dos mais diversos grupos de animais terrestres, com seu registro fóssil mais antigo datando de 300 milhões de anos atrás, no período Carbonífero (Rash, Hodgson, 2002). Elas pertencem ao subfilo Chelicerata, o qual engloba animais caracterizados por possuírem o corpo dividido em cefalotórax e abdômen e não possuírem antenas, característica mais peculiar do grupo. O primeiro par de apêndices destes animais são estruturas alimentares denominadas quelíceras e o segundo par é chamado de pedipalpos, que é modificado para realizar funções variadas. Os pedipalpos são seguidos por quatro pares de pernas (Ruppert, Barnes, 1996) (Figura 1).



Figura 1 - Divisões e estruturas do corpo de um quelicerado. Adaptado de: http://bolboretasgalegas.net

O subfilo Chelicerata é dividido em três classes: Arachnida, Merostomata e Pycnogonida (Ruppert, Barnes, 1996). As aranhas pertencem à Classe Arachnida, Ordem Araneae e são subdivididas em três subordens: Mesothelae, Mygalomorphae e Araneomorphae (Foelix, 2011).

A subordem Mesothelae agrupa aranhas que são consideradas primitivas por possuírem o abdômen segmentado. A família Liphistiidae é a única desta subordem que ainda possui espécies viventes, ela engloba 8 gêneros e 96 espécies, sendo que a sua distribuição é limitada ao Sudeste e Leste da Ásia (World Spider Catalog, 2016; Xu et al., 2015).

A subordem Mygalomorphae é também chamada de Orthognatha, em referência ao alinhamento paralelo das quelíceras das aranhas pertencentes a esse grupo (orto = ângulo quase totalmente reto; gnata = maxilar, queixo), característica que pode ser observada na Figura 2. Ela abrange todo o grupo de aranhas conhecidas como "caranguejeiras" ou "tarântulas", que são, em sua maioria, animais grandes, com glândulas de veneno pequenas posicionadas no segmento basal das quelíceras (Foelix, 2011; Kuhn-Nentwig et al., 2011).

Atualmente, as aranhas migalomorfas estão organizadas em 16 famílias (World Spider Catalog, 2016).



Figura 2 - Disposição das quelíceras de aranhas migalomorfas. **A**) Foto detalhando a disposição paralela das quelíceras. **B**) Ilustração indicando como ocorre a movimentação das quelíceras. Fonte: Foelix, 2011.

A subordem Araneomorphae é também denominada Labidognatha, em referência ao alinhamento perpendicular das quelíceras das aranhas pertencentes a esse grupo (labido = pinça; gnata = maxilar, queixo) (Figura 3). Ela agrupa aranhas que são conhecidas como "aranhas verdadeiras", as quais possuem glândulas de veneno muito longas, que alcançam a parte interna do cefalotórax, e produzem venenos bastante tóxicos, o que levou à possibilidade de subjugarem presas maiores (Foelix, 2011; Kuhn-Nentwig et al., 2011). Atualmente, as araneomorfas estão divididas em 97 famílias, que englobam, aproximadamente, 85% de todas as espécies conhecidas (World Spider Catalog, 2016).



Figura 3 - Disposição das quelíceras de aranhas araneomorfas. **A**) Foto detalhando a disposição perpendicular das quelíceras. **B**) Ilustração indicando como ocorre a movimentação das quelíceras. Fonte: Foelix, 2011.

As aranhas formam um dos grupos mais diversificados em número de espécies, com mais de 46 mil espécies descritas, e estão entre os animais venenosos mais bem sucedidos (Coddington, Levi, 1991; Saez et al., 2010; World Spider Catalog, 2016). Elas distribuem-se por todo o planeta e habitam praticamente todos os ambientes, desde desertos, florestas tropicais, litoral e regiões mais altas, com exceção do ar, oceanos e polos. Algumas, inclusive, se adaptaram a viver próximas ao homem (Escoubas et al., 2000; Foelix, 2011). Por terem uma ampla distribuição e sucesso nos ambientes em que são encontradas, é certo que as

aranhas possuem mecanismos eficientes de defesa contra patógenos. Sendo assim, é possível afirmar que parte do seu êxito na colonização de tantos ambientes se deve aos seus mecanismos de defesa e ao seu sistema imune (Silva Junior, 2000). Um dos fatores que também contribui para o sucesso das aranhas é a produção de veneno bastante tóxico, empregado para capturar presas e como proteção contra possíveis predadores. Esse veneno é produto de milhões de anos de evolução e é constituído de uma complexa mistura de toxinas (Windley et al., 2012).

1.1 Venenos de aranhas

Seis grupos principais de componentes podem ser identificados em venenos de aranhas: compostos de baixa massa molecular, acilpoliaminas, mini proteínas ricas em cisteína, proteínas grandes, enzimas e peptídeos lineares (descritos na Tabela 1) (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013). Esses compostos podem agir como neurotoxinas, citotoxinas e/ou como moduladores de canais iônicos (Vassilevski et al., 2009).

Componente do veneno	Massa (kDa)	Função	Distribuição	Diversidade molecular
Compostos de baixa massa molecular	<1	Variadas	Provavelmente em todos os venenos	Limitada
Acilpoliaminas	<1	Neurotoxinas, atuam em canais de íons	Araneidae e Nephilidae e algumas outras famílias	Limitada
Mini proteínas ricas em cisteína	2-15	Neurotoxinas, atuam em canais de íons	Na maioria das famílias	Muito alta
Proteínas grandes	110- 140	Destroem membranas	Theridiidae	Provavelmente alta
Enzimas	18-44	Destroem membranas e tecidos	Provavelmente em todos os venenos, principais componentes em Sicariidae	Limitada
Peptídeos lineares	1-9	Destroem membranas	Lycosoidae e Zodariidae, provavelmente em outras famílias	Alta

Tabela 1 - Componentes principais de venenos de aranhas: massas moleculares, função, distribuição entre diferentes famílias e diversidade molecular. Adaptado de: Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013.

1.1.1 Compostos de baixa massa molecular

Os venenos de aranhas contêm uma vasta variedade de compostos de baixa massa molecular, como íons, ácidos orgânicos, nucleotídeos, nucleosídeos, aminoácidos, aminas, poliaminas, entre outros, sendo que muitos deles agem como neurotransmissores (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013).

No veneno da espécie *Cupiennius salei*, por exemplo, foi detectada uma quantidade 20 vezes maior de potássio em comparação à sua hemolinfa. Na concentração observada, o potássio é capaz de induzir a despolarização de membranas celulares, causando a paralisia da presa (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013; Wullschleger et al., 2005).

Outro exemplo é o ácido cítrico, cuja presença foi observada no veneno de diferentes espécies de aranhas. Ele desempenha funções como impedir o crescimento bacteriano, agir como um íon negativo, sendo um tampão em contrapartida aos peptídeos catiônicos presentes no veneno, e atuar como quelante de íons metálicos, como o Ca^{2+} e Zn, levando à inativação de enzimas dependentes destes cofatores. Após a inoculação na presa, o ácido cítrico é diluído e as enzimas são ativadas. Essa é, possivelmente, uma estratégia de defesa própria contra o efeito tóxico do veneno (Abreu, 2016; Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013; Odell et al., 1999).

Como a maioria dos estudos que investigam venenos de aranhas costuma focar na análise de peptídeos e proteínas, deixando de lado os compostos de baixa massa molecular, acredita-se que a quantidade e a variedade destas moléculas sejam muito maiores do que a que se conhece atualmente (Kuhn-Nentwig et al., 2011).

1.1.2 Acilpoliaminas

As acilpoliaminas são uma classe de compostos neuroativos que evoluíram especificamente para causar a rápida paralisia da presa (Estrada et al., 2007; Mourão, 2012). Elas têm massa molecular variada entre 350 e 1000 Da e estrutura formada por uma cadeia poliamina central com um ácido carboxílico em uma extremidade e um grupamento amino primário ou guanidina na outra. Geralmente um ou dois resíduos de aminoácidos conectam o anel aromático à cadeia poliamina, mas este pode estar ausente (McCormick, Meinwald, 1993; Mourão, 2012). As acilpoliaminas possuem cargas positivas nas aminas livres e secundárias de sua cadeia, o que explica a sua atividade bloqueadora em canais de íons catiônicos seletivos. Em geral, estas moléculas atuam em canais de Ca²⁺, K⁺ e receptores ionotrópicos (Kuhn-Nentwig et al., 2011).

Além das funções já citadas acima, algumas acilpoliaminas também podem possuir ação antimicrobiana. Em trabalho realizado por Ferreira e Silva Junior (2012), foram descritas 12 acilpoliaminas do veneno da aranha *Nephilengys cruentata* que possuem atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*.

Até o ano de 2011 haviam sido identificadas 176 acilpoliaminas diferentes no veneno de 20 espécies de aranhas. Entre as migalomorfas elas foram encontradas em três famílias: Ctenizidae, Hexathelidae e Theraphosidae (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013).

1.1.3 Mini proteínas ricas em cisteína

As mini proteínas ricas em cisteína têm massa molecular variada entre 2650 e 14800 Da e contêm de 6 a 14 cisteínas. Comumente apresentam uma estrutura chamada motivo "nó de cistina", que é composto por folhas β pregueadas antiparalelas interconectadas por pontes dissulfeto formadas entre as cisteínas presentes na molécula (Ayroza, 2012; Escoubas, Rash, 2004; Norton, Pallaghy, 1998). Estes motivos podem ocorrer em três tipos: *inhibitory cysteine knot* - ICK, *disulfide-directed* β -*hairpin* - DDH ou Kunitz (Kuhn-Nentwig et al., 2011) (Figura 4).



Figura 4 - Exemplos de mini proteínas que possuem os três tipos de motivos "nó de cistina". As que possuem o motivo tipo *inhibitory cysteine knot*: **A**) Huwentoxin-IV de *Haplopelma schmidti*, com seis cisteínas; **B**) ACTX-HI: OB4219 de *Hadronyche infensa*, também com seis cisteínas; e **C**) ω -atracotoxin-Hv1 de *Hadronyche versuta*, com oito cisteínas. **D**) Huwentoxin-II de *H. schmidti*, com seis cisteínas e o motivo *disulfide-directed* β -*hairpin*. **E**) Huwentoxin-XI de *H. schmidti*, com seis cisteínas e o motivo Kunitz. A porção N-terminal das moléculas está indicada pela letra N e as pontes dissulfeto estão marcadas com a cor preta. Adaptado de: Kuhn-Nentwig et al., 2011.

O motivo ICK possui uma estrutura espacial consistindo de três folhas β pregueadas e pontes dissulfeto formadas entre as cisteínas C1-C4, C2-C5 e C3-C6. Em proteínas com oito cisteínas, as pontes dissulfeto têm a seguinte disposição: C1-C4, C2-C5, C3-C8 e C6-C7 (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013; Norton, Pallaghy, 1998).

O motivo DDH é formado por duas folhas β antiparalelas estabilizadas por duas pontes dissulfeto. Uma terceira ponte se forma sem ligar as folhas β . As ligações seguem a disposição: C1-C3, C2-C5 e C4-C6. Este motivo é, provavelmente, o mais ancestral (Kuhn-Nentwig et al., 2011; Shu et al., 2002).

O motivo Kunitz apresenta uma pequena hélice 3_{10} em sua região N-terminal, uma α hélice na região C-terminal e três folhas β antiparalelas, seguindo o padrão de formação de pontes dissulfeto: C1-C6, C2-C4 e C3-C5. Esse tipo de motivo só é encontrado no veneno de duas aranhas da família Theraphosidae: *Haplopelma schmidti* e *Haplopelma hainanum* (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013).

As mini proteínas são efetivas até em concentrações nanomolares. Elas atuam principalmente em proteínas de membrana de células neuronais e musculares, modulando canais iônicos de cálcio, sódio e potássio, além de receptores químicos, mecânicos e térmicos. Elas inibem, ativam ou afetam estes canais e receptores, alterando o fluxo normal de íons e prejudicando o transporte de impulsos ao longo das células (Herzig, King, 2013; Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013). Essas moléculas podem também inibir o crescimento de bactérias e fungos, possuindo, assim, potencial uso terapêutico (Abreu, 2016; Ayroza et al., 2012; Gimenez et al., 2014; Yount, Yeaman, 2004).

Até o ano de 2013 quase mil tipos de mini proteínas já haviam sido descobertas no veneno de 60 espécies de aranhas, sendo o componente mais comum observado (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013).

1.1.4 Proteínas grandes

As proteínas grandes são os componentes de maior tamanho presentes no veneno, possuindo massa molecular variada entre 110 e 140 kDa. Elas foram identificadas exclusivamente nos gêneros *Latrodectus, Steatoda* e *Achaearanea* (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013).

Em estudos realizados com o veneno das espécies *Latrodectus mactans*, *L. tredecimguttatus* e *L. hasselti* foram descobertas sete proteínas grandes, que são seletivamente tóxicas a três diferentes grupos, são elas: a α -latrotoxina, que é seletiva aos vertebrados; a α - latrocrustotoxina, que é seletiva para crustáceos; e as latroinsectotoxinas, que são seletivas para insetos (Grishin, 1998). As α -latrotoxinas possuem três domínios distintos e têm grande afinidade para a formação de dímeros que, por sua vez, formam tetrâmeros. Neste formato elas se inserem em membranas de células nervosas e formam poros que atuam como um canal não seletivo de cátions, o que causa a perda de íons Ca²⁺ e o bloqueio da transmissão de sinais, levando à paralisia muscular (Rohou et al., 2007).

1.1.5 Enzimas

Por muito tempo a presença de enzimas em venenos de aranhas foi colocada em dúvida, pois os métodos de extração mais comumente empregados eram a dissecação ou punção das glândulas e a produção de extratos do cefalotórax, o que poderia levar à contaminação com proteases dos tecidos. O desenvolvimento de técnicas de extração por estimulação elétrica, aliada aos devidos cuidados para evitar a contaminação por fluidos digestivos, proporcionou a confirmação da presença de enzimas no veneno de diferentes espécies (Kuhn-Nentwig et al., 2011).

A razão pela qual as enzimas estão presentes nos venenos de aranhas parece ser óbvia: elas provocam a destruição da matriz extracelular e de membranas celulares, facilitando a entrada e a ação das demais toxinas, que atingem seus alvos mais rapidamente. Outra característica importante é a capacidade de promover a digestão extracorpórea do alimento (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013).

A maior parte das enzimas pode ser classificada em dois grupos: um que cliva polímeros da matriz extracelular e o outro que tem como alvo fosfolipídios e compostos da membrana celular (Kuhn-Nentwig et al., 2011).

As hialuronidases foram a primeira classe de enzimas encontradas no veneno de aranhas (Kaiser, 1956), elas clivam o ácido hialurônico, o maior constituinte da matriz extracelular. Elas foram identificadas no veneno de espécies das famílias Hexathelidae (Sutherland, Gray, 1978), Theraphosidae (Rocha-e-Silva et al., 2009), Sicariidae (da Silveira et al., 2007a), Desidae (Schenone et al., 1989), Lamponidae (Rash, Hodgson, 2002), Theridiidae (Bettini, Maroli, 1978), Ctenidae (Kuhn-Nentwig et al., 1994) e Lycosidae (Nagaraju et al., 2007a).

As colagenases são metaloproteinases que clivam o colágeno, um importante componente da matriz extracelular. Elas estão presentes no veneno de aranhas das famílias

Araneidae, Nephilidae, Sparassidae e Lycosidae (Atkinson, Wright, 1992; Nagaraju et al., 2007b).

Outra protease importante que faz parte do grupo de enzimas que clivam polímeros da matriz extracelular é a astacina, encontrada no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*. Ela pode atuar tanto na degradação dos tecidos quanto na digestão das presas, já que possui grande homologia com astacinas digestivas do caranguejo *Astacus astacus* (da Silveira et al., 2007b; Gremski et al., 2010; Trevisan-Silva et al., 2010).

Com relação às enzimas que atuam sobre os fosfolipídios e compostos da membrana celular são conhecidas as fosfodiesterases, que quebram a ligação fosfodiéster; as fosfolipases, que agem sobre os fosfolipídeos; e as esfingomielinases, que degradam a esfingomielina, um esfingolipídio da membrana de células eucarióticas (Kuhn-Nentwig et al., 2011). As esfingomielinases são o componente mais importante do veneno de aranhas *Loxosceles*. Ao clivar a esfingomielina, elas causam lesões necróticas e hemólise de células vermelhas do sangue, o que pode provocar até a morte (Leite, 2006).

Até o ano de 2013, diferentes tipos de enzimas haviam sido identificadas no veneno de 49 espécies de aranhas, pertencentes a 14 famílias (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013).

1.1.6 Peptídeos lineares

Os peptídeos lineares são moléculas catiônicas que possuem diversos tamanhos e funções biológicas. Além de serem encontrados no veneno de aranhas, eles também foram identificados no veneno de escorpiões e outros artrópodes (Kuhn-Nentwig et al., 2011). Estes peptídeos podem ser divididos em dois grupos: os que possuem massa molecular menor que 6 kDa, que podem ou não ter conformação em α -hélice, e os que têm massa molecular maior que 7 kDa que possuem conformação em α -hélice (Vassilevski et al., 2008).

A maioria dos peptídeos lineares identificados em venenos de aranhas pertence ao grupo dos que possuem massa molecular menor que 6 kDa e que têm conformação em α -hélice, os α -SCP. Eles têm de 18 a 48 resíduos de aminoácidos e massa molecular variada entre 1910 e 5221 Da. Normalmente, os α -SCP não possuem resíduos de cisteína e apresentam grandes quantidades de lisina e arginina em sua composição, o que lhes confere carga positiva variada entre +3 e +10. Quando em soluções aquosas, esses peptídeos ficam desordenados, mas adotam a conformação em α -hélice na presença de membranas, que possuem carga negativa. Através de interações eletrostáticas, a porção positiva dos peptídeos (composta por lisinas e argininas) é atraída por componentes negativamente carregados da

membrana celular (fosfolipídeos, lipopolissacarídeos ou ácido teicóico) (Kuhn-Nentwig et al., 2011; Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013).

Os α -SCP são compostos por mais de 37% de aminoácidos hidrofóbicos, o que pode torná-los anfipáticos. Graças a essa anfipaticidade, esses peptídeos têm a capacidade de se ligar à membrana celular de células procariotas e/ou eucariotas. Dependendo do alvo ao qual se ligam, eles são denominados peptídeos citolíticos, membranolíticos ou peptídeos antimicrobianos - PAMs, quando se ligam exclusivamente a membrana celular de microrganismos (Kuhn-Nentwig et al., 2011; Matsuzaki, 2009).

1.1.6.1 Peptídeos antimicrobianos - PAMs

Os PAMs são moléculas amplamente distribuídas na natureza, possuindo uma grande diversidade de estruturas e espectro de atividade. Eles são eficientes contra vírus, bactérias Gram positivas e negativas, leveduras, fungos, protozoários e parasitas (Solís et al., 2014).

Além de estarem presentes em venenos de aranhas, eles são encontrados em todas as espécies de seres vivos, sendo importantes elementos primitivos da resposta imune inata. Suas vias de indução são relativamente conservadas em vertebrados e insetos. Eles podem ser codificados por genes ou se originar da hidrólise de proteínas maiores e inativas (Bachère et al., 2004; Hoffmann et al., 1999).

O modo de ação mais conhecido dos PAMs se caracteriza por sua inserção na membrana celular, provocando a sua desnaturação (Daffre et al., 2001). São conhecidos três diferentes modelos de desnaturação causados pro PAMs: barril-estável, poro toroidal e carpete, indicados na Figura 5.

No modelo barril-estável os PAMs interagem com a face externa da membrana bacteriana, formando um poro transmembrânico do tipo barril. Neste poro, a porção apolar do peptídeo interage com a porção hidrofóbica dos fosfolipídios da membrana e a região hidrofílica do peptídeo fica voltada para dentro do poro. No modelo poro toroidal várias moléculas de peptídeos se associam com as cabeças polares dos fosfolipídeos da membrana e formam um poro transmembrânico, que permite a passagem de moléculas variadas. Já no modelo carpete, os peptídeos se acumulam paralelamente na superfície da membrana, causando uma tensão de curvatura. Quando uma concentração limiar de peptídeos é atingida, ocorre a formação de micelas, levando à destruição da membrana e à morte do microrganismo (Brogden, 2005).



Figura 5 - Três modelos de desnaturação de membranas celulares causadas por peptídeos antimicrobianos. Em soluções aquosas os peptídeos estão desestruturados, mas em contato com a membrana eles assumem uma conformação em α -hélice. Quando atingem uma concentração ideal, eles são capazes de desnaturar a membrana de três maneiras diferentes: modelo barril estável (esquerda), modelo poro toroidal (centro) ou modelo carpete (direita). Adaptado de: Pasupuleti et al., 2012.

Além da desnaturação da membrana celular, os PAMs também podem agir de outras maneiras, como através da ligação com receptores de membranas (provocando perda de função), interação com o DNA (impedindo a síntese de proteínas), ação sobre a produção de peróxido de hidrogênio ou indução de células à morte através da ativação de vias apoptóticas (Brogden et al., 2003; Pasupuleti et al., 2012).

Já é bastante conhecido que venenos de aranhas possuem PAMs em sua constituição. A primeira descrição sobre este fato foi publicada em 1989 por Xu et al., em estudo com a espécie *Lycosa singoriensis*. Desde então, muitos estudos têm sido realizados. Em buscas realizadas no banco de dados ArachnoServer (Herzig et al., 2011), utilizando o termo "*antimicrobial*", são obtidos 41 resultados. São exemplos as moléculas PcFK1 e PcFK2, isoladas no veneno da espécie *Psalmopoeus cambridgei* (Choi et al., 2004); as latarcinas, do veneno de *Lachesana tarabaevi* (Kozlov et al., 2006); a GsMTx-4, de *Grammostola spatulata* (Jung et al., 2006); as licotoxinas l e II, de *Lycosa carolinensis* (Yan, Adams, 1998); e as cupieninas, de *Cupiennius salei* (Kuhn-Nentwig et al., 2002).

Com relação à espécie que é objeto de estudo deste trabalho, a *A. juruensis*, um peptídeo antimicrobiano já foi identificado no seu veneno: a Juruína. Esta molécula possui potente atividade fungicida contra leveduras do gênero *Candida* e alta similaridade com peptídeos do veneno das espécies *Haplopelma schmidti* e *Chilobrachys guangxiensis* (Ayroza et al., 2012).

1.2 Diversidade do veneno de aranhas

A diversidade molecular do veneno de aranhas é estimada em até 12 milhões de compostos. Essas toxinas possuem atividades biológicas distintas, muitas das quais foram selecionadas ao longo da evolução para atuarem bloqueando seletivamente seus alvos celulares, como, por exemplo, canais de potássio dependentes de voltagem, causando uma rápida paralisia da presa (Escoubas, Rash, 2004).

Moléculas provenientes do veneno ou da hemolinfa de aranhas podem apresentar alto potencial terapêutico e biotecnológico, pois muitas delas têm como alvos receptores, membranas celulares e enzimas (Pimenta, de Lima, 2005). Este fato vem estimulando cada vez mais a prospecção de novos candidatos a medicamentos entre esses animais. A Rondonina e a Gomesina, por exemplo, são PAMs que foram isolados do plasma e dos hemócitos das espécies *Acanthoscurria rondoniae* e *Acanthoscurria gomesiana*, respectivamente (Riciluca et al., 2012; Silva Junior et al., 2000).

Devido à sua grande seletividade, toxinas provenientes do veneno de aranhas foram utilizadas como ferramentas para elucidação da estrutura, função e farmacologia de receptores celulares (Adams, 2004; Ushkaryov et al., 2004), metabotrópicos (Guharay, Sachs, 1984) e canais iônicos (Doyle et al., 1998; Mackinnon et al., 1998). Além disso, tais toxinas têm ajudado no desenvolvimento de biotecnologias nas mais diversas áreas, como bioinseticidas (Corzo, Escoubas, 2003; Fitches et al., 2004; Khan et al., 2008; Tedford et al., 2004), drogas que podem vir a ser usadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Estrada et al., 2007; Mazzuca et al., 2007), arritmia cardíaca (Bode et al., 2001), disfunção erétil (Nunes et al., 2008) e doenças infecciosas (Budnik et al., 2004; Chung et al., 2002; Haeberli et al., 2000; Kozlov et al., 2006; Silva Junior et al., 2000; Yan, Adams, 1998).

Ainda assim, os venenos de aranhas ainda são menos analisados em comparação aos de organismos marinhos, escorpiões e serpentes. Apenas alguns gêneros são amplamente estudados, notando-se que diversas substâncias integram o veneno dos mesmos (Gimenez, 2013). Em trabalhos realizados com o gênero *Loxosceles* foi observada a presença de

nucleosídeos sulfatados, fosfolipases, hialuronidases, fosfatases alcalinas, serinoproteases, metaloproteinases e toxinas inseticidas. Os componentes do veneno do gênero *Phoneutria* também são alvos frequentes de estudo, devido à variedade de espécies e principalmente pela agressividade dos indivíduos, que resulta no envolvimento em casos graves de envenenamento. Aranhas do gênero *Latrodectus* possuem em seus venenos uma rica combinação de toxinas de 110 a 140 kDa, as latrotoxinas, além de substâncias com atividade inseticida e outras que causam dor local aguda e sintomas neurotóxicos (Chaim et al., 2011; de Paula Le Sueur et al., 2003; Gimenez, 2013; Gomes et al., 2011; Rohou et al., 2007).

Entre as aranhas migalomorfas alguns dos gêneros mais estudos são *Atrax*, *Hadronyche* e *Illawarra* (Hexathelidae: Atracinae), pois estes agrupam espécies que possuem veneno bastante tóxico. Representantes do gênero *Atrax*, por exemplo, causaram pelo menos 14 mortes de pessoas entre 1927 até 1980, quando se iniciou a produção de antiveneno (Pineda et al., 2012).

Independentemente da espécie estudada, observa-se que os venenos de aranhas são complexas misturas de toxinas, as quais provocam alterações bioquímicas e neurológicas variadas em diversos animais (Beleboni et al., 2004; Gimenez, 2013). Mais de cem compostos distintos podem ser encontrados em um único veneno, alguns deles podem agir sinergicamente, promovendo maior eficiência de ação da mistura (Mourão, 2012; Vassilevski et al., 2009).

Visto que os venenos animais possuem uma grande variedade de componentes e que estes podem vir a ter aplicação biotecnológica, é de grande importância realizar a prospecção de moléculas bioativas nos venenos de aranhas. Até o presente momento, apenas um trabalho foi feito com a espécie *A. juruensis* (Ayroza et al., 2012). Portanto, ainda há muito a ser descoberto sobre a composição do veneno desta espécie.

1.3 A espécie Avicularia juruensis

A espécie *Avicularia juruensis* pertence à subordem Mygalomorphae e à família Theraphosidae, que engloba as espécies que possuem os maiores tamanhos (Fukushima, 2011). Os terafosídeos são encontrados em regiões tropicais e subtropicais e, após atingirem a maturidade sexual, podem viver de 2 (machos) a 25 anos (fêmeas). As aranhas desta família vêm, cada vez mais, despertando o interesse de pesquisadores, pois quantidades significativas de veneno ou de hemolinfa podem ser facilmente obtidas destes animais (Foelix, 2011). A aranha *A. juruensis* (Figura 6) difere-se das demais caranguejeiras da família Theraphosidae por apresentar cefalotórax baixo, rima ocular pouco elevada, olhos médios posteriores muito pequenos, quelíceras com onze dentes na borda interna do sulco ungueal, lábio tão largo quanto longo e tarsos providos de densas escópulas espatuladas, entre outras características (Mello-Leitão, 1922).



Figura 6 - A espécie *Avicularia juruensis*. **A)** Exemplar filhote. **B)** Fêmea adulta (Fotos: Soraia Maria do Nascimento). **C)** A espécie *Avicularia juruensis* em seu habitat natural. Registro feito na cidade de Porto Velho - RO, Brasil (Foto: Katie Cristina Takeuti Riciluca).

Esta aranha apresenta diferenças na coloração de filhotes e adultos (Figura 6 A e 6 B). Holl (1987) destacou três causas que podem determinar mudanças na coloração de aranhas: variações morfológicas, fisiológicas e ontogenéticas, esta última se refere às diferenças observadas durante o desenvolvimento do animal, o que ocorre em *A. juruensis*. Esta característica também está presente nas espécies *Pachistopelma rufonigrum* (Dias, 2004) e *Eriophora fuliginea* (Graf, Nentwig, 2001).

A *A. juruensis* é uma espécie amazônica e, no Brasil, pode ser encontrada nos estados do Acre, Rondônia, Amazonas, Pará, Maranhão e Mato Grosso, podendo também ocorrer em algumas áreas da Bolívia e do Peru (Fukushima, 2011). Ela possui hábitos arborícolas (Figura 6 C), vivendo em troncos de árvores e folhas de palmeiras, onde constrói seus abrigos (Bertani, 2012).

Esses abrigos geralmente são construídos próximos a ninhos de aves, que servem de alimentação para esta espécie. O nome de seu gênero, *Avicularia*, é uma alusão à sua dieta: do latim "avicula" = pequena ave, + aria = que tem referência à (Beechholdo, 1997). Sendo assim, devido ao fato de geralmente consumir pequenas aves e também pequenos vertebrados, acreditamos que seu veneno possui diferentes tipos de componentes que merecem ser cuidadosamente analisados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo estudar moléculas bioativas presentes no veneno da aranha migalomorfa *Avicularia juruensis*, bem como identificá-las e caracterizá-las.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- identificar e caracterizar moléculas com atividade antimicrobiana;
- avaliar o perfil eletroforético do veneno;
- identificar e caracterizar enzimas que apresentam atividade caseinolítica;
- identificar outras metaloproteinases através da análise transcriptômica das glândulas de veneno.
3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Os animais foram coletados e utilizados neste estudo sob as licenças Sisbio nº11024-3 e CGEN nº010345/2014-0. Eles foram mantidos no biotério do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil), sob temperatura controlada entre 24 e 26 °C, sendo alimentados a cada 15 dias com insetos ou carne e com água à vontade.

3.2 Obtenção do veneno

O veneno analisado neste estudo foi obtido de fêmeas em diferentes estágios de desenvolvimento. A extração foi realizada seguindo a metodologia descrita por Rocha-e-Silva et al., (2009). Para isso, elas foram anestesiadas com CO₂ e imobilizadas num suporte especialmente adaptado para a contenção de aranhas. Com um estimulador elétrico foram aplicados choques de 15 a 30 V, dependendo do tamanho do animal, com frequência de 10 Hz e disparos a cada 0,1 ms por 2 ms. Os eletrodos foram posicionados na região basal das quelíceras e o veneno foi coletado diretamente dentro de um tubo de micro centrífuga, onde as quelíceras foram posicionadas (Figura 7). Desta forma, ele foi obtido totalmente livre de contaminações por suco digestivo.



Figura 7 - Extração de veneno de uma fêmea da espécie *Avicularia juruensis*. **A**) O animal, anestesiado com CO₂, foi imobilizado num suporte especial e suas quelíceras foram posicionadas dentro de um tubo de micro centrífuga. **B**) Os choques foram aplicados na região basal das quelíceras e o veneno foi diretamente coletado dentro de um tubo de micro centrífuga, totalmente livre de contaminações (Fotos: Katie Cristina Takeuti Riciluca e Thaís Trostli Costella, respectivamente).

Após a coleta, o veneno foi imediatamente colocado em gelo e, em seguida, centrifugado a 2450 xG, durante 10 minutos, sob temperatura de 4 °C. Sua fração solúvel foi coletada, liofilizada e conservada a -80 °C até o uso.

3.3 Estimativa da quantidade de proteínas

A concentração do veneno foi determinada utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). Soluções com diferentes concentrações de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA), variando de 1,4 a 0,1 mg/mL, em triplicata, foram incubadas por 45 minutos com o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich), os volumes (em μ L) foram utilizados seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante do reagente. Após o período de incubação, a absorbância a 595 nm foi verificada em um leitor de microplacas modelo Victor³ (Perkin Elmer Inc., Waltham, Massachusetts, EUA) e a média dos valores obtidos para cada concentração foi aplicada para a construção da curva padrão e obtenção da equação da reta.

As amostras de veneno foram diluídas cem vezes em água ultrapura (Milli-Q, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) a fim de mantê-las dentro da faixa de detecção do método. As alíquotas assim obtidas foram utilizadas para a realização do ensaio em triplicata, seguindo as mesmas etapas descritas anteriormente. A média da absorbância obtida foi aplicada na equação da reta da curva padrão (no lugar de X), dessa forma a concentração proteica das amostras pôde ser calculada e determinada.

A concentração das frações obtidas após as etapas de cromatografia líquida de alta eficiência (em 3.4.1) e cromatografia líquida de gel filtração (em 3.4.2) foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro modelo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, EUA) de espectro completo (190 a 940 nm). Para determinar a concentração de proteínas e peptídeos foram empregados os comprimentos de onda de 280 nm e 205 nm, respectivamente.

3.4 Fracionamento

3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa - CLAE-FR

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa -CLAE-FR foi empregada com o objetivo de se obter PAMs. Para isso, 10 mg de veneno liofilizado foram reconstituídos em 2 mL de água ultrapura (Milli-Q) acidificada com 0,05% de ácido trifluoracético - TFA e centrifugados a 16000 xG por 5 minutos. A fração solúvel foi coletada e fracionada num sistema Prominence LC-20A (Shimadzu, Quioto, Quioto, Japão), utilizando-se uma coluna de fase reversa semi-preparativa Júpiter C18 (10 μ m; 300 Å; 10 mm x 250 mm) (Phenomenex, Torrance, Califórnia, EUA). Como eluentes foram utilizadas a Fase A (TFA 0,05%) e a Fase B (acetonitrila - ACN/TFA 0,05%). As eluições foram realizadas com um gradiente de 2 a 80% de B durante 60 minutos, com fluxo de 1,5 mL/minuto e absorbância monitorada a 225 nm. As frações correspondentes aos picos observados no cromatograma foram coletadas manualmente e separadamente, concentradas numa centrífuga a vácuo refrigerada e reconstituídas em 500 μ L de água ultrapura (Milli-Q). 20 μ L de cada uma delas foram utilizados no ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido (em 3.5.1).

Com o intuito de melhor isolar os PAMs, as frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram acidificadas e submetidas a uma nova etapa de CLAE-FR no mesmo sistema já mencionado (Prominence LC-20A - Shimadzu), utilizando-se uma coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (4,6 μ m; 12 nm; 4,6 mm x 250 mm - Shimadzu). Para cada fração foi empregado um gradiente específico, calculado de acordo com o tempo de retenção observado para cada uma delas na primeira etapa de cromatografia. Sendo assim, as frações 3, 36, 37, 38, 40, 45 e 49 foram fracionadas realizando-se eluições com gradientes de 2 a 15%, 33 a 45%, 35 a 45%, 36 a 46%, 37 a 47%, 42 a 52% e 45 a 55% de B, respectivamente. Foi empregado um fluxo de 1 mL/minuto durante 40 minutos e a absorbância foi monitorada a 225 nm. As frações correspondentes aos picos observados no cromatograma foram coletadas manualmente e separadamente, concentradas numa centrífuga a vácuo refrigerada e reconstituídas em 200 μ L de água ultrapura (Milli-Q). 20 μ L de cada uma delas foram utilizados no ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido (em 3.5.1).

3.4.2 Cromatografia líquida de gel filtração

A técnica de cromatografia líquida de gel filtração foi empregada a fim de se fracionar o veneno de acordo com o tamanho das moléculas que o compõem. Para isso, 10 mg do mesmo foram reconstituídos em 700 μ L de acetato de amônio 50 mM. A amostra foi centrifugada a 16000 xG por 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido e fracionado no equipamento ÄKTA purifier 10 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), utilizando-se uma coluna Superose 12 10/300 GL (11 μ m; 10 mm x 300 mm) (GE Healthcare). A corrida cromatográfica foi realizada sob condições isocráticas, utilizando como eluente uma solução de acetato de amônio 50 mM, com fluxo de 1 mL/minuto durante 36 minutos e absorbância monitorada a 280 nm. As frações foram coletadas automaticamente a cada minuto e imediatamente colocadas em gelo. Em seguida, elas foram liofilizadas e armazenadas a -80 °C até o uso.

3.5 Bioensaios

3.5.1 Ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido

Para detectar a presença de atividade antimicrobiana (antibacteriana e/ou antifúngica) em todas as frações coletadas na etapa de CLAE-FR (em 3.4.1) foi empregada a técnica de ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido, baseando-se no método descrito por Bulet et al., (1993).

O experimento foi feito numa bancada de fluxo laminar vertical Pachane modelo 050 (Pachane, Piracicaba, SP, Brasil) utilizando-se microplacas de 96 poços, onde foram aplicadas alíquotas de 20 μ L de cada uma das frações. O volume foi completado com 80 μ L de meio de cultura *Poor Broth* - PB (1% bactopeptona, 0,5% NaCl, pH 7,4) ou *Potato Dextrose Broth* - PDB (1,2% PDB) contendo uma suspensão de microrganismos (bactérias ou fungos, respectivamente) em fase logarítmica de crescimento e na concentração final de 10⁵ células/mL. Como controle positivo da inibição do crescimento microbiano foram empregados 0,2 mg do antibiótico estreptomicina e como controle negativo da inibição foi utilizada água ultrapura (Milli-Q) autoclavada, ambos aplicados no mesmo volume em que as frações foram testadas (20 μ L). Para ter a certeza de que o ensaio foi realizado sem contaminações externas foram aplicados nos poços laterais (colunas 1 e 12) 100 μ L do meio de cultura e da água ultrapura (Milli-Q) autoclavada utilizados no experimento, ambos sem a suspensão de microrganismos. A Figura 8 ilustra como o ensaio foi realizado.

As placas foram incubadas em temperatura de 30 °C durante 18 horas sob agitação constante. O crescimento do microrganismo e a atividade antimicrobiana das frações testadas foram avaliados pela medida da absorbância a 595 nm em um leitor de microplacas Victor³ (Perkin Elmer Inc.). Através da comparação da turbidez do controle positivo com a turbidez dos meios que continham as frações foi possível determinar qual delas impediu o crescimento do microrganismo testado.



Figura 8 - Representação do ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido. Neste esquema está indicada a distribuição das frações e dos controles na microplaca de 96 poços utilizada no experimento.

3.5.1.1 Concentração mínima inibitória - CMI e concentração mínima bactericida - CMB

A concentração das frações antimicrobianas foi verificada no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher), utilizando-se o comprimento de onda de 205 nm (em 3.3). Elas foram testadas em diluições seriadas e, desta forma, foi possível determinar a concentração mínima inibitória - CMI e a concentração mínima bactericida - CMB. A CMI é definida pela concentração mínima da amostra que é capaz de retardar o crescimento do microrganismo, enquanto que a CMB se refere à concentração mínima capaz de matar o microrganismo.

A CMI foi determinada através da avaliação visual da turbidez dos poços que continham as frações, sem que as microplacas fossem abertas para evitar contaminações. A CMB foi analisada pela medida da absorbância a 595 nm em um leitor de microplacas Victor³ (Perkin Elmer Inc.), após 96 horas de incubação das microplacas.

3.5.1.2 Microrganismos

Nos ensaios de inibição do crescimento em meio líquido foram utilizadas as bactérias Gram negativa *Escherichia coli* (cepa SBS 363) e Gram positiva *Micrococcus luteus* (cepa A270), além da levedura *Candida albicans* (cepa MDM8) e do fungo filamentoso *Aspergillus niger* (isolado ambiental). Todas estas cepas fazem parte da coleção do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Setor Química de Proteínas.

3.5.2 Ensaio hemolítico

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana também foram testadas contra hemácias humanas a fim de se verificar se elas possuíam atividade hemolítica. O sangue do tipo O+ foi coletado de um doador humano saudável na presença de tampão citrato de sódio 150 mM pH 7,4 (proporção de 9:1) e centrifugado a 700 xG por 15 minutos. O plasma foi descartado e as hemácias foram lavadas por três vezes em tampão fosfato-salino - PBS 1 X (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4), a cada lavagem foram feitas novas centrifugações a 700 xG por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Por fim, as hemácias foram ressuspendidas no mesmo tampão PBS 1 X até a concentração final de 3% (v/v).

Foram coletadas alíquotas de 20 μ L das frações antimicrobianas (volume com o qual foi detectada a atividade antimicrobiana), as mesmas foram concentradas em centrífuga a vácuo e ressuspendidas em 50 μ L do tampão PBS 1 X. Desta forma, elas foram testadas em duplicata em diluições seriadas iniciadas a partir da maior concentração na qual elas inibem o crescimento de microrganismos. Como controle positivo (100% de hemólise) foram utilizados 50 μ L de solução de Triton X-100 (0,1%) e como controle negativo (0% de hemólise) foram utilizados 50 μ L do tampão PBS 1 X, citado anteriormente. O teste foi feito numa microplaca de 96 poços com fundo em "U". A cada poço, que já continha as amostras e os controles, foram adicionados 50 μ L da solução de hemácias 3% (v/v).

A placa foi incubada durante 1 hora a 37 °C. Após a incubação, o sobrenadante foi recolhido de cada poço e transferido para outra microplaca de 96 poços (sem fundo "U"). A presença ou ausência de hemólise foi determinada através da medida da absorbância a 405 nm, feita em um leitor de microplacas Victor³ (Perkin Elmer Inc.). O valor da absorbância a 405 nm foi determinado pela média dos valores obtidos. A porcentagem de hemólise foi calculada pela seguinte fórmula indicada na Figura 9.

$$\% hemólise = \frac{Abs_{405 nm}}{Abs_{405 nm}} da solução com peptídeo - Abs_{405 nm} em PBS \times 100$$

Figura 9 - Fórmula com a qual foi feito o cálculo da porcentagem de hemólise. Adaptado de: Hao et al., 2009.

3.6 Análises bioquímicas

3.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE

O experimento de eletroforese foi feito baseando-se no método descrito por Laemmli (1970). As amostras de veneno foram analisadas sob condições redutoras e não redutoras. Na primeira condição, elas foram diluídas num tampão 4 vezes concentrado (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 300 mM SDS; 1 mM azul de bromofenol; 40% glicerol; 8% β-mercaptoetanol) e

aquecidas a 90 °C durante 5 minutos. As amostras não reduzidas foram diluídas em tampão sem β -mercaptoetanol e não foram aquecidas.

O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 4,5% e o de separação nas concentrações de 8, 10, 12 e 15% de poliacrilamida. Eles foram polimerizados em forma de mini-géis nas dimensões 85 x 80 x 1,5 mm, no sistema de eletroforese vertical DIGEL modelo DGV10. A corrida foi realizada em voltagem constante de 120 V e sob temperatura ambiente. O tampão de corrida utilizado era composto por 250 mM de glicina, 25 mM de Tris e 3 mM de SDS. Como referência para os valores de massa foram utilizados os marcadores de massa molecular PageRuler[™] Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.) ou Spectra[™] Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.).

O gel foi corado com azul de coomassie R-250 (45% metanol, 10% ácido acético, 3 mM coomassie brilliant blue R-250) e/ou com nitrato de prata. Na coloração por coomassie o gel foi descorado até o aparecimento de bandas através de imersão contínua em solução contendo 25% de metanol e 8% de ácido acético. A coloração com nitrato de prata foi feita de acordo com o protocolo descrito por Bassam et al., (1991).

3.6.2 Zimografia em gel de poliacrilamida copolimerizado com caseína

A avaliação da atividade proteolítica do veneno sobre a caseína foi feita em géis de SDS-PAGE, com concentrações de 10% ou 12% de poliacrilamida, copolimerizados com 0,1% de caseína de leite bovino (Sigma-Aldrich). Foram feitos mini-géis nas dimensões 85 x 80 x 1,0 mm no sistema de eletroforese vertical DIGEL modelo DGV10.

As amostras de veneno foram avaliadas sob condições não redutoras e a corrida de eletroforese foi feita em voltagem constante de 80 V, com a cuba imersa em gelo e temperatura ambiente de 18 °C. Como controle positivo de atividade caseinolítica foram utilizados 50 µg de veneno de *Bothrops jararaca*. O tampão de corrida e o marcador de massa molecular utilizados foram os mesmos citados anteriormente (em 3.6.1).

Após a corrida, os géis foram imersos durante 60 minutos numa solução contendo 2,5% de Triton X-100 e, em seguida, foram feitas 3 lavagens de 10 minutos com água ultrapura (Milli-Q). Os géis foram incubados durante 12 horas, sob temperatura de 37 °C e agitação constante, em tampão 30 mM de Tris, 200 mM de NaCl, 10 mM de CaCl₂, 9 mM de MgCl₂ e pH 7,4. Para verificar a presença de metaloproteinases e/ou serinoproteases nas amostras de veneno alguns géis foram incubados em solução tampão contendo 50 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (GE Healthcare) ou 50 mM de fluoreto de

fenilmetilsulfonil - PMSF (Thermo Fisher Scientific Inc.). O EDTA é um quelante de íons metálicos e, portanto, um inibidor de metaloproteinases. Já o PMSF reage com resíduos de serina do sítio ativo e inibe a atividade enzimática de serinoproteases.

Ao final do período de incubação, os géis foram corados com azul de coomassie R-250 e descorados até o aparecimento de faixas claras sobre o fundo azul escuro do gel, as quais indicam atividade caseinolítica das amostras.

3.6.3 Ensaio de atividade caseinolítica

As frações isoladas através da técnica de cromatografia líquida de gel filtração (em 3.4.2) foram ressuspendidas em 200 μ L de água ultrapura (Milli-Q), alíquotas de 20 μ L de cada uma delas foram coletadas e colocadas em tubos de micro centrífuga de 0,5 mL. Foram adicionados 5 μ L de uma solução de 2% (m/v) de caseína de leite bovino (Sigma-Aldrich) e 8 μ L da solução tampão 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8,8. Como controle positivo da degradação do substrato foram utilizados 25 μ g de veneno de *Bothrops jararaca* e como controle negativo a solução de caseína foi incubada somente com a solução tampão citada anteriormente. As amostras foram incubadas durante três horas a 37 °C. Em seguida, o perfil de degradação da caseína foi avaliado através da técnica de eletroforese, utilizando-se o método descrito no em 3.6.1. As amostras foram reduzidas e aplicadas num gel com concentração de 12% de poliacrilamida. A coloração com nitrato de prata foi feita de acordo com o protocolo descrito por Bassam et al., (1991).

3.7 Análise transcriptômica das glândulas de veneno de A. juruensis

O transcriptoma completo das glândulas foi sequenciado pelo Setor de Genômica e Transcriptômica do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan.

Para a realização do experimento, cinco fêmeas de *A. juruensis* foram submetidas à extração de veneno por estimulação elétrica três dias antes da remoção das glândulas. Esse intervalo foi empregado para que elas tivessem tempo suficiente para produzir uma boa quantidade de mRNA. As aranhas foram anestesiadas com CO_2 e, com o auxílio de pinças e uma lupa, suas glândulas de veneno foram removidas primeiramente por secção da inserção das quelíceras com o cefalotórax, seguida pela secção da parte inferior da quelícera e, por fim, pela remoção da glândula e sacrifício dos animais (Figura 10). As glândulas foram imediatamente conservadas em -80 °C até o procedimento de extração do mRNA.



Figura 10 - Etapas da remoção da glândula de veneno de fêmeas de *Avicularia jururensis*. A) Primeiramente as quelíceras inteiras foram removidas. B) Foi feita uma secção da parte inferior da quelícera. C) A glândula foi removida intacta (Fotos: Soraia Maria do Nascimento).

O RNA total das glândulas de veneno foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.). A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese capilar em chip RNA 6000 Nano no equipamento BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA). O mRNA foi extraído com oligo (dT) usando o kit Dynabeads[®] mRNA DIRECT (Thermo Fisher Scientific Inc.) e quantificado com o reagente RNA Quant-itTM RiboGreen[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.). A integridade do mRNA foi avaliada através de eletroforese capilar em chip RNA 6000 Pico no equipamento BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies). A biblioteca de cDNA foi preparada seguindo o procedimento padrão do kit TruSeq RNA Sample Prep (Ilumina, San Diego, Califórnia, EUA). Posteriormente, as bibliotecas de cDNA foram sequenciadas no sistema Ilumina HiSeq 1500, em uma célula de fluxo *paired end* no módulo Rapid Run de 2*150 pb por 300 ciclos, de acordo com o procedimento padrão do fabricante (Ilumina).

Para a extração dos dados obtidos pelo Sequenciador Ilumina HiSeq 1500 foi utilizado o software CASAVA (Ilumina) versão 1.8.2. Este software produz um arquivo "*.fastq" com todas as sequências aprovadas no controle de qualidade de bases (>Q30). Em seguida, um roteiro de pré-processamento, desenvolvido pelo grupo do Setor de Genômica e Transcriptômica, foi criado visando filtrar as sequências por qualidade, tamanho de leitura, sequências com regiões de homopolímeros, de baixa complexidade, caudas poli A/T/N e adaptadores. Após o pré-processamento e aplicação de filtros para gerar sequências de alta qualidade, foram utilizados programas especializados para gerar estatísticas, novas leituras pareadas e leituras ajustadas pareadas. A montagem *de novo* foi realizada utilizando-se o software Trinity (versão 2.1.1) (Grabherr et al., 2011), com parâmetros de *paired end* e utilizando todos os *reads* (*paired-end* e únicos) que passaram pelos filtros.

A identificação de sequências ribossômicas foi realizada por similaridade, baseada no banco de dados do NCBI (Geer et al., 2010) de ribossomais de Metazoa e de Arachnida,

utilizando o algoritmo BLASTN (Altschul et al., 1990) com e-value 1.10^{-20} e critérios de cobertura do transcrito maiores de 60% e identidade maior de 70% para ser classificado como rRNA.

Os reads da amostra foram utilizados para a montagem *de novo* e os transcritos obtidos foram utilizados como referência para as análises de expressão gênica. A análise de expressão condição-específica foi realizada através do alinhamento dos *reads paired-end* da amostra contra a montagem do transcriptoma de referência, seguido pela estimativa da abundância utilizando o método RNA-Seq Expectation Maximization - RSEM (Li, Dewey, 2011). O RSEM tem o objetivo de estimar o nível de expressão aproximado para cada transcrito, gerando o FPKM (*Fragments Per Kilobase of Exon Per Million Fragments Mapped*) para cada transcrito. Este método foi utilizado devido à geração de isoformas, variantes de *splicing* e genes duplicados em montagens *de novo* de transcrito baseado na probabilidade de os mesmos serem derivados de cada transcrito, levando em consideração o viés na posição gerado pelo protocolo de criação da biblioteca de RNA-seq. Os *contigs* (proteínas preditas) foram anotados automaticamente por script de BLAST (Altschul et al., 1990) utilizando banco de dados de Aracnídeos do Uniprot (The UniProt Consortium, 2015).

O software CEGMA (Parra et al., 2007) foi utilizado para avaliar a montagem e cobertura do transcriptoma, verificando o quão completo o transcriptoma estava ao comparálo com sequências altamente conservadas em eucariotos. A predição das proteínas foi realizada utilizando-se o software Transdecoder (https://transdecoder.github.io/) com parâmetros padrão (*minimum lenght* de 100 pb). Os resultados obtidos foram utilizados para a preparação dos bancos de dados utilizados para a identificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos e enzimas do veneno de *A. juruensis*.

3.8 Caracterização das moléculas bioativas

3.8.1 Digestão proteica em solução (redução, alquilação e tripsinização)

O processo de digestão proteica em solução foi feito baseando-se no protocolo descrito por Stone et al., (1996). As frações que apresentaram atividade caseinolítica e atividade antimicrobiana foram concentradas em centrífuga a vácuo e reconstituídas em 20 μ L de uma solução 8 M ureia e 0,4 M bicarbonato de amônio. Também foram adicionados 5 μ L de solução 45 mM ditiotreitol (Sigma-Aldrich) e foi feita uma incubação sob temperatura de 50 °C durante 15 minutos. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, foram adicionados 5 μ L de solução 100 mM iodoacetamida (Sigma-Aldrich) e foi feita uma nova incubação, agora sob temperatura ambiente e protegida da luz durante 15 minutos. Foram adicionados 130 μ L de água ultrapura (Milli-Q) e tripsina bovina (Sigma-Aldrich) na proporção 1/25 (enzima/proteína). Foi feita uma incubação sob temperatura de 37 °C por 24 horas. Após esse período, a ação da enzima foi interrompida com a adição de 130 μ L da solução de TFA 0,1%. O volume total foi concentrado numa centrífuga a vácuo e as amostras obtidas foram dessalinizadas através de cromatografia em micro-escala utilizando-se ponteiras especiais ZipTip[®] (Merck Millipore), que possuem resina de fase reversa C18 em sua extremidade. Seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante, as proteínas foram eluídas em solução de ACN/TFA 0,05% (80/20, v/v).

3.8.2 Análise por espectrometria de massas

As amostras tripsinizadas e não tripsinizadas foram concentradas em centrífuga a vácuo, reconstituídas em 10 µL de solução de ácido fórmico 0,1% e analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem - LC-MS/MS, utilizando-se o espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific Inc.) acoplado ao sistema de nano-cromatografia líquida Easy-nLCII (Thermo Fisher Scientific Inc.). 5 µL de cada amostra foram automaticamente injetados numa pré-coluna Júpiter C-18 (10 µm; 100 µm x 50 mm) (Phenomenex) acoplada a uma coluna da fase reversa analítica ACQUA C-18 (5 µm; 75 µm x 100 mm) (Phenomenex). As amostras foram eluídas em gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (0,1% ácido fórmico em ACN) por 15 minutos, sob fluxo de 200 nL/minuto. A fonte de ionização por *electrospray* foi operada em modo positivo, com a voltagem e temperatura ajustadas para 2,0 kV e 200 °C, respectivamente. O intervalo de varredura de massas considerado para o full scan (MS1) foi de 200 - 2000 m/z (resolução de 60000 em 400 m/z), operando no modo data dependent acquisition, onde os cinco íons mais intensos por scan foram selecionados para o evento de fragmentação por dissociação induzida por colisão. O sinal mínimo requerido para disparar eventos de fragmentação (MS2) de determinado íon foi ajustado para 5000 cps, e o tempo de exclusão dinâmica utilizado foi 30 segundos.

3.8.2.1 Buscas em bancos de dados

Os espectros resultantes, em formato "*.RAW", foram coletados e processados através do software MSConvert (Chambers et al., 2012). Dessa forma, eles foram convertidos para o formato "*.mgf" (mascot generic format) e puderam ser empregados em buscas em diferentes bancos de dados utilizando-se a ferramenta Mascot[®] (Perkins et al., 1999).

3.8.2.2 Análise bioinformática

A deconvolução dos valores de m/z para a obtenção das massas moleculares foi realizada no software MassAnalyzer 1.03 (Amgen, Thousand Oaks, Califórnia, EUA). Os espectros também foram submetidos à análise bioinformática utilizando-se o software PEAKS 7.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Ontario, Canadá). Através da função PEAKS DB, os espectros foram comparados com bancos de dados construídos com os *contigs* obtidos no transcriptoma da glândula de veneno de *A. juruensis* ou com bancos de dados construídos com toxinas provenientes de venenos de aranhas e com moléculas antimicrobianas de artrópodes, ambos obtidos das ferramentas Uniprot (The UniProt Consortium, 2015) e NCBI (Geer et al., 2010). As análises foram feitas com tolerância de erro de 10 ppm e de 0,6 Da para o íon precursor e para os fragmentos, respectivamente. A carbamidometilação das cisteínas foi utilizada como uma modificação pós-traducional fixa, enquanto a oxidação das metioninas e a acetilação dos N-terminais foram utilizadas como modificações variáveis.

Os *contigs* que apresentaram similaridades com os fragmentos peptídicos foram submetidos a buscas em diferentes bancos de dados utilizando-se as ferramentas InterPro (Mitchell et al., 2015) e BLASTP (Altschul et al., 1990).

As sequências completas de aminoácidos de diferentes moléculas foram obtidas nas ferramentas Uniprot (The UniProt Consortium, 2015) e/ou NCBI (Geer et al., 2010) e empregadas em alinhamentos feitos com os contigs. Os alinhamentos e a coloração foram feitos os SeaView (Gouy et al., 2010) e Boxshade com programas (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html), respectivamente, e os cálculos das porcentagens de identidade e similaridade foram feitos com a ferramenta SIAS (http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fracionamento do veneno por CLAE-FR e ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido

O veneno de *A. juruensis* foi fracionado por CLAE-FR com o intuito de isolar e caracterizar os peptídeos antimicrobianos - PAMs. Todas as frações obtidas foram testadas quanto à presença de potencial antimicrobiano, utilizando-se a técnica de ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido. Desta forma, foram identificadas sete frações capazes de impedir o crescimento dos microrganismos testados, são elas: a fração 3, que impediu o crescimento da bactéria Gram negativa *Escherichia coli* SBS 363; as frações 36, 37, 38 e 40, que impediram o crescimento do fungo *Aspergillus niger*, da levedura *Candida albicans* MDM8, da bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus* A270 e de *E. coli* SBS 363; e as frações 45 e 49, que foram eficazes contra *E. coli* SBS 363 e *M. luteus* A270. A Tabela 2 indica as atividades observadas e a Figura 11 mostra o cromatograma obtido, destacando as frações antimicrobianas.

Fração	Aspergillus niger	Candida albicans MDM8	Escherichia coli SBS 363	Micrococcus luteus A270
03	-	-	+	-
36	+	+	+	+
37	+	+	+	+
38	+	+	+	+
40	+	+	+	+
45	-	-	+	+
49	-	-	+	+

 Tabela 2 - Frações isoladas do veneno de Avicularia juruensis que apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados.

(+): Com atividade antimicrobiana. (-): Sem atividade antimicrobiana.



Figura 11 - Perfil cromatográfico do veneno de *Avicularia juruensis*, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa semi-preparativa Júpiter C18 (Phenomenex). A cromatografia foi feita empregando-se um gradiente de 2 a 80% de acetonitrila em água acidificada com 0,05% de ácido trifluoracético, durante 60 minutos sob fluxo de 1,5 mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 225 nm. Todas as frações, correspondentes aos picos observados no cromatograma, foram coletadas manualmente e separadamente. Estão destacadas as que apresentaram potencial antimicrobiano, sendo elas: a fração 3, que impediu o crescimento da bactéria Gram negativa *Escherichia coli* SBS 363; as frações 36, 37, 38 e 40, que impediram o desenvolvimento do fungo *Aspergillus niger*, da levedura *Candida albicans* MDM8, da bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus* A270 e de *E. coli* SBS 363; e as frações 45 e 49, que impediram o crescimento de *E. coli* SBS 363 e *M. luteus* A270.

4.1.1 Segunda etapa de fracionamento das frações antimicrobianas e ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido

Na análise por espectrometria de massas observou-se que as frações com atividade antimicrobianas não estavam homogêneas (dados não mostrados). Sendo assim, foi necessário submetê-las a uma nova etapa de cromatografia utilizando-se uma coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu). As novas frações obtidas por CLAE-FR foram avaliadas quanto à presença de atividade antimicrobiana através do ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido. Assim, foram identificadas treze frações capazes de impedir o crescimento dos microrganismos testados, são elas: a fração 3_2, que impediu o crescimento de *E. coli* SBS 363; as frações 36_4, 36_5, 37_3, 37_4, 38_6, 38_7, 40_4 e 40_5, que impediram o crescimento de *A. niger, C. albicans* MDM8, *E. coli* SBS 363 e *M. luteus* A270; e as frações 45_5, 45_6, 49_7 e 49_8, que foram eficazes contra *E. coli* SBS 363 e *M. luteus* A270. A Tabela 3 indica as atividades observadas e as Figuras 12 a 18 mostram os cromatogramas obtidos, destacando as frações antimicrobianas.

Fração	Aspergillus niger	Candida albicans MDM8	Escherichia coli SBS 363	Micrococcus luteus A270
3_2	-	-	+	-
36_4	+	+	+	+
36_5	+	+	+	+
37_3	+	+	+	+
37_4	+	+	+	+
38_6	+	+	+	+
38_7	+	+	+	+
40_4	+	+	+	+
40_5	+	+	+	+
45_5	-	-	+	+
45_6	-	-	+	+
49_7	-	-	+	+
49_8	-	-	+	+

Tabela 3 - Frações obtidas na segunda etapa de CLAE-FR que apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados.

(+): Com atividade antimicrobiana. (-): Sem atividade antimicrobiana.



Figura 12 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 3, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shimpack VP-ODS C18 (Shimadzu). A cromatografia foi feita empregando-se um gradiente de 2 a 15% de acetonitrila em água acidificada com 0,05% de ácido trifluoracético, durante 40 minutos sob fluxo de 1 mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 225 nm. Todas as frações, correspondentes aos picos observados no cromatograma, foram coletadas manualmente e separadamente. Apenas a fração destacada, denominada 3_2, impediu o crescimento da bactéria Gram negativa *Escherichia coli* SBS 363.



Figura 13 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 36, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu). A cromatografia foi feita empregando-se um gradiente de 33 a 45% de acetonitrila em água acidificada com 0,05% de ácido trifluoracético, durante 40 minutos sob fluxo de 1 mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 225 nm. Todas as frações, correspondentes aos picos observados no cromatograma, foram coletadas manualmente e separadamente. Apenas as frações destacadas, denominadas 36_4 e 36_5, impediram o crescimento do fungo *Aspergillus niger*, da levedura *Candida albicans* MDM8, da bactéria Gram negativa *Escherichia coli* SBS 363 e da bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus* A270. A) Imagem do cromatograma completo. B) Imagem ampliada do cromatograma entre 12 e 14 minutos, destacando as frações 36_4 e 36_5.



Figura 14 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 37, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu). A cromatografia foi feita empregando-se um gradiente de 35 a 45% de acetonitrila em água acidificada com 0,05% de ácido trifluoracético, durante 40 minutos sob fluxo de 1 mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 225 nm. Todas as frações, correspondentes aos picos observados no cromatograma, foram coletadas manualmente e separadamente. Apenas as frações destacadas, denominadas 37_3 e 37_4, impediram o crescimento do fungo *Aspergillus niger*, da levedura *Candida albicans* MDM8, da bactéria Gram negativa *Escherichia coli* SBS 363 e da bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus* A270. A) Imagem do cromatograma completo. B) Imagem ampliada do cromatograma entre 12 e 14 minutos, destacando as frações 37_3 e 37_4.



Figura 15 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 38, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu). A cromatografia foi feita empregando-se um gradiente de 36 a 46% de acetonitrila em água acidificada com 0,05% de ácido trifluoracético, durante 40 minutos sob fluxo de 1 mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 225 nm. Todas as frações, correspondentes aos picos observados no cromatograma, foram coletadas manualmente e separadamente. Apenas as frações destacadas, denominadas 38_6 e 38_7, impediram o crescimento do fungo *Aspergillus niger*, da levedura *Candida albicans* MDM8, da bactéria Gram negativa *Escherichia coli* SBS 363 e da bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus* A270. A) Imagem do cromatograma completo. B) Imagem ampliada do cromatograma entre 12 e 14 minutos, destacando as frações 38_6 e 38_7.



Figura 16 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 40, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu). A cromatografia foi feita empregando-se um gradiente de 37 a 47% de acetonitrila em água acidificada com 0,05% de ácido trifluoracético, durante 40 minutos sob fluxo de 1 mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 225 nm. Todas as frações, correspondentes aos picos observados no cromatograma, foram coletadas manualmente e separadamente. Apenas as frações destacadas, denominadas 40_4 e 40_5, impediram o crescimento do fungo *Aspergillus niger*, da levedura *Candida albicans* MDM8, da bactéria Gram negativa *Escherichia coli* SBS 363 e da bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus* A270. A) Imagem do cromatograma completo. B) Imagem ampliada do cromatograma entre 12 e 14 minutos, destacando as frações 40_4 e 40_5.



Figura 17 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 45, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu). A cromatografia foi feita empregando-se um gradiente de 42 a 52% de acetonitrila em água acidificada com 0,05% de ácido trifluoracético, durante 40 minutos sob fluxo de 1 mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 225 nm. Todas as frações, correspondentes aos picos observados no cromatograma, foram coletadas manualmente e separadamente. Apenas as frações destacadas, denominadas 45_5 e 45_6, impediram o crescimento da bactéria Gram negativa *Escherichia coli* SBS 363 e da bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus* A270. A) Imagem do cromatograma completo. B) Imagem ampliada do cromatograma entre 12 e 14 minutos, destacando as frações 45_5 e 45_6.





Figura 18 - Perfil cromatográfico da segunda etapa de fracionamento de fração 49, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (Shimadzu). A cromatografia foi feita empregando-se um gradiente de 45 a 55% de acetonitrila em água acidificada com 0,05% de ácido trifluoracético, durante 40 minutos sob fluxo de 1 mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 225 nm. Todas as frações, correspondentes aos picos observados no cromatograma, foram coletadas manualmente e separadamente. Apenas as frações destacadas, denominadas 49_7 e 49_8, impediram o crescimento da bactéria Gram negativa *Escherichia coli* SBS 363 e da bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus* A270. A) Imagem do cromatograma completo. B) Imagem ampliada do cromatograma entre 11 e 14 minutos, destacando as frações 49_7 e 49_8.

4.1.1.1 Caracterização das frações antimicrobianas

Com o objetivo de determinar a massa exata e a sequência de aminoácidos das frações antimicrobianas, as mesmas foram analisadas por LC-MS/MS. No primeiro caso, 20 μ L de cada amostra (volume com o qual foi detectada a atividade antimicrobiana) foram aplicados diretamente no espectrômetro. Já para realizar o sequenciamento, o mesmo volume citado de cada uma das frações foi reduzido, alquilado e tripsinizado antes de ser injetado no equipamento. Os espectros obtidos foram analisados nos softwares PEAKS 7.5 (Bioinformatics Solutions) e MassAnalyzer 1.03 (Amgen) e comparados com moléculas depositadas em diferentes bancos de dados utilizando-se a ferramenta Mascot[®] (Perkins et al., 1999).

Também foram realizados bioensaios para determinar a CMI e a CMB das frações e para avaliar se as mesmas eram capazes de causar a hemólise de hemácias humanas.

4.1.1.1.1 Análise da fração 3_2

Nas análises realizadas com os softwares PEAKS 7.5 e MassAnalyzer 1.03 não foram obtidos resultados significativos. No entanto, nas buscas realizadas com a ferramenta Mascot[®] observou-se que a fração 3_2 apresenta similaridade com a theraphotoxina U12-TRTX-Hs1a do veneno da aranha *Haplopelma schmidti* (Figura 19).

(MATRIX) SCIENCE MASCOT Search Results

U12-theraphotoxin-Hs1a OS=Haplopelma schmidti PE=2 SV=1
Database: SwissProt
Score: 44
Nominal mass (Mr): 8558
Calculated pI: 8.85
Taxonomy: Haplopelma schmidti
Protein sequence coverage: 12%
1 MNVKILLLLV GLNLVMHSNA TGDSETNPAE TLFIEEIFRR GCFKEGKWCP
51 KSAPCCAPLK CKGPSIKQQK CVRE

Figura 19 - Resultado obtido na análise da fração 3_2 em buscas realizadas com a ferramenta Mascot[®] (Perkins et al., 1999). A molécula antimicrobiana isolada do veneno de *Avicularia juruensis* apresentou similaridade com a theraphotoxina U12-TRTX-Hs1a do veneno da aranha *Haplopelma schmidti*. O fragmento peptídico destacado com o retângulo foi identificado como sendo similar entre as duas moléculas.

Utilizando a theraphotoxina U12-TRTX-Hs1a como referência foram realizadas buscas entre os *contigs* provenientes da análise transcriptômica da glândula de veneno de *A*. *juruensis*. Desta forma, identificou-se que o *contig* Ajur63747_seq1 (Apêndice I) possui

similaridade com a theraphotoxina citada. Este *contig* foi então denominado Avilina, em referência ao gênero *Avicularia*.

Através da comparação com a theraphotoxina U12-TRTX-Hs1a foram determinadas as porções correspondentes ao peptídeo sinal, ao propeptídeo e ao peptídeo ativo da Avilina (Figura 20).



Figura 20 - Alinhamento e comparação da Avilina com a theraphotoxina U12-TRTX-Hs1a do veneno da aranha *Haplopelma schmidti*. Estão indicados o peptídeo sinal, o propeptídeo e a região do peptídeo ativo da theraphotoxina. Os aminoácidos conservados são mostrados em preto, os que possuem o mesmo caráter químico são mostrados em cinza e os aminoácidos não conservados são mostrados em branco. As porcentagens de identidade, comparando-se com a primeira sequência, estão indicadas no final da sequência de aminoácidos de cada molécula. O Símbolo (-) representa os gaps.

Utilizando a ferramenta ProtParam (Gasteiger et al., 2005) a massa molecular da região do peptídeo ativo da Avilina foi avaliada em 3260,9 Da. Também verificou-se seu caráter catiônico devido à presença de oito aminoácidos positivamente carregados (cinco lisinas e três argininas), com pI calculado em 9,08. Sendo assim, a Avilina pode ser classificada como um peptídeo antimicrobiano, pois apresenta massa molecular abaixo de 10 kDa e é uma molécula catiônica, características próprias de PAMs (Pasupuleti et al., 2012).

A theraphotoxina U12-TRTX-Hs1a é uma neurotoxina que atua bloqueando canais de cálcio do tipo N (Jiang et al., 2008). A Avilina apresentou 43,47% de similaridade com esta theraphotoxina, porém, quando a comparação foi feita apenas entre a região do peptídeo ativo das duas moléculas, observou-se uma similaridade de 62%. Esse resultado indica que, provavelmente, a Avilina também atue no bloqueio de canais de cálcio. De acordo com Redaelli et al., (2010), neurotoxinas de aracnídeos também podem ser potentes moléculas antimicrobianas. São exemplos as Cupieninas 1a, 1b, 1c e 1d de veneno de *Cupiennius salei* (Kuhn-Nentwig et al., 2002) e as licotoxinas M-LCTX-Hc1a, M-LCTX-Hc2a e M-LCTX-Ls2a do veneno de *Lycosa carolinensis* (Yan, Adams, 1998).

Em trabalho realizado por Machado et al., (2016) avaliou-se a ação bactericida de inibidores de canais de íons contra cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*. Entre as drogas utilizadas foi testado o Verapamil, um bloqueador de canais de cálcio. Os resultados

obtidos pelos pesquisadores mostram que o Verapamil foi capaz de penetrar na bactéria e gerar uma cascata de eventos que causam a inibição dos complexos da cadeia respiratória, o que reduz a produção de energia e afeta o metabolismo bacteriano. Sendo assim, este pode ser o mecanismo de ação empregado pela Avilina, provável bloqueadora de canais de cálcio, que foi capaz de impedir o crescimento de *E. coli* SBS 363.

Comparando-se a Avilina com seis toxinas do veneno de aranhas que possuem motivo "nó de cistina" do tipo ICK, foi possível determinar que ela também apresenta este tipo de estrutura, com pontes dissulfeto formadas entre C1-C4, C2-C5 e C3-C6 (Figura 21).

Avilina	21	EQEFEPDIGDAPLFQENFERGEFREGHAGTKSAPGCRPMKCK	(ERK	TKT
JZ50B_CHIGU	21	EQSSETDMDDTLLIPEINRGRCIEEGKWCPKKAPCCGRLECK	GPSPKQKK	TRP
JZT51_CHIGU	21	EKYSETDVEDSPMIQERRCEPSGKPC-RPLMRIPCCGSCV	/RGK	A
JZT52_CHIGU	21	EQSSETDMDDTLLIPENYRKGCFKEGHSCPKTAPCCRPLVCK	GPSPNTKK	TRP
TX10A_HAPSC	21	TGDSETNPAETLFIEEIFRRGCFKEGKWCPKSAPCCAPLKCK	GPSIKQQK	VRE
TXFK2_PSACA	21	EISAKMDSRDSPMIQERRCLPAGKTCVRGPMRVPCCGSCS	QNK	T
TXH10_HAPSC	21	ERHSKTDMEDMEDSPMIQERKCLPPGKPCYGATQKIPCCGVCS	3HNK	T

Figura 21 - Alinhamento da Avilina com diferentes toxinas do veneno de aranhas que possuem o motivo "nó de cistina" do tipo *inhibitory cysteine knot*. Estão destacadas as cisteínas entre as quais se formam as pontes dissulfeto (entre C1-C4, C2-C5 e C3-C6). Uniprot ID JZ50B_CHIGU: Theraphotoxina U4-TRTX-Cg1a do veneno de *Chilobrachys guangxiensis*. JZT51_CHIGU: Theraphotoxina U6-TRTX-Cg1a do veneno de *C. guangxiensis*. JZT52_CHIGU: Theraphotoxina U5-TRTX-Cg1a do veneno de *C. guangxiensis*. TX10A_HAPSC: Theraphotoxina U12-TRTX-Hs1a do veneno de *Haplopelma schmidti*. TXFK2_PSACA: Theraphotoxina U2-TRTX-Pc1a do veneno de *Psalmopoeus cambridgei*. TXH10_HAPSC: Omega-theraphotoxina Omega-TRTX-Hs1a do veneno de *H. schmidti*.

A filogenia de toxinas que possuem motivo "nó de cistina" ICK sugere que elas tenham surgido de genes relacionados às β -defensinas, uma classe de PAMs amplamente encontrados entre os seres vivos. Estas toxinas podem ter se originado por duplicação de um ou mais genes relacionados às defensinas nas glândulas de veneno, sofrendo diversificação e ganhando novas funções durante os eventos evolutivos (Fry et al., 2009). Um fato que reforça a hipótese citada é a existência de β -defensinas de *Drosophila melanogaster* que atuam bloqueando canais de sódio, de maneira idêntica ao mecanismo de ação de neurotoxinas de aracnídeos que possuem motivo ICK (Cohen et al., 2009).

As toxinas que possuem o motivo "nó de cistina" apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, entre elas atividades antimicrobianas e bloqueio de canais de íons. Essa característica leva à possibilidade de essas moléculas serem empregadas no desenho de diversas drogas (Craik et al., 2001).

Como citado anteriormente, a Avilina foi capaz de impedir o crescimento da bactéria Gram negativa *E. coli* SBS 363. Nos ensaios antimicrobianos realizados foi possível determinar que ela apresenta valores de CMI e CMB de 1,75 e 3,5 μ g/mL, respectivamente. Devido ao fato de a massa molecular exata da Avilina não ter sido confirmada através das análises realizadas, os resultados foram calculados apenas em μ g/mL, considerando-se a concentração medida no equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Nos ensaios hemolíticos realizados observou-se que a Avilina foi capaz de causar a hemólise de hemácias humanas até a concentração de 0,875 μ g/mL (Figuras 22 e 23). As zodatoxinas Ltc 1, Ltc 2a e Ltc 5 são PAMs isolados do veneno da aranha *Lachesana tarabaevi* que também têm atividade hemolítica (Kozlov et al., 2006). Elas causam a hemólise de eritrócitos de coelho nas concentrações de 245,6, 17,4 e 137,1 μ g/mL, respectivamente, valores bem maiores do que os observados para a Avilina.



Figura 22 - Resultado obtido nos ensaios hemolíticos realizados com diferentes concentrações de Avilina. Foram feitas diluições seriadas, partindo-se da concentração inicial com a qual foi observada a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* SBS 363. Desta forma, observou-se que a Avilina foi capaz de causar a hemólise das hemácias humanas nas concentrações entre 28 e 0,875 µg/mL. Os testes foram feitos em microplaca de 96 poços com fundo em "U". A) Poços onde foram aplicadas alíquotas da solução 0,1% de Triton X-100 (controle positivo de hemólise), em duplicata. B) Poços onde foram aplicadas alíquotas da solução tampão fosfato-salino - PBS 1 X (controle negativo de hemólise), em duplicata. C) Poços onde foram feitas as diluições seriadas da Avilina, em duplicata.



Figura 23 - Gráfico indicando as porcentagens de hemólise das hemácias humanas incubadas com diferentes concentrações de Avilina. Foram feitas diluições seriadas, partindo-se da concentração inicial com a qual foi observada a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* SBS 363. Desta forma, observou-se que a Avilina foi capaz de causar a hemólise nas concentrações entre 28 e 0,875 µg/mL. Também estão indicadas as porcentagens de hemólise de hemácias incubadas com tampão fosfato-salino - PBS 1 X (controle negativo de hemólise) e com solução 0,1% de Triton X-100 (controle positivo de hemólise).

Por fim, estudos posteriores ainda precisam ser realizados para confirmar a massa exata e a sequência peptídica da Avilina.

4.1.1.1.2 Análise das frações 36_4 a 40_5

Os resultados obtidos nas análises das frações 36_4, 36_5, 37_3, 37_4, 38_6, 38_7, 40_4 e 40_5 foram bastante similares. As buscas realizadas com a ferramenta Mascot[®] indicaram que elas apresentam similaridade com a hainantoxina HNTX-II-8 do veneno da aranha *Haplopelma hainanum* (Figura 24).

(MATRIX) MASCOT Search Results

Hainantoxin-II-8 OS=Haplopelma hainanum PE=2 SV=1

Database:	SwissProt	
Score:	786	
Nominal mass (M _r):	9702	
Calculated pI:	5.17	
Taxonomy:	<u>Haplopelma hainanum</u>	
Protein sequence coverage: 25%		

Matched peptides shown in bold red.

1 MKVTLIAILT CAAVLVLHTT AAEELEESQL MEVGMPDTEL AAVDEERLFE 51 CSVSCEIERE GNKDCKKKKC KGGWK<u>CKFNI CVKV</u>

Figura 24 - Resultado obtido na análise das frações 36_4, 36_5, 37_3, 37_4, 38_6, 38_7, 40_4 e 40_5 em buscas realizadas com a ferramenta Mascot[®] (Perkins et al., 1999). As moléculas antimicrobianas isoladas do veneno de *Avicularia juruensis* apresentaram similaridade com a hainantoxina HNTX-II-8 do veneno da aranha *Haplopelma hainanum*. Os fragmentos peptídicos destacados com os retângulos foram identificados como sendo similares entre as moléculas analisadas.

Através das análises realizadas no software PEAKS 7.5 observou-se que as frações correspondem ao peptídeo antimicrobiano Juruína (Figura 25), que foi isolado e caracterizado no veneno de *A. juruensis* por Ayroza et al., (2012). Também foi possível identificar que o *contig* Ajur67205_seq1 (Apêndice II) contém a informação para a tradução da Juruína, pois as frações antimicrobianas também apresentaram fragmentos peptídicos pertencentes à esse *contig* (Figura 26).

Juruína



Carbamidometilação (+57,02)

Figura 25 - Resultado obtido nas análises por espectrometria de massas das frações antimicrobianas 36_4, 36_5, 37_3, 37_4, 38_6, 38_7, 40_4 e 40_5 feitas no software PEAKS 7.5 (Bioinformatics Solutions). Todas possuíam fragmentos peptídicos correspondentes ao peptídeo antimicrobiano Juruína, já identificado por Ayroza et al., (2012) no veneno de *Avicularia juruensis*. Os fragmentos peptídicos identificados por espectrometria de massas estão destacados pelo sombreamento em cinza e pelas barras azuis. Os espectros indicando a deconvolução dos íons de dois fragmentos são mostrados dentro dos retângulos. A carbamidometilação das cisteínas (modificação pós traducional) está indicada com quadrados amarelos.

Contig Ajur67205_seq1



Carbamidometilação (+57,02)

Figura 26 - Resultado obtido nas análises por espectrometria de massas das frações antimicrobianas 36_4, 36_5, 37_3, 37_4, 38_6, 38_7, 40_4 e 40_5 feitas no software PEAKS 7.5 (Bioinformatics Solutions). Todas possuíam fragmentos peptídicos correspondentes ao *contig* Ajur67205_seq1. Este *contig* foi identificado através da análise transcriptômica das glândulas de veneno de *Avicularia juruensis* e é o responsável pela tradução do peptídeo antimicrobiano Juruína, já identificado por Ayroza et al., (2012). Os fragmentos peptídicos identificados por espectrometria de massas estão destacados pelo sombreamento em cinza e pelas barras azuis. Os espectros indicando a deconvolução dos íons de dois fragmentos são mostrados dentro dos retângulos. A carbamidometilação das cisteínas (modificação pós traducional) está indicada com quadrados amarelos.

O alinhamento e a comparação do *contig* Ajur67205_seq1 e da Juruína com a hainantoxina HNTX-II-8, identificada nas análises realizadas com a ferramenta Mascot[®], mostra que a sequência peptídica da Juruína se alinha à região do peptídeo ativo da hainantoxina (Figura 27).



Figura 27 - Alinhamento e comparação do *contig* Ajur67205_seq1 e da Juruína com a hainantoxina HNTX-II-8 do veneno da aranha *Haplopelma hainanum*. Estão indicados o peptídeo sinal, o propeptídeo e a região do peptídeo ativo da hainantoxina. Os aminoácidos conservados são mostrados em preto, os que possuem o mesmo caráter químico são mostrados em cinza e os aminoácidos não conservados são mostrados em branco. O Símbolo (-) representa os gaps.

Na análise transcriptômica das glândulas de veneno de *A. juruensis* a sequência completa de nucleotídeos do *contig* Ajur67205_seq1 não foi obtida, o que impossibilitou a identificação das regiões referentes ao peptídeo sinal e propeptídeo da molécula de Juruína. Ainda assim, foi possível observar que o aminoácido situado na posição 8 na verdade se trata de um ácido aspártico e não de uma asparagina como foi descrito por Ayroza et al., (2012) (Figura 27). Este pequeno erro pode ser justificado pelo fato de as massas moleculares destes dois aminoácidos serem bastante parecidas. O ácido aspártico apresenta massa de 115 Da, enquanto a asparagina possui 114 Da.

Os resultados obtidos com o software MassAnalyzer 1.03 indicaram que as frações 36_4, 36_5, 37_3, 37_4 e 38_6 possuem uma molécula com massa molecular de 4003,9 Da (Figura 28 A), que corresponde à massa da Juruína. Já as frações 38_7, 40_4 e 40_5 apresentaram massa de 4319,1 Da (Figura 28 B). Utilizando a ferramenta Mass Calculator do software PEAKS 7.5 foi possível determinar que essa massa é correspondente à da molécula de Juruína que possui os resíduos de DR e G ligados às suas porções N e C-terminal, respectivamente (<u>DRFTCAISCNIKVNGKPCKGSGEKKCSGGWSCKFNVCVKVG</u>) (Figura 29). Esse resultado é bastante interessante, pois mostra que mesmo com três resíduos de aminoácido a mais ligados à sua estrutura original, a Juruína ainda mantém sua ação antimicrobiana. Esta isoforma foi então denominada Juruína_2.



Figura 28 - Determinação das massas moleculares das frações 36_4, 36_5, 37_3, 37_4, 38_6, 38_7, 40_4 e 40_5 através do software MassAnalyzer 1.03 (Amgen). Para as frações 36_4, 36_5, 37_3, 37_4 e 38_6 observou-se a presença de uma molécula com massa molecular de 4003,9 Da, que corresponde à massa da Juruína (Ayroza et al., 2012). Já as frações 38_7, 40_4 e 40_5 apresentaram massa de 4319,1 Da, que corresponde à massa da Juruína_2. **A**) Deconvolução dos íons indica uma massa de 4003,9 Da. **B**) Deconvolução dos íons indica uma massa de 4319,1 Da.

🚳 Mass Calculator for PE	AKS	_			
File Help					
Input Sequence or Mass (I	Da): 🔿 b-ion	⊖ y-ion	 non-specific 		
DRFTCAISCNIKVNGKPCK	DRFTCAISCNIKVNGKPCKGSGEKKCSGGWSCKFNVCVKVG				
Total Residue Mass:	Charge:		M/Z Mass:		
4319.072 <	- 1	->	4319.072		
Margin of Error (prediction	of sequence): +/	- 0.6	Da 🗸		

Figura 29 - Resultado obtido no cálculo da massa molecular da Juruína_2, uma isoforma da Juruína (Ayroza et al., 2012) que contém os resíduos de aminoácido DR e G ligados às suas porções N e C-terminal, respectivamente. A massa obtida é igual à observada nas análises realizadas com as frações 38_7, 40_4 e 40_5 no software MassAnalyzer 1.03 (Figura 28 B).

Os ensaios antimicrobianos realizados indicaram que a Juruína e a Juruína_2 foram capazes de impedir o crescimento de todos os microrganismos testados (fungo *A. niger*, levedura *C. albicans* MDM8, bactéria Gram negativa *E. coli* SBS 363 e bactéria Gram positiva *M. luteus* A270). Seus valores de CMI e CMB foram determinados e podem ser observados na Tabela 4, abaixo.

Mionongonigmo	Juruína		Juruína_2	
testado	CMI (µM-µg/mL)	CMB (µM-µg/mL)	CMI (µM-µg/mL)	CMB (µM-µg/mL)
<i>Aspergillus niger</i> (isolado ambiental)	4 - 16,35	8 - 32,7	3,2 - 13,8	6,4 - 27,6
Candida albicans MDM8	2 - 8,17	4 - 16,35	1,6 - 6,9	3,2 - 13,8
Escherichia coli SBS 363	0,5 - 2,04	1 - 4,09	1,6 - 6,9	3,2 - 13,8
Micrococcus luteus A270	0,5 - 2,04	1 - 4,09	1,6 - 6,9	3,2 - 13,8

Tabela 4 - Valores de concentração mínima inibitória - CMI e concentração mínima bactericida - CMB obtidos nos ensaios antimicrobianos realizados com os peptídeos antimicrobianos Juruína e Juruína_2, isolados do veneno de *Avicularia juruensis*.

É interessante citar que no trabalho realizado por Ayroza et al., (2012) foi observada apenas a ação antifúngica da Juruína. Isso pode ter ocorrido devido a diferenças na etapa de fracionamento ou então a Juruína pode ter perdido sua integridade, o que prejudicou sua ação antimicrobiana contra bactérias Gram positiva e negativa.

Assim como esperado, a Juruína e a Juruína_2 não apresentaram atividade hemolítica contra hemácias humanas. Esse resultado reforça o potencial desta molécula em ser empregada para o desenvolvimento de novos antibióticos.

4.1.1.1.3 Análise das frações 45_5 e 45_6

As análises realizadas com a ferramenta Mascot[®] não retornaram resultados significativos. Porém, utilizando o software PEAKS 7.5, observou-se que as frações 45_5 e 45_6 possuem fragmentos peptídicos correspondentes aos *contigs* Ajur66926_seq1 (Apêndice III) e Ajur75226_seq1 (Apêndice IV), respectivamente. Estes *contigs* foram denominados Juruenina e Juruensina, em referência à espécie *A. juruensis* (Figuras 30 e 31).

Contig Ajur66926_seq1 (Juruenina)



Figura 30 - Resultado obtido na análise por espectrometria de massas da fração antimicrobiana 45_5 feita no software PEAKS 7.5 (Bioinformatics Solutions). Esta fração apresentou fragmentos peptídicos correspondentes ao *contig* Ajur66926_seq1. Este *contig*, denominado Juruenina, foi identificado através da análise transcriptômica das glândulas de veneno de *Avicularia juruensis*. Os fragmentos peptídicos identificados por espectrometria de massas estão destacados pelo sombreamento em cinza e pelas barras azuis. O espectro indicando a deconvolução dos íons de um dos fragmentos está mostrado dentro do retângulo. A carbamidometilação das cisteínas (modificação pós traducional) está indicada com quadrados amarelos.

Contig Ajur75226_seq1 (Juruensina)

MKAFVVLAIA ALALLSVVCY ASESKEQDSL DEMSAILSEQ PQQR**GDCHKF LGWCR**GEPDP CCEHLS**CSRK HGWCVWDWTV**GK



Figura 31 - Resultado obtido na análise por espectrometria de massas da fração antimicrobiana 45_6 feita no software PEAKS 7.5 (Bioinformatics Solutions). Esta fração apresentou fragmentos peptídicos correspondentes ao *contig* Ajur75226_seq1. Este *contig*, denominado Juruensina, foi identificado através da análise transcriptômica das glândulas de veneno de *Avicularia juruensis*. Os fragmentos peptídicos identificados por espectrometria de massas estão destacados pelo sombreamento em cinza e pelas barras azuis. Os espectros indicando a deconvolução dos íons de dois fragmentos são mostrados dentro dos retângulos. A carbamidometilação das cisteínas (modificação pós traducional) está indicada com quadrados amarelos.

Utilizando a ferramenta BLASTP (Altschul et al., 1990), foi possível verificar que a Juruenina possui similaridade com as theraphotoxinas Delta-TRTX-Cg1a e U10-TRTX-Cg1a do veneno da aranha terafosídea *Chilobrachys guangxiensis*. As análises feitas com a Juruensina indicaram que ela tem similaridade com as theraphotoxinas U5-TRTX-Hhn1a e U6-TRTX-Hhn1a do veneno da aranha *Haplopelma hainanum*. Através do alinhamento e comparação com estas toxinas, as regiões correspondentes ao peptídeo sinal, propeptídeo e peptídeo ativo da Juruenina e da Juruensina puderam ser determinadas (Figuras 32 e 33).



Figura 32 - Alinhamento e comparação da Juruenina com as theraphotoxinas Delta-TRTX-Cg1a e U10-TRTX-Cg1a do veneno da aranha *Chilobrachys guangxiensis*. Estão indicados o peptídeo sinal, o propeptídeo e a região do peptídeo ativo das theraphotoxinas. Os aminoácidos conservados são mostrados em preto, os que possuem o mesmo caráter químico são mostrados em cinza e os aminoácidos não conservados são mostrados em branco. As porcentagens de identidade, comparando-se com a primeira sequência, estão indicadas no final da sequência de aminoácidos de cada molécula. O Símbolo (-) representa os gaps.



Figura 33 - Alinhamento e comparação da Juruensina com as theraphotoxinas U5-TRTX-Hhn1a e U6-TRTX-Hhn1a do veneno da aranha *Haplopelma hainanum*. Estão indicados o peptídeo sinal, o propeptídeo e a região do peptídeo ativo das theraphotoxinas. Os aminoácidos conservados são mostrados em preto, os que possuem o mesmo caráter químico são mostrados em cinza e os aminoácidos não conservados são mostrados em branco. As porcentagens de identidade, comparando-se com a primeira sequência, estão indicadas no final da sequência de aminoácidos de cada molécula. O Símbolo (-) representa os gaps.

Todas as theraphotoxinas com as quais a Juruenina e a Juruensina apresentaram similaridades são inibidoras de canais iônicos. Estudos feitos com toxinas provenientes de venenos aracnídeos indicam que algumas delas podem atuar como inibidoras de canais iônicos e também como agentes antimicrobianos. São exemplos os peptídeos CsTx-1 (Kuhn-Nentwig et al., 2012) e GsMTx-4 (Jung et al., 2006), isolados do veneno das aranhas *Cupiennius salei* e *Grammostola spatulata*, respectivamente.

Assim como a Avilina (em 4.1.1.1) e a Juruína (Ayroza et al., 2012), a Juruenina e a Juruensina apresentam em sua estrutura o motivo "nó de cistina" do tipo ICK (Figura 34). De acordo com Fujitani et al., (2007), o motivo ICK é fundamental para a atividade antimicrobiana das Taquistatinas, PAMs isolados do caranguejo ferradura *Tachypleus tridentatus*. Os autores observaram que as Taquistatinas A e B são moléculas com alta similaridade, porém, nos testes antimicrobianos realizados, notou-se que apenas a

Taquistatina A foi capaz de matar a bactéria Gram negativa *E. coli*. A diferença entre as duas moléculas se dá no tamanho do *loop* formado entre dois resíduos de cisteína que formam uma ponte dissulfeto. A Taquistatina B possui um *loop* menor, o que prejudica seu potencial antimicrobiano. Sendo assim, o motivo ICK pode também ser de fundamental importância para a estrutura e função de PAMs de venenos de aranhas.



Figura 34 - Alinhamento da Juruenina e da Juruensina com as theraphotoxinas Delta-TRTX-Cg1a e U10-TRTX-Cg1a do veneno da aranha *Chilobrachys guangxiensis*, e com as theraphotoxinas U5-TRTX-Hhn1a e U6-TRTX-Hhn1a do veneno da aranha *Haplopelma hainanum*, toxinas que possuem o motivo "nó de cistina" do tipo *inhibitory cysteine knot*. Como visto anteriormente, a Juruenina e a Juruensina apresentam similaridade com estas theraphotoxinas. Estão destacadas as cisteínas entre as quais se formam as pontes dissulfeto (entre C1-C4, C2-C5 e C3-C6).

A massa molecular da Juruenina não pôde ser confirmada através das análises realizadas com o software MassAnalyzer. Sendo assim, o cálculo de sua provável massa foi feito considerando-se a região do seu peptídeo ativo (Figura 32) e o resultado obtido foi de 3363 Da. Já massa da Juruensina foi avaliada em 4221,6 Da (Figura 35). Esse valor corresponde ao fragmento **GDCHKFLGWCRGEPDPCCEHLSCSRKHGWCVWDWTV**, que é encontrado na região do peptídeo ativo da Juruensina (Figura 33).

Como já mencionado anteriormente, a Juruenina e a Juruensina foram capazes de impedir o crescimento das bactérias Gram negativa *E. coli* SBS 363 e Gram positiva M. luteus A270. Nos ensaios antimicrobianos realizados foi possível determinar a CMI e a CMB destes PAMs, os resultados podem ser conferidos na Tabela 5. Devido ao fato de a massa molecular exata da Juruenina não ter sido confirmada através das análises feitas, os resultados foram calculados apenas em μ g/mL, considerando-se a concentração medida no equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Os ensaios hemolíticos mostraram que as duas moléculas não causam a hemólise de hemácias humanas.


Figura 35 - Determinação da massa molecular da Juruensina, realizada através do software MassAnalyzer 1.03 (Amgen). A deconvolução dos íons indica que a molécula possui massa da 4221,6 Da.

Mionongoniano	Juru	enina	Jurue	ensina
testado	CMI (µM-µg/mL)	CMB (µM-µg/mL)	CMI (µM-µg/mL)	CMB (µM-µg/mL)
Escherichia coli SBS 363	N/D - 5,75	N/D - 11,5	2,5 - 10,46	5 - 20,92
Micrococcus luteus A270	N/D - 11,5	N/D - 23	20 - 83,67	40 - 167,35

Tabela 5 - Valores de concentração mínima inibitória - CMI e concentração mínima bactericida - CMB obtidos nos ensaios antimicrobianos realizados com os peptídeos antimicrobianos Juruenina e a Juruensina, isolados do veneno de *Avicularia juruensis*.

(N/D): Não determinado

4.1.1.1.4 Análise das frações 49_7 e 49_8

As análises realizadas com a ferramenta Mascot[®] não apresentaram resultados significativos. No entanto, utilizando o software PEAKS 7.5, observou-se que as frações 49_7 e 49_8 possuem fragmentos peptídicos correspondentes aos *contigs* Ajur6582_seq1 (Apêndice V) e Ajur50565_seq3 (Apêndice VI), respectivamente. Estes *contigs* foram denominados Avinina e Aviensina, em referência ao gênero *Avicularia* (Figuras 36 e 37).

Contig Ajur6582_seq1 (Avinina)

MKLFSVILSI SLLIVVAALP SKIREEDDLG ELTQDLELIP ETSRECSKQL HQSCSDNCDC CGATVVCASV WVGSKESRMC



Figura 36 - Resultado obtido na análise por espectrometria de massas da fração antimicrobiana 49_7 feita no software PEAKS 7.5 (Bioinformatics Solutions). Esta fração apresentou fragmentos peptídicos correspondentes ao *contig* Ajur6582_seq1. Este *contig*, denominado Avinina, foi identificado através da análise transcriptômica das glândulas de veneno de *Avicularia juruensis*. Os fragmentos peptídicos identificados por espectrometria de massas estão destacados pelo sombreamento em cinza e pelas barras azuis Os espectros indicando a deconvolução dos íons de dois fragmentos são mostrados dentro dos retângulos. A carbamidometilação das cisteínas (modificação pós traducional) está indicada com quadrados amarelos.

Contig Ajur50565_seq3 (Aviensina)

MKLFSVVVLI TLLIAVIALP SKIRGEDDLE NTKLIGKLME DLELIPEAPR GCTKQLNQRC EDNCDCCGST VVCGSVWVGG



Figura 37 - Resultado obtido na análise por espectrometria de massas da fração antimicrobiana 49_8 feita no software PEAKS 7.5 (Bioinformatics Solutions). Esta fração apresentou fragmentos peptídicos correspondentes ao *contig* Ajur50565_seq3. Este *contig*, denominado Aviensina, foi identificado através da análise transcriptômica das glândulas de veneno de *Avicularia juruensis*. Os fragmentos peptídicos identificados por espectrometria de massas estão destacados pelo sombreamento em cinza e pelas barras azuis. Os espectros indicando a deconvolução dos íons de dois fragmentos são mostrados dentro dos retângulos. A acetilação dos N-terminais, a carbamidometilação das cisteínas e a oxidação das metioninas (modificações pós traducionais) estão indicadas com quadrados cor-de-rosa, amarelos e azuis, respectivamente.

Utilizando a ferramenta BLASTP (Altschul et al., 1990), foi possível verificar que a Avinina possui similaridade com as hainantoxinas HNTX-XVIII-5 e HNTX-XVIII.2 do veneno da aranha *Haplopelma hainanum*. As análises feitas com a Aviensina indicaram que ela tem similaridade com as hainantoxinas HNTX-XVIII-7 e HNTX-XVIII-6, também do veneno de *H. hainanum*. O alinhamento e comparação com estas toxinas possibilitou a identificação das regiões correspondentes ao peptídeo sinal, propeptídeo e peptídeo ativo da Avinina e da Aviensina (Figuras 38 e 39).



Figura 38 - Alinhamento e comparação da Avinina com as hainantoxinas HNTX-XVIII-5 e HNTX-XVIII.2 do veneno da aranha *Haplopelma hainanum*. Estão indicados o peptídeo sinal, o propeptídeo e a região do peptídeo ativo das hainantoxinas. Os aminoácidos conservados são mostrados em preto, os que possuem o mesmo caráter químico são mostrados em cinza e os aminoácidos não conservados são mostrados em branco. As porcentagens de identidade, comparando-se com a primeira sequência, estão indicadas no final da sequência de aminoácidos de cada molécula. O Símbolo (-) representa os gaps.



Figura 39 - Alinhamento e comparação da Aviensina com as hainantoxinas HNTX-XVIII-7 e HNTX-XVIII-6 do veneno da aranha *Haplopelma hainanum*. Estão indicados o peptídeo sinal, o propeptídeo e a região do peptídeo ativo das hainantoxinas. Os aminoácidos conservados são mostrados em preto, os que possuem o mesmo caráter químico são mostrados em cinza e os aminoácidos não conservados são mostrados em branco. As porcentagens de identidade, comparando-se com a primeira sequência, estão indicadas no final da sequência de aminoácidos de cada molécula. O Símbolo (-) representa os gaps.

As hainantoxinas são neurotoxinas inibidoras de canais iônicos encontradas no veneno da aranha terafosídea *Haplopelma hainanum* (Xiao, Liang, 2003). Como já visto anteriormente, peptídeos com estas características podem também ter ação antimicrobiana.

A Avinina e a Aviensina apresentaram similaridades com hainantoxinas que possuem o motivo "nó de cistina" tipo ICK. Através do alinhamento com estas toxinas foi possível observar que esses peptídeos também têm motivo ICK em sua estrutura (Figura 40), assim como todos os outros PAMs já descritos anteriormente. A presença de moléculas antimicrobianas com motivo ICK é bastante conhecida no veneno de aracnídeos. As spiderines OtTx1a, 1b, 2a e 2b, identificadas no veneno da aranha *Oxyopes takobius*, são exemplos destas moléculas (Vassilevski et al., 2013).

Avinina	45 ECSKQLHQSCSDNCDCCGATVVCASVWVGSKESRMCKEKTSDNSILNFFGKGINAVSNGFSMCGRK
Aviensina	51 GOTKQLNQRCEDNODCOGSTVVOGSVVVGGKEVKTOKEKTSDNWILNMAGKGLNMMKNAASVOV
HNTX-XVIII-5	46 ACSKQIGNKCKRNCECCGKTVVCGTIYVGGKEVNQCMDKTSDNAILNGLGKGMNFIENTFSFCV
HNTX-XVIII.2	46 ACSKQIGDKCKRNCCCCKTVVCGTIYVGGKEVNQCMDKTSDNAILNGLGKGMNFIENTFSFCV
HNTX-XVIII-7	46 ACSKQIGDKCKRNCCCGKTVVCGTIYVGGKEVNCCMDKTSDNAILNGLGKGMNFMENTFSFCV
HNTX-XVIII-6	46 ACSKQIGDKCKRNCCCGKTVVCGTIYVGGKEVNQCMDKTSDNAILNRLGKGMNFIENTFSFCV

Figura 40 - Alinhamento da Avinina e da Aviensina com as hainantoxinas HNTX-XVIII-5, HNTX-XVIII-2, HNTX-XVIII-7 e HNTX-XVIII-6 do veneno da aranha *Haplopelma hainanum*, toxinas que possuem o motivo "nó de cistina" do tipo *inhibitory cysteine knot*. Como visto anteriormente, a Avinina e a Aviensina apresentam similaridade com estas hainantoxinas. Estão destacadas as cisteínas entre as quais se formam as pontes dissulfeto (entre C1-C5, C2-C6, C3-C8 e C4-C7).

As massas moleculares da Avinina e da Aviensina foram identificadas através do software MassAnalyzer (Figura 41). Elas possuem massa de 6839,1 e 6855,6 Da, respectivamente, que correspondem exatamente à sequência peptídica identificada pelo software PEAKS 7.5 (Figuras 36 e 37): SKQLHQSCSDNCDCCGATVVCASVWVGSKE SRMCKEKTSDNSILNFFGKGINAVSNFSMC e GCTKQLNQRCEDNCDCCGSTVV CGSVWVGGKEVKTCKEKTSDNWILNMAGKGLNMMKNAASVCV.

Tendo conhecimento da massa molecular, foi possível calcular a CMI e a CMB dos peptídeos, os resultados são mostrados na Tabela 6. Em comparação com a Juruenina e a Juruensina, que também impediram o crescimento de *E. coli* SBS 363 e *M. luteus* A270, os valores de CMI e a CMB Avinina e da Aviensina foram, em geral, menores. Os ensaios hemolíticos realizados mostraram que esses PAMs não causam a hemólise de hemácias humanas.

Tabela 6 - Valores de concentração mínima inibitória - CMI e concentração mínima bactericida - CMB obtidos nos ensaios antimicrobianos realizados com os peptídeos antimicrobianos Avinina e da Aviensina, isolados do veneno de *Avicularia juruensis*.

Mionongonismo	Avi	nina	Avie	nsina
testado	CMI (µM-µg/mL)	CMB (µM-µg/mL)	CMI (µM-µg/mL)	CMB (µM-µg/mL)
Escherichia coli SBS 363	1 - 6,87	2 - 13,74	6,5 - 45,2	13 - 90,4
Micrococcus luteus A270	8 - 54,95	16 - 109,9	13 - 90,4	26 - 180,8



Figura 41 - Determinação das massas moleculares da Avinina e da Aviensina através do software MassAnalyzer 1.03 (Amgen). A) A deconvolução dos íons indica que a Avinina possui massa molecular 6839,1 Da, que corresponde exatamente à massa da sequência peptídica encontrada pelo software PEAKS 7.5 (Figura 36). B) A deconvolução dos íons indica que a Aviensina possui massa molecular 6855,1 Da, que corresponde exatamente à massa da sequência pelo software PEAKS 7.5 (Figura 37).

A presença de PAMs no veneno de aranhas provavelmente é de grande importância. Sendo o envenenamento o primeiro passo da alimentação, eles são, portanto, injetados na presa antes da ingestão da mesma. Desta forma, eles podem desinfectar o alimento antes que ele seja consumido, garantindo que o animal não seja contaminado com microrganismos patogênicos.

Além de auxiliar no entendimento do papel biológico e funcionamento, o estudo de PAMs é bastante interessante devido ao fato de que estas moléculas são capazes de agir em diferentes compartimentos celulares. Sendo assim, elas se tornam candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos que podem vir a ser empregados no combate a microrganismos resistentes aos antibióticos atuais (Daffre et al., 2001).

4.2 Perfil eletroforético do veneno

Uma quantidade de 100 µg de veneno de *A. juruensis* foi analisada através da técnica de eletroforese, sob condições não redutoras e redutoras. Foram feitos géis com concentrações de 8, 10, 12 e 15% de poliacrilamida. Nos géis com menor concentração foi possível observar melhor as moléculas de alta massa molecular, enquanto que nos géis com maior concentração de poliacrilamida as proteínas de baixa massa molecular foram mais bem visualizadas (Figura 42).

O perfil eletroforético obtido para o veneno não reduzido indicou a presença de proteínas com massa entre 130 e 95 kDa, entre 72 e 43 kDa e entre 17 e 10 kDa. A coloração por nitrato de prata possibilitou a visualização de outras moléculas com massa entre 26 e 17 kDa (Figura 42 D). Sob condições redutoras o veneno apresenta grande quantidade de proteínas com massa entre 95 e 72 kDa, entre 72 e 55 kDa, entre 55 e 43 kDa e com massa aproximada de 10 kDa. Quando o gel foi corado com nitrato de prata foi possível identificar a presença de outras moléculas com massa aproximada de 55 kDa (Figura 42 C) e com massa entre 34 e 26 kDa (Figura 42 B).

Estes resultados indicam que algumas proteínas que compõem o veneno de *A*. *juruensis* possuem pontes dissulfeto em sua estrutura, pois observa-se que as moléculas não apresentam a mesma massa quando analisadas sob as condições não redutoras e redutoras. O β -mercaptoetanol presente no tampão de amostra e o aquecimento que é realizado em análises redutoras provocam a quebra destas pontes, destruindo conformação tridimensional da molécula. Assim, as subunidades que compõem a proteína correm separadamente de acordo com a massa de cada uma delas. Isso justifica o fato de serem obtidos diferentes perfis eletroforéticos nas duas condições e comprova que algumas proteínas do veneno possuem pontes dissulfeto.



Figura 42 - Perfil eletroforético do veneno de *Avicularia juruensis*, analisado sob condições não redutoras e redutoras. O experimento foi realizado em géis com diferentes concentrações de poliacrilamida. Todos foram corados tanto com azul de coomassie R-250 quanto com nitrato de prata. A) Gel com concentração de 8% de poliacrilamida. B) Gel com concentração de 10% de poliacrilamida. C) Gel com concentração de 12% de poliacrilamida. D) Gel com concentração de 15% de poliacrilamida. Marcador: Padrão de massa molecular PageRuler[™] Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.). S/R: Veneno analisado sobre condições não redutoras. C/R: Veneno analisado sobre condições redutoras.

Trabalhos realizados com o veneno das aranhas *Acanthoscurria gomesiana* (Abreu, 2016), *Acanthoscurria natalensis* (Borges, 2008), *Nhandu coloratovillosus* (Fernandes, 2010) e *Vitalius dubius* (Rocha-e-Silva et al., 2009) (Figura 43) indicam que em todos eles há a presença de proteínas com massa molecular acima de 100 kDa e com massa aproximada de 40-45 kDa, além de moléculas menores que 15 kDa, o mesmo observado para *A. juruensis*.

Estas proteínas, provavelmente, estão comumente presentes nos venenos de espécies da família Theraphosidae, já que todas estas aranhas citadas pertencem a este grupo.



Figura 43 - Perfil eletroforético dos venenos das aranhas terafosídeas *Acanthoscurria gomesiana* (Fonte: Abreu, 2016), *Acanthoscurria natalensis* (Fonte: Borges, 2008), *Nhandu coloratovillosus* (Fonte: Fernandes, 2010) e *Vitalius dubius* (Fonte: Rocha-e-Silva et al., 2009). As bandas com massa molecular acima de 100 kDa, com massa aproximada de 40-45 kDa e com massas menores que 15 kDa, semelhantes às observadas no veneno de *Avicularia juruensis*, estão destacadas com os retângulos.

Apesar das semelhanças observadas, descritas anteriormente, cada espécie apresentou um perfil eletroforético específico para seu veneno. Segundo García-Arredondo et al., (2015), cada aranha possui veneno composto por uma mistura particular de componentes que se ligam a alvos específicos. Essa variação possivelmente é resultado evolutivo da diversidade alimentar de cada espécie. Outro fator que também pode influenciar nas diferenças observadas é o período no qual foi feita a coleta. Em estudo realizado por Herzig (2010) foi observado que em época de muda a produção de veneno da aranha *Coremiocnemis tropix* é drasticamente reduzida. Já em análises realizadas por Boevé et al., (1995) notou-se que após a alimentação os componentes tóxicos do veneno da espécie *Cupiennius salei* demoram por volta de 8 a 16 dias para serem repostos, modificando consideravelmente a quantidade de proteínas. Sendo assim, estes fatos podem explicar as diferenças observadas no veneno de *A. juruensis* com relação aos das espécies *A. gomesiana*, *A. natalensis*, *N. coloratovillosus* e *V. dubius*, apesar de todas elas pertenceram à mesma família.

Em geral, o veneno de aranhas terafosídeas é constituído por sais, neurotransmissores, compostos de baixa massa molecular (ácido cítrico, nucleotídeos, aminas biogênicas, aminoácidos livres e acilpoliaminas), peptídeos, proteínas e enzimas, sendo, portanto, extremamente complexo (Escoubas, Rash, 2004; Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013).

4.3 Zimografia em gel de poliacrilamida copolimerizado com caseína

Para realizar o experimento de zimografia foram utilizados 100 µg de veneno de *A. juruensis*, o qual não foi reduzido. Ao final de experimento foi identificada uma faixa clara, que indica a degradação do substrato, na altura próxima a 95 kDa (Figura 44 A), resultado que confirma que o veneno possui enzimas capazes de clivar a caseína. Para identificar a família destas enzimas alguns géis foram incubados, separadamente, em tampões contendo inibidores de serinoproteases e metaloproteinases, sendo eles PMSF e EDTA, respectivamente. Tanto nos géis incubados com PMSF quanto nos incubados com EDTA nota-se a ausência de faixas claras (Figuras 44 B e 44 C), indicando que as enzimas podem ser metaloproteinases ou serinoproteases.



Figura 44 - Zimografia realizada com o veneno de *Avicularia juruensis*. O experimento foi feito em gel com concentração de 12% (A) e 10% (B e C) de poliacrilamida copolimerizado com 0,1% de caseína de leite bovino. A seta mostra a faixa clara, que indica que houve a degradação do substrato. A) Gel incubado em tampão sem inibidores enzimáticos. B) Gel incubado em tampão contendo PMSF. C) Gel incubado em tampão contendo EDTA. Marcador: Padrão de massa molecular PageRuler[™] Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.). *B. jar*: Veneno de *Bothrops jararaca* (controle positivo). *A. jur*: Veneno de *A. juruensis*.

Serinoproteases e metaloproteinases são bastante conhecidas no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* (família Sicariidae). Veiga et al., (2000) e Feitosa et al., (1998) identificaram estes dois grupos de enzimas no veneno da espécie *L. intermedia*. Com relação às aranhas da família Theraphosidae, a presença de enzimas também é conhecida (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013). Em estudo realizado por Sutti et al., (2014), por exemplo, foi caracterizada uma hialuronidase no veneno da espécie *Vitalius dubius*. Entretanto, os terafosídeos ainda são um grupo pouco estudado, pois até o ano de 2015 eram conhecidas 226

sequências de toxinas proteicas de apenas 20 espécies (García-Arredondo et al., 2015). Sendo assim, pouco se sabe sobre as famílias de enzimas presentes no veneno destas aranhas.

4.4 Cromatografia líquida de gel filtração e ensaio de atividade caseinolítica

Através da técnica de cromatografia líquida de gel filtração o veneno de *A. juruensis* foi fracionado de acordo com o tamanho das moléculas que o compõem (Figura 45). A fim de se identificar quais frações possuíam as metaloproteinases ou serinoproteases todas foram testadas utilizando-se o ensaio de atividade caseinolítica. As frações 7, 8 e 9, destacadas na Figura 45, foram as únicas capazes de degradar a caseína. Na Figura 46 pode ser observado o perfil de degradação da caseína que foi incubada com as frações 7, 8 e 9.



Figura 45 - Perfil cromatográfico do veneno de *Avicularia juruensis*, obtido por cromatografia líquida de gel filtração em coluna Superose 12 10/300 GL. A cromatografia foi feita sob condições isocráticas, utilizando como eluente uma solução de acetato de amônio 50 mM. A absorbância foi monitorada a 280 nm. As frações foram coletadas automaticamente a cada minuto, durante 36 minutos. Todas foram testadas através do ensaio de atividade caseinolítica e apenas as frações 7, 8 e 9, destacadas no cromatograma, foram capazes de degradar a caseína.



Figura 46 - Perfil eletroforético da degradação da caseína. As frações isoladas por cromatografia líquida de gel filtração foram incubadas com solução de caseína 2% (m/v) e aplicadas num gel com concentração de 12% de poliacrilamida, a fim de se avaliar a degradação do substrato. As frações 7, 8 e 9 (Figura 45) foram as únicas capazes de degradar a caseína. O veneno de *Bothrops jararaca* foi empregado como controle positivo e a solução de caseína incubada somente com a solução tampão foi usada como controle negativo de degradação. **Marcador:** Padrão de massa molecular SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.). **CSN:** Caseína (controle negativo). α : Subunidade alfa da molécula de caseína. β : Subunidade beta da molécula de caseína. κ : Subunidade kappa da molécula de caseína. *B. jar*: Veneno de *B. jararaca* (controle positivo). **7-9:** Frações 7-9, respectivamente.

4.4.1 Caracterização das enzimas identificadas

As concentrações das frações 7, 8 e 9, únicas capazes de degradar a caseína, foram verificadas no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), utilizando-se o comprimento de onda de 280 nm. Em seguida, foram coletadas alíquotas correspondentes à quantidade de 30 µg. As mesmas foram concentradas em centrífuga a vácuo, submetidas à redução, alquilação e tripsinização e analisadas por LC-MS/MS. Os espectros foram analisados no software PEAKS 7.5, utilizando-se a função PEAKS DB, onde foi feita a comparação com um banco de dados montado com os *contigs* obtidos na análise transcriptômica da glândula de veneno de *A. juruensis*. Os resultados mostram que para as frações 7, 8 e 9 foram identificados fragmentos peptídicos que pertencem ao *contig* Ajur72031_seq10 (Figura 47) (Apêndice VII).

Fração 7

1 MHCNSLLTIR MKIQKMHFSL FSHLPVIFTL LFIICLGNSK KTDLRQLFQN YPRNQELAAN LGTSYEVVYP VQLKVNRFRG LTTRKISADN AVEHVSNTSF LIEAHQFKIY IDLELNINLL PPTLTQFLIS TTSRQLIDED IENCYYHATV RNRSDSFGAF 81 RTCSGLSGVL YLEDNVFSIH PLDGDHTSKQ PHLLFHHYQT NEDEWKCDVD DEDEKFHCLQ ERLREIADYG SDIPLRKKYI 161 ELALIMDOAF FEMHNTPPKE VIGNAIOMIN CADLHYRSLN TSISLVHIEL WTEDVIHVEH NIOONLONLO EYLAOOYDOR 241 SMDAIHVLSG ATFNDSVIGT AESNSICTVK AVGITKVGNI HQTHVTSHVI THMLGHNLGM THDHDCCNCP YKSGCHMFNS IQSAQPFHFS SCSTEDYFRT LRKGYGVCLF NMPMLRESIC GNGILETGEE CDCGTSEVCK NSDSCCDHIT CKFVKNAQCS 401 481 SGPCCDKCKP RSPAFVCRPA KGECDIPEYC DGKNGQCPLD LFMKNGILCA GGNGYCYQGN CPVINDQCKQ LWGSDSETAD 561 PVCYOKLNVO GTPNGNCGLD RKGGYIKCSE ENTPCGSLOC KHGEKVPISS RSTVOFKINK VHOEGKTHEC KAAPSLVDKD 641 NEVHYGLVKD GTKCGYQSVC VNRTCTSLK**N YVSGRCPKDS S**SYKPCSGHG VCTNINTCYC DEGWMGHDCS RQSDDESTET

721 TSEADILDNA EYVRRAFTVG SRSSAAGTNL AIAVVATSTV IGVVLVICFT ALFIHRKSK



Fração 8

1	MHCNSLLTIR	MKIQKMHFSL	FSHLPVIFTL	LFIICLGNSK	KTDLRQLFQN	YPRNQELAAN	LGTSYEVVYP	VQLKVNRFRG
81	LTTRKISADN	AVEHVSNTSF	LIEAHQFKIY	IDLELNINLL	PPTLTQFLIS	TTSRQLIDED	IENCYYHATV	RNRSDSFGAF
161	RTCSGLSGVL	YLEDNVFSIH	PLDGDHTSKQ	PHLLFHHYQT	NEDEWKCDVD	DEDEKFHCLQ	ERLREIADYG	SDIPLRKKYI
241	ELALIMDQAF	FEMHNTPPKE	VIGNAIQMIN	CADLHYRSLN	TSISLVHIEL	WTEDVIHVEH	NIQQNLQNLQ	EYLAQQYDQR
321	SMDAIHVLSG	ATFNDSVIGT	AESNSICTVK	AVGITKVGNI	HQTHVTSHVI	THMLGHNLGM	THDHDCCNCP	YKSGCHMFNS
401	IQSAQPFHFS	SCSTEDYFRT	LRKGYGVCLF	NMPMLRESIC	GNGILETGEE	CDCGTSEVCK	NSDSCCDHIT	CKFVKNAQCS
481	SGPCCDKCKP	RSPAFVCRPA	KGECDIPEYC	DGKNGQCPLD	LFMKNGILCA	GGNGYCYQGN	C PVINDQCK Q	LWGSDSETAD
561	PVCYQKLNVQ	GTPNGNCGLD	RKGGYIKCSE	ENTPCGSLQC	KHGEKVPISS	RSTVQFKINK	VHQEGKTHEC	KAAPSLVDKD
641	NEVHYGLVKD	GTKCGYQSVC	VNRTCTSLKN	YVSGRCPKDS	SSYKPCSGHG	VCTNINTCYC	DEGWMGHDCS	RQSDDESTET
721	TSEADILDNA	EYVRRAFTVG	SRSSAAGTNL	AIAVVATSTV	IGVVLVICFT	ALFIHRKSK		



Fração 9

1	MHCNSLLTIR	MKIQKMHFSL	FSHLPVIFTL	LFIICLGNSK	KTDLRQLFQN	YPRNQELAAN	LGTSYEVVYP	VQLKVNRFRG
81	LTTRKISADN	AVEHVSNTSF	LIEAHQFKIY	IDLELNINLL	PPTLTQFLIS	TTSRQLIDED	IENCYYHATV	RNRSDSFGAF
161	R TCSGLSGVL	YLEDNVFSIH	PLDGDHT SKQ	PHLLFHHYQT	NEDEWKCDVD	DEDEKFHCLQ	ERLREIADYG	SDIPLRKKYI
	<u>a c</u>							
241	ELALIMDQAF	FEMHNTPPKE	VIGNAIQMIN	CADLHYRSLN	TSISLVHIEL	WTEDVIHVEH	NIQQNLQNLQ	EYLAQQYDQR
321	SMDAIHVLSG	ATFNDSVIGT	AESNSICTVK	AVGITKVGNI	HQTHVTSHVI	THMLGHNLGM	THDHDCCNCP	YKSGCHMFNS
401	IQSAQPFHFS	SCSTEDYFRT	LRKGYGVCLF	NMPMLRESIC	GNGILETGEE	CDCGTSEVCK	NSDSCCDHIT	CKFVKNAQCS
481	SGPCCDKCKP	RSPAFVCRPA	KGECDIPEYC	DGKNGQCPLD	LFMKNGILCA	GGNGYCYQGN	CPVINDQCKQ	LWGSDSETAD
561	PVCYQKLNVQ	GTPNGNCGLD	RKGGYIKCSE	ENTPCGSLQC	KHGEKVPISS	RSTVQFKINK	VHQEGKTHEC	KAAPSLVDKD
641	NEVHYGLVKD	GTKCGYQSVC	VNRTCTSLKN	YVSGRCPKDS	SSYKPCSGHG	VCTNINTCYC	DEGWMGHDCS	RQSDDESTET
721	TSEADILDNA	EYVRRAFTVG	SRSSAAGTNL	AIAVVATSTV	IGVVLVICFT	ALFIHRKSK		
	,							



Figura 47 - Sequência completa de aminoácidos do *contig* Ajur72031_seq10, obtida através da análise transcriptômica das glândulas de veneno de *Avicularia juruensis*. Os fragmentos peptídicos identificados por espectrometria de massas nas frações 7, 8 e 9 estão destacados pelo sombreamento em cinza e pelas barras azuis. Os espectros destes fragmentos são mostrados dentro dos retângulos. A acetilação dos N-terminais e a carbamidometilação das cisteínas (modificações pós traducionais) estão indicadas com quadrados amarelo e corde-rosa, respectivamente. As imagens foram obtidas no software PEAKS 7.5 (Bioinformatics Solutions).

O *contig* Ajur72031_seq10 foi submetido a buscas em diferentes bancos de dados utilizando-se as ferramentas InterPro (Mitchell et al., 2015) e BLASTP (Altschul et al., 1990), desta forma verificou-se que ele possui os domínios conservados Pep_M12B_propep, ZnMc_adamalisina_II_like/Reprolisina, Desintegrina e ACR/ADAM_ CR (Figura 48), típicos de metaloproteinases. Através destas buscas também foi identificado que o *contig* possui similaridades com proteínas do tipo ADAM (<u>A D</u>isintegrin <u>And M</u>etalloproteinase) de outras espécies de artrópodes, especialmente Limulus polyphemus e Polistes canadensis.

O alinhamento e a comparação de Ajur72031_seq10 com três tipos de ADAMs destas duas espécies (NCBI ID: gi|926630664, gi|926637610 e gi|954573061) mostram porcentagens de identidade de, aproximadamente, 38% (Figura 49). Quando a comparação foi feita apenas entre os aminoácidos do sítio ativo as porcentagens de identidade variaram entre 72 e 81%. Já as porcentagens de similaridade foram de 90,9%.

O alinhamento e a comparação do *contig* Ajur72031_seq10 com uma astacina-like do veneno da aranha marrom *L. intermedia* (NCBI ID: gi|122130019) mostrou menor porcentagem de identidade: 19,31% (Figura 49). Quando o *contig* foi comparado com uma SVMP (<u>Snake Venom Metalloproteinase</u>) do veneno da serpente *Echis coloratus* (NCBI ID: gi|297593890) a porcentagem de identidade também foi baixa, de apenas 29,96% (Figura 49). Apesar das baixas porcentagens de identidade observadas, quando a comparação foi feita apenas entre os aminoácidos localizados no sítio ativo destas enzimas a identidade e a similaridade ficaram maiores que 54%.

Através da ferramenta ProtParam (Gasteiger et al., 2005) foi possível determinar que o *contig* Ajur72031_seq10 possui massa molecular de, aproximadamente, 87 kDa. Essa massa se assemelha à da enzima que foi capaz de degradar a caseína no experimento de zimografia (em 4.3, Figura 44).

Como já mencionado, o *contig* Ajur72031_seq10 é uma metaloproteinase que possui domínios conservados típicos de enzimas do tipo ADAM, também chamadas de adamalisinas ou reprolisinas. Elas são uma família de proteínas que possuem, aproximadamente, 750 aminoácidos em sua estrutura e são responsáveis por uma variedade de funções, incluindo atividades proteolítica, adesiva e de sinalização celular. As ADAMs podem ser encontradas numa grande variedade de espécies, desde protozoários até vertebrados (Huovila et al., 2005; Rawlings et al., 2016; Reiss, Saftig, 2009). Estas proteínas pertencem à subfamília M12B na classificação MEROPS (Rawlings et al., 2016), que inclui também as metaloendopeptidases do tipo ADAMTSs (ADAM com o motivo tipo *thrombospondin*) e as SVMP de classe P-III (Cerdà-Costa, Gomis-Rüth, 2013; Takeda et al., 2012).



Figura 48 - Regiões de domínios conservados do *contig* Ajur72031_seq10. São eles: Pep_M12B_propep (verde), ZnMc_adamalisina_II_like/Reprolisina (vermelho e cinza), Desintegrina (laranja) e ACR/ADAM_CR (vermelho). Os números em azul indicam a posição dos aminoácidos. O sítio ativo (HMxxHxxxxH) também está indicado por setas e letras vermelhas. A imagem foi obtida na ferramenta BLASTP (Altschul et al., 1990).

Ajur72031_seq10 gi 926630664 gi 926637610	152 145 153	NRSDSFGAFRTCSGLSGVLYLEDNVESIHPLDG-DHISKOPHLLFHHYQ-TNED-EWKCDVDDEDEKFHCLQERLREIADYGSDIPLRKKYIEL NYPGAKAAFRTCNGISGVIHVQNETEVIHPFFGVDLPMEHPHIIYQY-FGRDKRKYSCGNSYLQEWGSRHSNIYSKKFKRDIRQVTKYIEL DYPGAKVAFRTCNGISGVIHTONETEVIHPFYGCDESMNHPHVIFKHMY-FSEKKGKNSCGNSDHYEWSYKYYRKPSRISFMKYKRDVRIVNKYVEL
gi 954573061	177	DYPGASAABHTONGVSGVIHIGNETBVIHPFYGGDLSOKHPHVIJEARTKADKGCANSGTSEWRNRROKHILWLSENTSDRYKRDVRETTKYLET
gi 122130019	1	
gi 297593890	114	NDADSTASISACNGIKCHFMLRGETYLTEPLKIPDSEAHAVYKYENIEXEDEAPKMCGVTH-TNWESDEPIKKASQLVATSENTKSYKKYIEL
Ajur72031_seq10	243	ALIMDQAFFEBMHNTPPKEVIGNAIQMINCADLHYRSLNTSISLVH-IELWTEDVIHVEHNIQQNUQNLQEYLAQQYD
gi 926630664	235	ALVLDQAMEENSTRNLVISDALQIINCVDMYMKSINTRISVAY-IETWEYE-D-QMRISRDLKKTVLDLLVYASRHLL
gi 926637610	249	ALVLDQAMVSLSSCILFDSRNTSVTSVINDAVQIINCVDMYESSINTEISIVY-IETWGHDGD-QMEVVSNVRQTULSFMGVVSRKLF
gi 954573061	272	AVIIDKAMFDKRNGSTRAEVVHDAIQVANIADLYFRTUNTRVSVVY-UETWQGANQAKITKDMDIGEAMVQFSBYMFRKVY
gi 122130019	8	FAFIVGCFCHDFETVISNQDP-IVDGMRIVE-GDMLDDDGPLFTERNAWKYDQQLWPNG-EIVYEISPG-RQYEQIIREAWRTYEDNTCIKFRRR
gi 297593890	206	VVVADYIMPRKYDRNSTA KTRIYEIVNTLN AYIVFSIHVATTH-UPIWSKKDQIKVQSAADVTUHLFGDWREKNLL
		Sítio Ativo
Ajur72031_seq10	319	QRSMDAIHVLSCATENDSVIGTAESNSICTVKA-VGITKVGNIHQTHVTSHVITHMLGHNLGMTHDHDCCNCPYKSGCHMFNSI
gi 926630664	310	KVTKDATHMLTGRTFVGNVAGMAVPDSICKSNA-VGVSQVTNIFEPNVVAVTVTHMLGHNLGISHDH-SNECYCEDWWGCIMEQSIM
gi 926637610	335	KVAKDATHLLTGRSFGGMEVGMAVPDTICTEKA-VGVSQDSNIYEPHLTAITVTHMLGHNLGLSHDT-SEDCKCQDWWGCIMSASVL
gi 954573061	352	NVAQDTTQLLTGETERGGESGMAAPQTVCTQKS-LCISVDLNTYEPHLLAGTMAHMIGHNIGMAHDDGRSECSCHDWHGCIMAQSIV
gi 122130019	100	TNEADYVNIHVGDRCYSRVGKSFRGGPQPLSIGRGCTDFGTILHELGHSVGFDHDHSRADRDEF-LIIHKENIKNGSEH
gi 297593890	283	TRKKHDNAQ <mark>ILITG</mark> INFKGQTI GRAPVSGMCSPKSSVGVIQD-YCKNYFIVAFTMAHE <mark>IGHNIGM</mark> DHDNGSCNCEDK-SCIMSAVA
Ajur72031 seq10	402	QSAQPFHFSSCSTEDYERTLRKGYGVCLFNMPMLRESICGNGILETGEECDCGTSEVCKNSDSCCDHITCKFVKNAQCSSGPCCDK
gi 926630664	395	GHNSIQPYQFSNCTKEDYLKTFKLGNGICLLNKPGELETFKSCGNGVVEGEEECDCGNIEDCMREDPCCDPITCKLKLEAQCSAGPCCIN
gi 926637610	420	GKNQIQPYHFSTCSKEKYVYSLKSGHAICLLNKPNQLHDFTDCGNGKIEGEEECDCGNFEDCKQNDPCCDPITCKLKMEAECAMGDCCDR
gi 954573061	438	GLONVQPYKFSECSKSDYTKALRSGHGLCLFNKPNELEIRRTCGNRVIDEGEOCDCGSHEECHELDPCCDPITCKLTSEAQCASGPCCNN
gi 122130019	178	NFDKLWENNTRTIGPEDYDSIMLYGAY-AFSKDTRKFKTMEPVEPGLPMKSVIQKCKLSYYDIVKVNKLYKCPPVNPYPGGIRPYVNV
gi 297593890	366	GPEPFESESDCSWNDYRRFRNSDQSKCIDNKPLKTDIVSPSVCGNYFVEVGEECDCGSPTYCQNPCCDAATCKLKPGAECGDGMCCDQ

Continuação na Página 92.



Figura 49 - Alinhamento do *contig* Ajur72031_seq10 com três tipos de ADAMs (<u>A Disintegrin And Metalloproteinase</u>) de Limulus polyphemus e Polistes canadensis, uma SVMP (<u>Snake Venom Metalloproteinase</u>) do veneno da serpente Echis coloratus e uma astacina-like do veneno da aranha Loxosceles intermedia. Os aminoácidos conservados são mostrados em preto, os que possuem o mesmo caráter químico são mostrados em cinza e os aminoácidos não conservados são mostrados em branco. As porcentagens de identidade, comparando-se com a primeira sequência, estão indicadas no final da sequência de aminoácidos de cada molécula. O Símbolo (-) representa os gaps. O sítio ativo está indicado por uma linha preta. NCBI ID gi/926630664: ADAM 11-like (L. polyphemus). gi/926637610: ADAM 9-like (L. polyphemus). gi/954573061: ADAM 11-like isoforma X12 (P. canadensis). gi/122130019: Loxosceles astacina-like protease 1. gi/297593890: Metaloproteinase (E. coloratus).

As enzimas do tipo ADAM possuem sítio ativo normalmente composto pela sequência HExxHxxGxx(H,D) (Cerdà-Costa, Gomis-Rüth, 2013). As histidinas estão envolvidas na ligação com o metal, que é essencial para a atividade catalítica da enzima (Gremski et al., 2014). Um aminoácido em geral, na maioria das vezes um ácido glutâmico, fica localizado próximo ao local de ligação com o metal e tem papel importante durante a catálise (Cerdà-Costa, Gomis-Rüth, 2013). O *contig* Ajur72031_seq10 possui sítio ativo composto pela sequência HMxxHxxGxxH, assim como ocorre com as ADAMs de *L. polyphemus* (NCBI ID: gi|926630664 e gi|926637610) e *P. canadensis* (NCBI ID: gi:954573061), por exemplo. Os resultados obtidos sugerem que a substituição do ácido glutâmico por uma metionina, um aminoácido apolar alifático, aparentemente não afeta a função desta metaloproteinase do veneno de *A. juruensis*.

4.4.1.1 Outras metaloproteinases identificadas por análise transcriptômica

Com o intuito de se identificar outras metaloproteinases entre as proteínas preditas pela análise transcriptômica, foram efetuadas pesquisas utilizando os padrões "HE[A-Za-z]{2}H[A-Za-z]{2}G[A-Za-z]{2}H" e "HM[A-Za-z]{2}H[A-Za-z]{2}G[A-Za-z]{2}H". Assim, foram identificados outros cinco *contigs* com sítio ativo típico de metaloproteinases: Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 e Ajur76134_seq1 (Apêndices VIII, IX, X, XI e XII, respectivamente). Eles possuem domínios conservados comuns de ADAMs, MMPs (*Matrix Metalloproteinases*) e metalopeptidases do tipo astacina-like de outras espécies de artrópodes (Figura 50).

Ajur8793_seq 1



Continuação na Página 95.

Ajur66621_seq 1





Figura 50 - Regiões de domínios conservados dos *contigs* Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 e Ajur76134_seq1. Ajur8793_seq1 e Ajur16413_seq1 possuem o domínio ZnMc (cor-de-rosa). Ajur64801_seq2 tem o mesmo domínio citado, além do domínio tipo Pep_M12B_propep (verde). Ajur66621_seq1 possui o domínio ZnMc_MMP/Peptidase M10 (vermelho e cinza) e HX (azul). Finalmente, o *contig* Ajur76134_seq1 tem os mesmos domínios citados e também possui o domínio tipo PG_binding_1 (vermelho). Os números em azul indicam a posição dos aminoácidos. Todos os *contigs* têm sítio ativo composto pela sequência HExxHxxxxH, indicada por setas e letras vermelhas nas imagens. As figuras foram obtidas na ferramenta BLASTP (Altschul et al., 1990).

O *contig* Ajur8793_seq1 possui o domínio conservado ZnMc, uma região típica de metaloproteinases dependentes de zinco. Ele apresenta 98% de identidade com uma ADAMTS da aranha *Stegodyphus mimosarum*.

O *contig* Ajur16413_seq1 apresenta o mesmo domínio conservado citado anteriormente e 48% de identidade com um astacina-like do escorpião *Tityus serrulatus*. As astacinas são uma família de metaloproteinases envolvidas na digestão de alimentos e na ativação de fatores de crescimento, degradação de polipeptídeos e processamento de moléculas extracelulares (da Silveira et al., 2007b).

Assim como Ajur72031_seq10, o *contig* Ajur64801_seq1 possui os domínios Pep_M12B_propep e ZnMc e mostrou similaridade com ADAMs de *L. polyphemus*.

Por fim, Ajur66621_seq1 e Ajur76134_seq1 apresentaram similaridade com MMPs das aranhas *Parasteatoda tepidariorum* e *S. mimosarum*, com porcentagens de identidade superiores a 60%. Além disso, eles têm domínios conservados típicos desta classe de enzimas. As MMPs, também conhecidas como matrixinas, são proteinases capazes de degradar todos os componentes da matriz extracelular (Löffek et al., 2011).

O alinhamento e a comparação destes cinco *contigs* com as mesmas metaloproteinases com as quais foram feitos os alinhamentos de Ajur72031_seq10 (Figura 49) indicam maior similaridade apenas entre os aminoácidos do sítio ativo destas enzimas (Figura 51), com porcentagens de identidade e similaridade maiores que 45%.

Como foi visto nos resultados mostrados, no veneno da aranha *A. juruensis* foram identificadas seis metaloproteinases, cada uma com domínios conservados característicos de classes de enzimas específicas. As metaloproteinases são enzimas proteolíticas cuja atividade é dependente da presença de íons divalentes em seu sítio catalítico, geralmente zinco ou, eventualmente, níquel, manganês ou cobalto (Cerdà-Costa, Gomis-Rüth, 2013). Essas enzimas são comuns em venenos de serpentes, aranhas marrom e escorpiões e podem atuar sobre a proliferação e diferenciação celular e na remodelagem da matriz extracelular (Oliveira et al., 2015).

Ajur8793_seq1	6	CRRFPCGRCNRGTAGFAYVGGACV
Ajur16413_seq1	1	YCYVFPGDGCWSYLCK-ICCOMSTIC
Ajur64801_seq2	293	FRGIKFVVQRIKVNDTRACGPNFRKGNPFCSPNIDVSNFLNLNSQFNHDDFCLAYIFTYRDFSGGTLGLAWVASASGASGGICEKYKSYT
Ajur66621_seq1	1	RVNLDIRSEEGDHGDCDPFDGPGKTLAHAFF
Ajur76134_seq1	127	-TSISYKISKYSKKLADQKKTKREIVRALNIWSEVTPLDFVEQKKTKHGKGVIDIRBERGEHGDEDPFDGEDMTLAHAFF
gi 926630664	284	E-D-QMRISRDLKKTVLDLLVYASRHIIKVTKDATHMLTGRTEVENVAGMAVBDSICK
gi 926637610	308	DGD-QMEVVSRVRQTLLSFMGYVSRKLFKVAKDATHLLTGRSEGCMEVGMAVEDTICT
gi 954573061	324	ANQAKITKDMDIGEAMVQFSEYMFRKVYNVAQDTTQLLTGETERGGESGMAAPQTVCT
gi 122130019	64	-GEIVYELSPGLQYEQIIREAMRTYEDNTCLKFRRRTNEADYVNLHVGDRCYSRVCKSBRGGPQPLS
gi 297593890	257	KDQIKVQSAADVTLHLFGDWREKNLL-TRKKHDNAQLLTGINEKCQTLGRAPVSGMCS

Sítio ativo

Ajur8793_seq1	50	VN-KRLEKVNSVAIIEDSGGFSGIIVAAHEIGHLIGCVHDGSPPPSYLGGPGATHCPWEDGFIMSDLRHTERGFKWSSCSVEQEKHF
Ajur16413_seq1	46	DDHVIILWDNISKDWQSQYRKE
Ajur64801_seq2	383	ENIAGRQVQTKRSLNTGVITFVNYNSRVPPKVSELTLAHEIGHN <mark>FG</mark> SPHD <mark>YPKECRPGGSRGNF</mark> IMYASATSGDR
Ajur66621_seq1	43	PQFGGD-AHFDDEEKWTISE-RYGTNLFQVAAHE <mark>FGH</mark> SLGLAHSDNQKALMAPYY-RKYEPAFELH
Ajur76134_seq1	206	PQFGGD-VHFDDDEEWTLDEQKTGTNLFQIAAHE <mark>FGH</mark> SLGLSHSDNVKALMNPYPPWKYRPTFKLH
gi 926630664	340	SN-AVGVSQVTNIFEPNVVAVTVTHMLGHNLGISHDH-SNECYCPDWWGCIMEQSIMGHNSIQPYQFSNCTKEDYLKT
gi 926637610	365	EK-AVGVSQDSNIYEPHLTAITVTHMLGHNLGLSHDT-SEDCKCQDWWGCIMSASVLGKNQIQPYHFSTCSKEKYVYS
gi 954573061	382	QK-SLGISVDLNTYEPHLIAGTMAHMIGHNIGMAHDDGRSECSCHDWHGCIMAQSIVGLQNVQPYKFSECSKSDYTKA
gi 122130019	131	DEFLITHKENIKNGSEHNBDKL
gi 297593890	314	PK-SSVGVIQD-YCKNYFLVAFTMAHELGHNLGMDHDNGSCNCPDK-SCIMSAVA-GPEPFESESDCSWNDYRRF

Ajur8793 seq1	136	LHGET T
Ajur16413 seq1	98	SSTTYGIQGDYDCESVMHYPNQAPNTRKPAFEWVNNSCK-NP-SRVGQRNGQTEIDKGKMKKIYSCN
Ajur64801_seq2		
Ajur66621_seq1	106	SDDVKAIQALYGSSEDPVTEESE-EDASGPPPDISDAP-DLCQDGSIDAVERTINGSTYVFKCAFY-WR
Ajur76134_seq1	271	ADDIKAVQTLYGPREKKPNNMIEGDNDVTSVSDVSDAPNLCQDASIDTVERTQDGNTYFFKCDYYWK
gi 926630664	416	FKLGNGICLLNK-PGELETFKSCGNGVVPGEEECDCGNIEDCMREDPCCDPITCKLKLEAQCSAGPCCINCR
gi 926637610	441	LKSGHAICLLNK-PNQLHDFTDCGNGKIEGEEECDCGNFEDCKQNDFCCDPITCKLKMEAECAMGDCCDRCK
gi 954573061	459	LRSGHGLCLFNK-PNELEIRRTCGNRVIDEGEQCDCGSHEECHELDPCCDPITCKLTSEAQCASGPCCNNCK
gi 122130019	183	WENNTRTIGPFDYDSIM <mark>LY</mark> GAYAFSKDTRKFKTMEPVEPGLPMKSVIQKGKLSYYDIVKVNKLYKCPPVNPYPGGIRPYVNV
gi 297593890	385	RNSDQSKCIDNK-PLKTDIVSPSVCGNYFVEVGEECDCGSPTYCQNPCCDAATCKLKPGAECGDGMCCDQCR

Continuação na Página 98.

Ajur8793 seg1		
Ajur16413 seq1		
Ajur64801 seq2		
Ajur66621 seq1	172	ILTDCIASGYPRRITDDWDCLECNLDAAITWSNCKTYFFKRGRYWRFTNKVMDVGYPKLLSVGFEGIPDGPDAAEVWSCNGKTYFFKGDEYWRDDSN
Ajur76134 seq1	338	VLRKCIAKGYPRRILDDWGCLPCNLDASFTRSNCKTFFFKGTKFWRFTNKDMDEGYPKLLSARFKSIPPGIDAAFDWCCNDKIYFVKGPQFWRYDSE
gi 926630664	487	LRTAGELCRNEADECDIPEYCNCSSGECPPDLFKKNGIECLQNQGYCFQGKCRTGREQCVFIWGYGAE
gi 926637610	512	LRAACQVCRPVATECDIPEACDCKSCQCPPNLYRKNGOSCADGNGYCFQGNCPTTDKQCSYIWGYGGV
gi 954573061	530	LRARCIVCRESTNECDLPEICDCNTGQCPPDVYKKNGSPCSDNTDYCENGICPALNLQCKQVWGYSSI
gi 122130019		
gi 297593890	456	FRPACTECRGTSSDCDVPEYCTCQSAECPLDVFQRNGQPCQSNNGYCYNGKCPIMTNQCIHLWKPGVN
Ajur8793_seq1		
Ajur8793_seq1 Ajur16413_seq1		
Ajur8793_seq1 Ajur16413_seq1 Ajur64801_seq2		
Ajur8793_seq1 Ajur16413_seq1 Ajur64801_seq2 Ajur66621_seq1	269	NEPPVSSKYPKPISSWKCLPNYIDAAFQWENQRMYFFKGDKYYRFNDLAFEVDSCDPPYPRSTSVWWFDCRSISHQTVPPESLEDYTNFTISLNYTES
Ajur8793_seq1 Ajur16413_seq1 Ajur64801_seq2 Ajur66621_seq1 Ajur76134_seq1	269 435	NEPPVSSKYPKPISSWKGLPNYIDAAFQWENQRMYFFKGDKYYRFNDLAFEVDSGDPPYPRSTSVWWFDCRSISHQTVPPESLEDYTNFTISLNYTES -EPHISPEFPKPLKVWKGLPNRIDAAFQWEDGHTYFFKGEKYYKFNDSTFKVDDGDPPYPRLTSVWWFGC
Ajur8793_seq1 Ajur16413_seq1 Ajur64801_seq2 Ajur66621_seq1 Ajur76134_seq1 gi 926630664	269 435 555	NEPPVSSKYPKPISSWKGLPNYIDAAFQWENQRMYFFKGDKYYRFNDLAFEVDSGDPPYPRSTSVWWFDCRSISHQTVPPESLEDYTNFTISLNYTES -EPHISPEFPKPLKVWKGLPNRIDAAFQWEDGHTYFFKGEKYYKFNDSTFKVDDGDPPYPRLTSVWWFGC
Ajur8793_seq1 Ajur16413_seq1 Ajur64801_seq2 Ajur66621_seq1 Ajur76134_seq1 gi 926630664 gi 926637610	269 435 555 580	NEPPVSSKYPKPISSWKGLPNYIDAAFQWENQRMYFFKGDKYYRFNDLAFEVDSGDPPYPRSTSVWWFDCRSISHQTVPPESLEDYTNFTISLNYTES -EPHISPEFPKPLKVWKGLPNRIDAAFQWEDGHTYFFKGEKYYKFNDSTFKVDDGDPPYPRLTSVWWFGC
Ajur8793_seq1 Ajur16413_seq1 Ajur64801_seq2 Ajur66621_seq1 Ajur76134_seq1 gi 926630664 gi 926637610 gi 954573061	269 435 555 580 598	NEPPVSSKYPKPISSWKGLPNYIDAAFQWENQRMYFFKGDKYYRFNDLAFEVDSGDPPYPRSTSVWWFDGRSISHQTVPPESLEDYTNFTISLNYTES -EPHISPEFPKPLKVWKGLPNRIDAAFQWEDGHTYFFKGEKYYKFNDSTFKVDDGDPPYPRLTSVWWFGG
Ajur8793_seq1 Ajur16413_seq1 Ajur64801_seq2 Ajur66621_seq1 Ajur76134_seq1 gi 926630664 gi 926637610 gi 954573061 gi 122130019	269 435 555 580 598	NEPPVSSKYPKPISSWKGLPNYIDAAFQWENQRMYFFKGDKYYRFNDLAFEVDSGDPPYPRSTSVWWFDGRSISHQTVPPESLEDYTNFTISLNYTES -EPHISPEFPKPLKVWKGLPNRIDAAFQWEDGHTYFFKGEKYYKFNDSTFKVDDGDPPYPRLTSVWWFGG

Figura 51 - Alinhamento das sequências de aminoácidos dos *contigs* Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 com três tipos de ADAMs (<u>A Disintegrin And Metalloproteinase</u>) de Limulus polyphemus e Polistes canadensis, uma SVMP (<u>Snake Venom Metalloproteinase</u>) do veneno da serpente *Echis coloratus* e uma astacina-like do veneno da aranha Loxosceles intermedia. Os aminoácidos conservados são mostrados em preto, os que possuem o mesmo caráter químico são mostrados em cinza e os aminoácidos não conservados são mostrados em branco. O Símbolo (-) representa os gaps. O sítio ativo está indicado por uma linha preta. NCBI ID gi|926630664: ADAM 11-like (L. polyphemus). gi|926637610: ADAM 9-like (L. polyphemus). gi|954573061: ADAM 11-like isoforma X12 (P. canadensis). gi|122130019: Loxosceles astacina-like protease 1. gi|297593890: Metaloproteinase (E. coloratus).

A presença de diversos tipos de enzimas como, por exemplo, hialuronidases, colagenases e esfingomielinase D é conhecida no veneno de diferentes espécies de aranhas (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013). Com relação às metaloproteinases, elas podem ser encontradas em venenos de aranhas araneomorfas das famílias Araneidae, Nephilidae, Sparassidae, Lycosidae e Sicariidae (Kuhn-Nentwig et al., 2011), nas espécies *Latrodectus* spp. (Yan, Wang, 2015), *Loxosceles* spp. (Feitosa et al., 1998), *Parawixia bistriata* (Gimenez et al., 2014) e *Hippasa partita* (Nagaraju et al., 2007a), por exemplo.

No que se refere às aranhas migalomorfas da família Theraphosidae, já foram descritas metaloproteinases no veneno das espécies *Grammostola inhering* (Borges et al., 2016) e *Haplopelma hainanum* (Cheng et al., 2016). Sendo assim, a presença de metaloproteinases no veneno da aranha *A. juruensis* é descrita pela primeira vez neste trabalho. Devido aos seus hábitos alimentares, que incluem o consumo de pequenas aves, é provável que estas enzimas tenham um papel fundamental na digestão pré-oral do alimento.

O estudo de venenos de aranhas terafosídeas é muito importante para descrever sua composição, uma vez que esse grupo é menos estudado em comparação às aranhas de importância médica, como *Latrodectus* spp. (Yan, Wang, 2015) e *Loxosceles* spp. (Feitosa et al., 1998). Além da importância biológica, o estudo destes venenos pode, eventualmente, resultar na identificação de moléculas com potencial biotecnológico, como, por exemplo, a Juruína (Ayroza et al., 2012).

5 CONCLUSÕES

Através das análises realizadas com o veneno da aranha *Avicularia juruensis* foi possível identificar a presença de sete peptídeos antimicrobianos. Um deles, a Juruína, já havia sido descrito anteriormente em outro trabalho. Os demais foram caracterizados e receberam os nomes de Avilina, Juruína_2, Avinina, Aviensina, Juruenina e Juruensina.

A Avilina apresentou ação antimicrobiana contra a bactéria *Escherichia coli* SBS 363 e causou a hemólise de hemácias humanas até a concentração de 0,875 μ g/mL. A Juruína e Juruína_2, uma isoforma da Juruína, impediram o crescimento de todos os microrganismos testados e, como já esperado, não apresentaram atividade hemolítica. Os peptídeos Avinina, Aviensina, Juruenina e Juruensina foram eficazes contra as bactérias *E. coli* SBS 363 e *Micrococcus luteus* A270 e também não causaram a hemólise de hemácias humanas. Todos esses peptídeos possuem o motivo "nó de cistina" do tipo ICK em sua estrutura e apresentaram similaridade com neurotoxinas de venenos de outras espécies de aranhas, o que indica que essas podem ser características comuns de PAMs da espécie *A. juruensis*.

A presença de PAMs em venenos é, provavelmente, de grande importância, pois estas moléculas podem desinfectar o alimento antes que ele seja ingerido e, dessa forma, evita que o animal seja contaminado.

O perfil eletroforético do veneno de *A. juruensis* indicou que ele é bastante complexo, possuindo moléculas com massa entre 130 e abaixo de 10 kDa. Comparando-se com o veneno de outras aranhas terafosídeas foi possível observar que em todos eles há a presença de proteínas com massa molecular acima de 100 kDa, com massa aproximada de 40-45 kDa e menores que 15 kDa. Apesar das semelhanças observadas, cada espécie tem um perfil eletroforético específico para seu veneno. Essa variação pode ser resultado evolutivo da diversidade alimentar de cada indivíduo ou pode ser devido ao período no qual foi feita a coleta de cada veneno.

Através dos testes de zimografia e ensaio de atividade caseinolítica observou-se que o veneno de *A. juruensis* é capaz de degradar a caseína. Utilizando espectrometria de massas e análise transcriptômica das glândulas de veneno foi possível identificar uma metaloproteinase. Ela possui os domínios conservados do tipo Pep_M12B_propep, ZnMc_adamalisina_II_like/ Reprolisina, Desintegrina e ACR/ADAM_ CR e apresenta similaridades com proteínas do tipo ADAM (<u>A Disintegrin And Metalloproteinase</u>) de outras espécies de artrópodes. Diferentemente da maioria, esta metaloproteinase possui sítio ativo composto pela sequência HMxxHxxGxxH. A substituição do ácido glutâmico por uma metionina (na posição 2 do sítio ativo) parece não afetar a capacidade de esta enzima degradar a caseína.

Analisando os resultados obtidos na análise transcriptômica foram identificadas outras cinco metaloproteinases no veneno de *A. juruensis*. Elas possuem domínios conservados comuns de ADAMs, MMPs (<u>Matrix Metalloproteinases</u>) e metalopeptidases do tipo astacinalike. A presença de todas estas enzimas é, provavelmente, bastante importante para a digestão extracorpórea do alimento, visto que esta aranha geralmente consome pequenas aves.

Os venenos de aranhas da família Theraphosidae ainda são pouco estudados e, portanto, sua caracterização é bastante importante. Além de ajudar a compreender como o veneno é constituído, as análises realizadas podem levar à descoberta de moléculas que podem vir a ter uma aplicação biotecnológica, como, por exemplo, a fabricação de bioinseticidas e medicamentos para o tratamento de diferentes doenças.

Além de tudo o que foi citado, conhecer melhor o veneno da espécie *A. juruensis* e as toxinas que o compõem se torna muito importante, pois nada se sabe sobre acidentes com essa aranha. Apesar de ser um animal dócil, cada vez mais esta espécie é criada como "pet", o que aumenta os riscos de picadas em humanos. Outro fator que também contribui para a ocorrência de acidentes é o crescente desmatamento dos locais onde esta aranha é encontrada, o que pode levar à aproximação desta com o convívio humano.

Sendo assim, o estudo do veneno da aranha *A. juruensis* se torna importante tanto do ponto de vista biológico quanto do ponto de vista biológico.

REFERÊNCIAS*

Abreu TF. Caracterização proteômica, peptidômica e transcriptômica dos venenos de aranhas do gênero *Acanthoscurria*. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 2016.

Adams ME. Agatoxins: ion channel specific toxins from the american funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. Toxicon. 2004;43(5):509-25.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215(3):403-10.

Atkinson RK, Wright LG. The involvement of collagenase in the necrosis induced by the bites of some spiders. Comp Biochem Physiol C. 1992;102(1):125-8.

Ayroza G. Peptídeos antimicrobianos do veneno de *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae). [dissertação (Mestrado em Saúde Pública)]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2012.

Ayroza G, Ferreira ILC, Sayegh RSR, Tashima AK, Silva Junior PI. Juruin: an antifungal peptide from the venom of the amazonian pink toe spider, *Avicularia juruensis*, which contains the inhibitory cystine knot motif. Front Microbiol. 2012;3(324):1-10.

Bachère E, Gueguen Y, Gonzalez M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestand B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunol Rev. 2004;198:149-70.

Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 1991;196(1):80-3.

Beechhold HF. A key to the pronunciation and meaning of scientific names of popular species, part I. Forum Magazine of the American Tarantula Society. 1997;6(4):115-8.

Beleboni RO, Pizzo AB, Fontana ACK, Carolino ROG, Coutinho-Netto J, Santos WF. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. Eur J Pharmacol. 2004;493(1-3):1-17.

Bertani R. Revision, cladistic analysis and biogeography of *Typhochlaena* C. L. Koch, 1850, *Pachistopelma* Pocock, 1901 and *Iridopelma* Pocock, 1901 (Araneae, Theraphosidae, Aviculariinae). Zookeys. 2012;230:1-94.

Bettini S, Maroli M. Venoms of Theridiidae, genus *Latrodectus*. In: Bettini S, editor. Arthropod Venoms. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 1978. vol. 48, p. 149-212.

Bode F, Sachs F, Franz MR. Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. Nature. 2001;409(6816):35-6.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet].Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Boevé JL, Kuhn-Nentwig L, Keller S, Nentwig W. Quantity and quality of venom released by a spider (*Cupiennius salei*, Ctenidae). Toxicon. 1995;33(10):1347-57.

Borges CLS. Purificação e caracterização biológicas parciais da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria natalensis*. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. Feira de Santana: Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana; 2008.

Borges MH, et al. Venomous extract protein profile of Brazilian tarantula *Grammostola iheringi*: searching for potential biotechnological applications. J Proteomics. 2016;136:35-47.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.

Brogden KA, Ackermann M, McCray PB Jr, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. Int J Antimicob Agents. 2003;22(5):465-78.

Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bactéria? Nat Rev Microbiol. 2005;3(3):238-50.

Budnik BA, et al. De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. J Mass Spectrom. 2004;39(2):193-201.

Bulet P, et al. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila carries* an O-glycosylated substitution. J Biol Chem. 1993;268(20):14893-7.

Cerdà-Costa N, Gomis-Rüth FX. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. Protein Sci. 2013;23(2):123-44.

Chaim OM, et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. Toxins. 2011;3(3):309-44.

Chambers MC, et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. Nat Biotechnol. 2012;30(10):918-20.

Cheng TC, et al. Identification and characterization of toxins in the venom gland of the Chinese bird spider, *Haplopelma hainanum*, by transcriptomic analysis. Insect Sci. 2016;23(3):487-99.

Choi SJ, et al. Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula *Psalmopoeus cambridgei*. FEBS Lett. 2004;572(1-3):109-17.

Chung EH, et al. Molecular cloning of two cDNAs encoding an insecticidal toxin from the spider, *Araneus ventricosus*, and construction of a recombinant baculovirus expressing a spider toxin. Int J Indust Entomol. 2002;4(1):43-9.

Coddington JA, Levi HW. Systematics and evolution of spiders (Araneae). Annu Rev Ecol Syst. 1991;22:565-92.

Cohen L, Moran Y, Sharon A, Segal D, Gordon D, Gurevitz M. Drosomycin, an innate immunity peptide of *Drosophila melanogaster*, interacts with the fly voltage-gated sodium channel. J Biol Chem. 2009;284(35):23558-63.

Corzo G, Escoubas P. Pharmacologically active spider peptide toxins. Cell Mol Life Sci. 2003;60(11):2409-26.

Craik DJ, Daly NL, Waine C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. Toxicon. 2001;39(1):43-60.

da Silveira, RB, et al. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. Toxicon. 2007a;49(6):758-68.

da Silveira RB, et al. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. Biochem J. 2007b;406(2):355-63.

Daffre S, et al. Peptídeos antibióticos: peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento. 2001;23:48-55.

de Paula Le Sueur L, Kalapothakis E, da Cruz-Höfling MA. Breakdown of the blood-brain barrier and neuropathological changes induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. Acta Neuropathol. 2003;105(2):125-34.

Dias SC. Color pattern changes in *Pachistopelma rufonigrum* Pocock (Araneae, Theraphosidae). Revista Brasileira de Zoologia. 2004;21(1):153-4.

Doyle DA, et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. Science. 1998;280(5360):69-77.

Escoubas P, Diochot S, Corzo G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. Biochimie. 2000;82(9-10):893-907.

Escoubas P, Rash L. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. Toxicon. 2004;43(5):555-74.

Estrada G, Villegas E, Corzo G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. Nat Prod Rep. 2007;24(1):145-61.

Feitosa L, et al. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. Toxicon. 1998;36(7):1039-51.

Fernandes SCR. Caracterização química e biológica de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira *Nhandu coloratovillosus* (Schmidt, 1998). [dissertação (Mestrado em Biologia Animal)]. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília; 2010.

Ferreira ILC, Silva Junior PI. Acilpoliaminas do veneno da aranha brasileira *Nephilengys* cruentata: antigos neuromoduladores como uma nova alternativa no desenvolvimento de

fármacos antimicrobianos. In: Inovação tecnológica na saúde: edição 2012 do Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia; 2012; Brasília: UNESCO; p. 37.

Fitches E, et al. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. J Insect Physiol. 2004;50(1):61-71.

Foelix RF. Biology of Spiders. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2011. 419 p.

Fry BG, et al. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2009;10:483-511.

Fujitani N, et al. The solution structure of horseshoe crab antimicrobial peptide Tachystatin B with an inhibitory cystine-knot motif. J Pept Sci. 2007;13(4):269-79.

Fukushima CS. Revisão taxonômica e análise cladística do gênero *Avicularia* Lamarck 1818 (Araneae, Theraphosidae, Aviculariinae). [tese (Doutorado em Zoologia)]. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2011.

García-Arredondo A, Rodríguez-Rios L, Díaz-Peña LF, Vega-Ángeles R. Pharmacological characterization of venoms from three theraphosid spiders: *Poecilotheria regalis, Ceratogyrus darlingi* and *Brachypelma epicureanum*. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2015;21(15):1-9.

Gasteiger E, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, editor. The Protein Protocols Handbook. 1st ed. New York: Humana Press; 2005. p. 571-607.

Geer LY, et al. The NCBI BioSystems database. Nucleic Acids Res. 2010;38:D492-6.

Gimenez GS. Caracterização bioquímica e toxicológica do veneno da aranha *Parawixia bistriata*: Isolamento de uma enzima proteolítica. [dissertação (Mestrado em Biologia Experimental)]. Porto Velho: Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia; 2013.

Gimenez GS, et al. Biochemical and functional characterization of *Parawixia bistriata* spider venom with potential proteolytic and larvicidal activities. Biomed Res Int. 2014;2014:1-13.

Gomes PC, et al. A low molecular mass neuroactive compound from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. Toxicon. 2011;57(2):266-74.

Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol. 2010;27(2):221-4.

Grabherr MG, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat Biotechnol. 2011;29(7):644-52.

Graf B, Nentwig W. Ontogenetic change in coloration and web-building behavior in the Tropical Spider *Eriophora fuliginea* (Araneae, Araneidae). J Arachnol. 2001;29:104-10.

Gremski LH, et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. Mol Biosyst. 2010;6(12):2403-16.

Gremski LH, et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. Toxicon. 2014;83:91-120.

Grishin EV. Black widow spider toxins: the present and the future. Toxicon. 1998;36(11):1693-701.

Guharay F, Sachs F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. J Physiol. 1984;352:685-701.

Haeberli S, Kuhn-Nentiwig L, Schaller J, Nentwig W. Characterization of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). Toxicon. 2000;38(3):373-80.

Hao G, Shi YH, Tang YL, Le GW. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. Peptides. 2009;30(8):1421-7.

Herzig V. Ontogenesis, gender, and molting influence the venom yield in the spider *Coremiocnemis tropix* (Araneae, Theraphosidae). J Venom Res. 2010;1:76-83.

Herzig V, et al. ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. Nucleic Acids Research. 2011;39:D653-7.

Herzig V, King GF. The neurotoxic mode of action of venoms from the spider family theraphosidae. In: Nentwig W, editor. Spider Ecophysiology. 1st ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2013. part. V, p. 203-15.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway JRCA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science. 1999;284(5418):1313-8.

Holl A. Coloration and chromes. In: Nentwig W, editor. Ecophysiology of Spiders. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 1987. part. A, p. 16-25.

Huovila APJ, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Kärkkäinen I, Ortiz RM. Shedding light on ADAM metalloproteinases. Trends Biochem Sci. 2005;30(7):413-22.

Jiang L, Peng L, Chen J, Zhang Y, Xiong X, Liang S. Molecular diversification based on analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*. Toxicon. 2008;51(8):1479-89.

Jung HJ, et al. Lipid membrane interaction and antimicrobial activity of GsMTx-4, an inhibitor of mechanosensitive channel. Biochem Biophys Res Commun. 2006;340(2):633-8.

Kaiser, E. Enzymatic activity of spider venoms. In: Buckley EE, Porges N, editors. Venoms. Washington: American Association for the Advancement of Science; 1956. p. 91-3.

Khan ZU, Ahmad S, Al-Obaid I, Al-Sweih NA, Joseph L, Farhat D. Emergence of resistance to amphotericin B and triazoles in *Candida glabrata* vaginal isolates in a case of recurrent vaginitis. J Chemother. 2008;20(4):488-91.

Kozlov SA, Vassilevski AA, Feofanov AV, Surovoy AY, Karpunin DV, Grishin EV. Latarcins, antimicrobial and cytolitic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. J Biol Chem. 2006;281(30):20983-92.

Kuhn-Nentwig L, Schaller J, Nentwig W. Purification of toxic peptides and the amino acid sequence of CSTX-1 from the multicomponent venom of *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). Toxicon. 1994;32(3):287-302.

Kuhn-Nentwig L, Muller J, Schaller J, Walz A, Dathe M, Nentwig W. Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the *spider Cupiennius salei* (Ctenidae). J Biol Chem. 2002;277(13):11208-16.

Kuhn-Nentwig L, Stöcklin R, Nentwig W. Venom composition and strategies in spiders: is everything possible? In: Casas J, editor. Advances in Insect Physiology. Burlington: Academic Press; 2011. vol. 40, p. 1-86.

Kuhn-Nentwig L, et al. A venom-derived neurotoxin, CsTx-1, from the spider *Cupiennius salei* exhibits cytolytic activities. J Biol Chem. 2012;287(30):25640-9.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.

Leite APF. Estudos da proteína similar à esfingomielinase-D encontrada na biblioteca de cDNA da glândula da seda de *Nephilengys cruentata*. [dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)]. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília; 2006.

Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 2011;12(323):1-16.

Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. Eur Respir J. 2011;38(1):191-208.

Machado D, et al. Ion channel blockers as antimicrobial agents, efflux inhibitors, and enhancers of macrophage killing activity against drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2016;11(2):e0149326.

MacKinnon R, Cohen SL, Kuo A, Lee A, Chait BT. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. Science. 1998;280(5360):106-9.

Matsuzaki K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. Biochim Biophys Acta. 2009;1788(8):1687-92.

Mazzuca M, et al. A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. Nat Neurosci. 2007;10(8):943-5.

McCormick KD, Meinwald J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. J Chem Ecol. 1993;19(10):2411-51.

Mello-Leitão CF. Theraphosoideas do Brasil. São Paulo: Revista do Museu Paulista; 1922. 438 p.

Mitchell A, et al. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. Nucleic Acids Res. 2015;43:D213-21.

Mourão CBF. Prospecção de peptídeos neuroativos da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*. [dissertação (Mestrado em Biologia Animal)]. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília; 2012.

Nagaraju S, Devaraja S, Kemparaju K. Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partida* (funnel web spider) venom gland extract. Toxicon. 2007a;50(3):383-93.

Nagaraju S, Girish KS, Fox JW, Kemparaju K. 'Partitagin' a hemorrhagic metalloprotease from *Hippasa partita* spider venom: role in tissue necrosis. Biochimie. 2007b;89(11):1322-31.

Nentwig W, Kuhn-Nentwig L. Main components of spiders venoms. In: Nentwig W, editor. Spider Ecophysiology. 1st ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2013. part. V, p. 191-202.

Norton RS, Pallaghy PK. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. Toxicon. 1998;36(11):1573-83.

Nunes KP, et al. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. Toxicon. 2008;51(7):1197-206.

Odell GV, Fenton AW, Ownby CL, Doss MP, Schmidt JO. The role of venom citrate. Toxicon. 1999;37(3):407-9.

Oliveira UC, Candido DM, Dorce VAC, Junqueira-de-Azevedo ILM. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. Toxicon. 2015;95:52-61.

Parra G, Bradnam K, Korf I. CEGMA: a pipeline to accurately annotate core genes in eukaryotic genomes. Bioinformatics. 2007;23(9):1061-7.

Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. Crit Rev Biotechnol. 2012;32(2):143-71.

Perkins DN, et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis. 1999;20(18):3551-67.

Pimenta AM, de Lima M. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. J Pept Sci. 2005;11(11):670-6.

Pineda SS, Wilson D, Mattick JS, King GF. The lethal toxin from Australian funnel-web spiders is encoded by an intronless gene. PLoS One. 2012;7(8):e43699.

Redaelli E, et al. Target promiscuity and heterogeneous effects of tarantula venom peptides affecting Na^+ and K^+ ion channels. J Biol Chem. 2010;285(6):4130-42.

Rash LD, Hodgson WC. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. Toxicon. 2002;40(3):225-54.

Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res. 2016;44(D1):D343-D50

Reiss K, Saftig P. The "A Disintegrin And Metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. Semin Cell Dev Biol. 2009;20(2):126-37.

Riciluca KCT, Sayegh RSR, Melo RL, Silva Junior PI. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. Results Immunol. 2012;2:66-71.

Rocha-e-Silva TAA, Sutti R, Hyslop S. Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). Toxicon. 2009;53(1):153-61.

Rohou A, Nield J, Ushkaryov YA. Insecticidal toxins from black widow spider venom. Toxicon. 2007;49(4):531-49.

Ruppert EE, Barnes RD. Zoologia dos invertebrados. 6th ed. São Paulo: Editora Roca; 1996. 1029 p.

Saez NJ, et al. Spider-venom peptides as therapeutics. Toxins. 2010;2(12):2851-71.

Schenone H, Saavedra T, Rojas A, Villarroel F. Loxoscelism in Chile. Epidemiological, clinical and experimental studies. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1989;31(6):403-15.

Shu Q, Lu SY, Gu XC, Liang SP. The structure of spider toxin huwentoxin-II with unique disulfide linkage: evidence for structural evolution. Protein Sci. 2002;11(2):245-52.

Silva Junior PI. Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*. [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2000.

Silva Junior PI, Daffre S, Bulet P. Isolation and full characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. J Biol Chem. 2000;275(43):33464-70.

Solís AJR, Villarreal ECV, Burguete GAC. Venenos arácnidos: su sorprendente poder insecticida y su rara capacidad antibiótica. Revista Digital Universitaria. 2014;15(11):1-23.

Stone KL, Gulcicek EE, Willians KR. Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrylamide gels. In: Walker JM, editor. The Protein Protocols Handbook. 3rd ed. New York: Humana Press; 2009. part. IV, p. 905-17.

Sutherland SK, Gray MR. Venoms of Dipluridae. In: Bettini S, editor. Arthropod Venoms. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 1978. vol. 48, p. 121-48.

Sutti R, Tamascia ML, Hyslop S, Rocha-e-Silva TA. Purification and characterization of a hyaluronidase from venom of the spider *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae). J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2014;20(2):1-7.

Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. Biochim Biophys Acta. 2012;1824(1):164-76.

Tedford HW, Sollod BL, Maggio F, King GF. Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. Toxicon. 2004;43(5):601-18.

The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Research. 2015;43:D204-12.

Trevisan-Silva D, et al. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). Biochimie. 2010;92(1):21-32.

Ushkaryov YA, Volynski KE, Ashton AC. The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. Toxicon. 2004;43(5):527-42.

Vassilevski AA, et al. Cyto-insectotoxins, a novel class of cytolytic and insecticidal peptides from spider venom. Biochem J. 2008;411(3):687-96.

Vassilevski AA, Kozlov SA, Grishin EV. Molecular diversity of spider venom. Biochemistry (Mosc). 2009;74(13):1505-34.

Vassilevski AA, Sachkova MY, Ignatova AA, Kozlov SA, Feofanov AV, Grishin EV. Spider toxins comprising disulfide-rich and linear amphipathic domains: a new class of molecules identified in the lynx spider *Oxyopes takobius*. FEBS J. 2013;280(23):6247-61.

Veiga SS, et al. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. Toxicon. 2000;38(6):825-39.

Windley MJ, Herzig V, Dziemborowicz SA, Hardy MC, King GF, Nicholson GM. Spidervenom peptides as bioinsecticides. Toxins. 2012;4(3):191-227.

World Spider Catalog. [Internet].Natural History Museum Bern. [2016 Apr 18]. Available from: http://wsc. nmbe.ch.

Wullschleger B, Nentwig W, Kuhn-Nentwig L. Spider venom: enhancement of venom efficacy mediated by different synergistic strategies in *Cupiennius salei*. J Exp Biol. 2005;208(Pt 11):2115-21.

Xiao YC, Liang SP. Inhibition of sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons by Hainantoxin-IV, a novel spider toxin. Acta Biochim Biophys Sin. 2003;35(1):82-5.

Xu K, Ji Y, Qu X. Purification and characterization of an antibacterial peptide from venom of *Lycosa singoriensis*. Acta Zoologica Sinica. 1989;35(3):300-5.

Xu X, Liu F, Chen J, Ono H, Li D, Kuntner M. A genus-level taxonomic review of primitively segmented spiders (Mesothelae, Liphistiidae). ZooKeys. 2015;488:121-51.

Yan L, Adams ME. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa* carolinensis. J Biol Chem. 1998;273(4):2059-66.

Yan S, Wang X. Recent Advances in Research on Widow Spider Venoms and Toxins. Toxins. 2015;7(12):5055-67.

Yount NY, Yeaman MR. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(19):7363-8.
APÊNDICE A - Imagem

Apêndice I - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur63747_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Apêndice II - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur67205_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Apêndice III - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur66926_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Apêndice IV - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur75226_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Apêndice V - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur6582_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Apêndice VI - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur50565_seq3 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Apêndice VII - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur72031_seq10 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Apêndice VIII - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur8793_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Apêndice IX - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur16413_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Apêndice X - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur64801_seq2 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Apêndice XI - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur66621_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Apêndice XII - Imagem: Sequência nucleotídica do *contig* Ajur76134_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

A. I - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur63747_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Ajur63747 seq1 atg aat caa aaa ata ata gtt ttt ctt atg gtt ctt acc ctt gtg att tgc agt cat gca gaa cag M N Q K I I V F L M V L T L V I С S Н A ΕQ gaa ttt gaa ccc gat atc gga gac gca cca cta ttt caa gag aat ttt gaa agg gga tgc ttt aga I Е F E P D G D A P LF Q E NFER GCFR gaa ggc cat gcg tgc aca aag tct gct cct tgc tgt agg ccc atg aaa tgt aaa gaa agg aaa tgc EGHA СТК S A P С С Ρ м ĸ С ĸ Е ĸ R R С act aag aca taa тк т

Legenda: As sequências foram obtidas por análise transcriptômica da glândula de veneno de Avicularia juruensis.

A. II - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur67205_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Ajur67205 seq1

gat tac gaa aca gca att gca cct ctg gaa gaa gac aga ttc acg tgt gcc ata tca tgc aac ata Y E т AIAPL EEDRFT CAIS N D С I aaa gtg aac gga aaa cca tgt aaa ggc agt ggg gag aag aag tgt tca ggc gga tgg tca tgc aaa K V NGKPCKGSG E K K C S S G G W С K ttt aat gtc tgc gta aaa gtg ggg aaa tag F N v С v K v K G

Legenda: As sequências foram obtidas por análise transcriptômica da glândula de veneno de Avicularia juruensis.

A. III - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur66926_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Ajur66962 seq1 agt gga agc aca cag ctt gtt att gta gat aaa agg aca tac att ttg gtg gcc gca ttt cgg aat т v IVDKR т v S G S 0 L Y ΙL Α Α F R N ttt tgg gat tca aag ata ccg gaa aga atg aag acg ctc agt aga gtg ttc atc ttc ggt tta ttt I P ERM K т L v F F F W D S K S R I F G L ctg cat ttt gcc ctt tca att gca gcg gaa atg aaa gaa tca gat tcc att tca ttt gcg gag gaa HFALSI Α E м к E S D S I S F \mathbf{E} L Α Α Е aag gaa gaa act gac agg gcg gaa tgc cgt tgg ttg ttt gga gga tgc aaa aag cat tca gac tgt K E E T D R A E C R W L F G G C K K H S D С tgc gag cat tta ggc tgc aga tca gat tgg aaa tat tgt gca tgg gat ggc aca ttt cgc aaa Е н L G С R s D W к Y С Α D т F R к

Legenda: As sequências foram obtidas por análise transcriptômica da glândula de veneno de Avicularia juruensis.

A. IV - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur75226_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Ajur75226 seq1

_																					
atg	aag	gca	ttc	gtt	gtg	ttg	gct	att	gca	gca	tta	gcc	ctg	ctt	tct	gtt	gtt	tgt	tat	gct	tcc
м	к	A	F	v	v	L	A	I	A	A	L	A	L	L	S	v	v	С	Y	A	S
gaa	tcg	aag	gag	cag	gat	tct	ctt	gat	gaa	atg	tcg	gcc	att	ctg	tcg	gaa	cag	cct	cag	caa	aga
Е	S	K	Е	Q	D	S	L	D	Е	М	S	Α	I	L	S	Е	Q	Ρ	Q	Q	R
gga	gac	tgc	cat	aag	ttt	ttg	gga	tgg	tgc	aga	ggc	gaa	ccg	gat	cca	tgc	tgt	gaa	cat	ttg	tct
G	D	С	H	K	F	L	G	W	С	R	G	Е	Р	D	Ρ	С	С	Е	н	L	S
tgt	agt	agg	aaa	cat	gga	tgg	tgt	gta	tgg	gat	tgg	acc	gtc	ggg	aag	taa					
С	S	R	ĸ	н	G	W	С	v	W	D	W	т	v	G	ĸ	*					

Legenda: As sequências foram obtidas por análise transcriptômica da glândula de veneno de Avicularia juruensis.

A. V - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur6582_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Ajur6582 seq1

atg	aag	cta	ttt	tcc	gtt	atc	tta	tcg	att	agc	ctg	ctt	atc	gta	gtt	gct	gct	ttg	cct	tca	aag
М	к	L	F	S	v	I	L	S	I	S	L	L	I	v	v	Α	A	L	Ρ	S	ĸ
att	cgc	gaa	gaa	gat	gac	ctt	gga	gaa	ctc	acg	caa	gat	ttg	gaa	ttg	att	cca	gag	act	tct	aga
I	R	Е	Е	D	D	L	G	Е	L	т	Q	D	L	Е	L	I	Ρ	Е	т	S	R
gaa	tgc	tcg	aaa	caa	ctt	cat	caa	tcc	tgt	agt	gat	aac	tgc	gac	tgt	tgt	ggg	gca	act	gtt	gtc
Е	С	S	к	Q	L	H	Q	S	С	S	D	N	С	D	С	С	G	A	т	v	v
tgc	gct	tct	gtt	tgg	gta	gga	agc	aag	gag	agt	aga	atg	tgt	aag	gaa	aaa	acg	tct	gac	aac	agc
С	A	S	v	W	v	G	S	к	Е	S	R	М	С	к	E	к	т	S	D	N	S
atc	ttg	aat	ttt	ttc	ggt	aaa	ggc	ata	aat	gca	gta	tca	aat	ggt	ttt	tcc	atg	tgt	ggt	cga	aaa
I	L	N	F	F	G	к	G	I	N	Α	v	S	N	G	F	S	М	С	G	R	к
tag																					
+																					

Legenda: As sequências foram obtidas por análise transcriptômica da glândula de veneno de Avicularia juruensis.

A. VI - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur50565_seq3 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

```
Ajur50565 seq3
atg aag ctc ttt tcc gtt gtc gta ttg atc act ctt cta atc gca gtt att gct ttg cct tca aag
                 v v
                                                    v
М
   к
                        VLI
                                  TLLIA
      L
          F
              S
                                                       I
                                                            Α
                                                               L
                                                                  P
                                                                      S K
att cgt gga gaa gat gat tta gaa aac aca aag ctg att gga aaa ctc atg gaa gac ttg gaa ttg
Т
   R
       G
          Е
              D
                 D
                     L
                        E
                           N
                               т
                                  ĸ
                                      L
                                          Ι
                                             G
                                                ĸ
                                                    L
                                                       Μ
                                                           Е
                                                               D
                                                                  L
                                                                      E
                                                                         L
att cca gag gct cct cga ggg tgc acg aaa caa ctc aat caa cgc tgc gaa gat aac tgc gac tgt
ΙP
       E
           А
             Р
                 R
                     G
                        С
                            т
                               Κ
                                   QL
                                         N
                                              Q
                                                 R
                                                    С
                                                        Е
                                                            D
                                                               Ν
                                                                  С
                                                                      D
                                                                         C
tgt ggt tca act gtt gtt tgc ggt tct gtc tgg gta ggc ggc aag gag gta aag act tgc aag gag
                 v c
                               v
                                      v
                                                        v
C G
      S
           Т
              v
                        G
                           S
                                   W
                                         G
                                             G
                                                ĸ
                                                     E
                                                           ĸ
                                                               т
                                                                  С
                                                                     ĸ
                                                                         E
aaa aca tct gat aat tgg att ctg aac atg gcg ggt aaa ggc ttg aat atg atg aaa aat gct gct
          D
             N
                            Ν
                                м
                                          к
                                                     N
                                                               к
к
   т
      S
                  W
                     I
                        L
                                                 L
                                                        М
                                                            М
                                                                  N
                                   Α
                                       G
                                              G
                                                                      А
                                                                          А
tcg gtt tgt gta taa
   v
           v
S
       С
```

Legenda: As sequências foram obtidas por análise transcriptômica da glândula de veneno de Avicularia juruensis.

A. VII - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur72031_seq10 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Ajur72031_seq10

atg cac tgt aat tet ett etg aca ata ega atg aag ata eag aag atg eae ttt teg ttg ttt tea т Ι М K Ι K М н cat ctt cct gtt att ttt act ttg cta ttc atc att tgt tta gga aat tct aaa aaa aca gat ctc cgt caa ctg ttc cag aac tac cca agg aac cag gaa ctc gct gca aat ctt ggg acc agt tac gaa E 0 N Y P R N 0 L A N L G т gtc gtc tac ccc gtc caa cta aaa gta aac aga ttc cgt gga ctt aca aca agg aag atc tct gct N 0 L ĸ R R L т R ĸ gac aat gca gtg gaa cac gtt tog aac act tog tto otg att gaa goo cat caa tto aag att tao E H S N т S F L т E A H 0 F K т atc gat ttg gaa cta aac att aac ctt cta ccg ccg acg ctg acc cag ttc ctt att tct acc act E N N L P P т L т 0 F L Ι L т г S tca cgg cag cta att gac gag gac att gaa aac tgt tac tat cac gca act gtg agg aac cgc agc т. т D D Т E N C Y Y H A т R N R gac tee ttt ggt get tte egt act tge tet ggg eta age ggt gtt etg tat tta gaa gat aat gtg S L S G L L E ttt tca ata cat cct ctt gat gga gat cat acg tcc aag caa ccc cac ttg ctc ttt cat cat tac D H S Q H caa acg aac gaa gat gag tgg aaa tgt gat gtt gac gat gaa gat gag aaa ttc cac tgt ttg caa gag cgc ctg cgt gaa att gca gac tac ggg tct gat ata cct ctc agg aag aaa tac atc gaa cta get etc ata atg gat caa get ttt tte gag atg cae aac act eeg eet aaa gaa gta att gge aat N K E M gcg atc caa atg atc aat tgc gca gat tta cac tat cgc tct tta aac aca tcg ata tca ctg gta т I N C A D L H Y R S L N S I cat att gaa ctg tgg act gaa gat gta atc cac gtg gaa cac aat ata cag cag aat cta caa aat E D v I H v E H N I N L т 0 ctt cag gaa tac ttg gcg caa cag tac gac caa aga tcc atg gat gcc att cat gtg cta tcg ggt Y T. 0 Y D 0 R S M D Ι H gee acg ttt aac gac agt gta att gga act geg gaa agt aac age ata tge aca gtg aaa gea gta D v G т C v N S Т A E S N S т т K A gga ata aca aag gtg ggt aac ata cac cag act cat gta act tcc cat gtc ata acg cac atg ctg N H T H H v Τ ggt cac aat ctt gga atg act cat gac cac gat tgt tgt aac tgc cct tac aaa tct gga tgc cac M D H Y ĸ S atg tit aat too ata cag toa goa cag oot ttt cao ttt toa tot tgt agt act gaa gat tao ttt 0 cgc act ctt cgc aaa gga tat ggc gtg tgc ttg ttt aac atg cct atg ttg cgg gag tca ata tgc v C F N м ĸ Y G L P м L Е L R R gga aat gga att tta gaa aca gga gaa gaa tgc gac tgc gga aca tca gag gtt tgc aaa aac tcg Е E D C S K gac tog tgt tgc gat cac att act tgc aaa ttt gtg aaa aat gcg cag tgt tca tct ggg cca tgc D H I т C ĸ F ĸ N A 0 С S S P tgt gac aaa tgt aaa cct cga agt cct gca ttt gtt tgc cgc cca gct aaa ggg gaa tgc gac ata K P R Ρ A R P K E S F A D т cct gaa tat tgc gat ggc aaa aac gga cag tgc cct ttg gat ctg ttt atg aag aac ggg ata ctg D K N G 0 C P Τ. D T. F M K N т C tgt gca ggt gga aac ggt tat tgc tac caa gga aac tgc cca gtt att aac gat cag tgt aaa cag P N Y Q G N Т N D K cta tgg gga agt gac tcc gag aca gca gat cca gtt tgt tac caa aaa ctg aat gtt caa gga aca D S A D P v ĸ N cca aat ggc aac tgt gga tta gat cgg aag gga gga tat ata aag tgc tca gaa gaa aat aca cct tgc gga tct tta caa tgt aaa cac gga gaa aaa gtt cct att tcg tca cga tca act gtc caa ttt 0 K H K aaa atc aac aaa gta cac caa gaa ggg aaa act cac gag tgc aaa gcc gcc cct agt ttg gtg gat H E K т H K S K 0 A aaa gac aac gag gtc cat tac gga ctg gtt aaa gac ggt act aaa tgt gga tat caa agc gtc tgt E H Y L K D G т K G Y Q S C gtg aac cgc aca tgt aca agt ttg aag aat tat gtt tct ggt aga tgt cct aaa gat agt tca tcc S т. K N Y R Ρ K D R т T S G C S tac aaa ccc tgt tct gga cac ggt gta tgt acc aat atc aac act tgt tac tgt gac gaa gga tgg H v C т N Ι N т Y D S G C C atg ggt cat gat tgc agc aga cag agt gac gat gaa tca aca gaa acg act tca gaa gcc gac atc C R S D D E S т E т E н D S Q т S A D ttg gac aat gca gaa tat gtc agg aga gca ttc act gta ggg agt aga tca tca gcc gca gga act E R v Y R A F т G S R S S A aat ete gee ate gea gtt gtg gea aca tea aca gta att gga gtg gte ete gtg ata tge ttt aca N L A I A V V A T S T V I G V V L V I C F T т gca ctc ttt att cac aga aaa agt aaa taa

A. VIII - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur8793_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Ajur8793_seq1

ggg aag tac ttg tac agg gaa cat cgg ctg ccg acg tac gac tta gct gtt gtc att acc aaa ctt Y L Y R Е н R L Ρ т Y D L v v т ĸ Α Ι ĸ т. gat atg tgt cgt agg aga ttt cct ggt gga aga tgc aac cgt ggg aca gca ggt ttc gct tac gtt D M С R R R F Ρ G G R С N R G т Α G F Y v Α gga gga gca tgc gtg gtg aat aaa agg ttg gag aag gta aac agc gtc gcc ata att gaa gac agc v к v N N ĸ L Е v Α Ι G Α С R S Ι E D S gga gga tte agt ggt att att gta get gee cat gaa ate gga cat eta eta gga tge gta cat gat G F S G I I v Α Α H Б I G H L L G С v H D gga tcg cct cct cca agt tat cta gga ggc cct gga gca act cac tgt cct tgg gaa gac gga ttc P P P S Y L G G Р G Α т н С Ρ W E D G F G S atc atg agt gat ctt agg cac aca gaa aga gga ttc aag tgg tct tca tgc agc gtg gaa caa ttc н т F S S v I м S D L R E R G ĸ W С S E Q F aag cat ttc ctc cac gga gaa aca gcc aca tgc ctc tac aat ttt cct cat gag aat gat ctt cta H F L H G E T АТ Y N F P н N к С L Е D L L gtt cga gta cta cca gga act atg ttg acc Ρ т м v R v L G г т

Legenda: As sequências foram obtidas por análise transcriptômica da glândula de veneno de *Avicularia juruensis*. Os aminoácidos pertencentes ao sítio ativo da enzima estão destacados em preto.

A. IX - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur16413_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Ajur16413_seq1

atg tca ctt gca tct ggc tgt ttg agc act ggc acc att cag cat gag ttt tgt cac gca tta ggg GCLS TGTI QHE С М S L A S F H A L G atg gtt cac gaa caa agc aga cct gac aga gat gac cac gtc ata atc ctt tgg gat aac ata tct М v H Е Q S R Ρ D R D D н v I Ι L W D N Ι S aag gac tgg caa agc cag tat cgg aag gaa tct tca acc acg tac gga att cag gga gac tat gat D W 0 S 0 Y R Κ Ε S S т т Y G Ι 0 G D Y D tgt gaa tet gtg atg eat tae eea aat eag geg eet aat aet aga aaa eeg gee tte gag tgg gtt Ε S v М н Y Ρ N Q Α Р N т R к Ρ F Ε W v С Α aat aat tee tge aag aac eea tet aga gte gga caa ege aac gga caa act gaa att gae aag ggg N s С к N Ρ S R v Q R N G т Κ N G Q Е Ι D G aaa atg aag aag ttg tac agt tgt aat taa Κ Μ Κ к L Y s N С

A. X - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur64801_seq2 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Ajur64801_seq2

ctg atc aat gaa gag atg ata gtc agc aaa cag cat ttc tta ttt ttc ttc tta aca ttg tgt act v М Е Ι S к н F т N E 0 L F F F L L C gtc gaa agt aca caa aga ata aat gag tac att aag aac tat gaa aca tta aat tac gac acc aaa т N E Y Ι ĸ N Y E т E S Q R Ι L N Y D т ĸ aaa gtc cat gac agt cac ata cgt gcc aaa cgc tca gtt gcc tca gat tca ttc gtc cat ttg cag н D S H I R A K R S v Α S D S F H т. ttt aat get caa aac agg aac tte aat ata egt tta aag ega gae ace tea gtt ttt tet ega aaa v F N A 0 N R N F N Ι R L K R D т S F S R к cta gta gtt gat acc ctt gat ggt gcg ata aag gat ttt gat aca tct cat gtt tat gag ggt cat G v v D т L D G A Ι K D F D T S н v Y E н L gta gca ggt gaa cct ggt act act gtt tat gga tct att cga aat ggc gta ttt gaa gga aaa ata A E P G т т v Y G S Ι R N G v F E ĸ Ι G G cat acc aaa aac caa acc tac tat ctc gag cgt gcc cat aaa tat gga ata cga gac cag cca tat H т ĸ N Q т Y Y L E R A H K Y G I R D 0 P Y cat tct atc att tac act gat gat gat gtc cat gat cct tat gct gaa aaa aga gac agt cac ttt H S I I Y т D D D v H D P Y A E K R D S H F ggt ggt tgt gct gct aca ggg aaa gtc ctg aag tgg atg gaa gac atc agc ctt tca gca tca cca v С т ĸ K W M E D I S S Ρ G G A A G L L A S gaa aac aaa gaa cgt cct ggt ttt ttc tca caa gat aaa cat caa agt aat aga gta cgc cga tca N v ĸ P F S D K H N S E R G F 0 0 S R R R ece aat age cae aac att tat tet aga gaa get cag caa cat tet tea tat gte gea aga gaa gta Y E Y v N H N I S R 0 0 H S S A R E P S A gag aag cgt gcc tgc tca ctg tac att cag act gac aca ttt ttg tgg aac cac ata aag aac tat S L Y т D т F L W N H I E K R С I 0 K N Y Α gaa ata aca gac aca aat gtt cgt gaa gaa att aca tct cta att tca cag cat att aaa gct gtg EI т DTN v R E E I т S L I S н I K 0 A aat cac ata tat gaa aat acg aat ttt gat ggt ttc cgt gga ata aag ttt gtt gtt cag agg ata Y Е N т N F D F R I ĸ F v I G G 0 R Ι aag gtg aat gac acg aga gct tgc gga cca aat ttt agg aaa ggg aat ccc ttt tgt tca ccc aat v N D т R A C G P N F R K G N P F С S P N att gat gtg tct aat ttc ctc aat ttg aat tct cag ttt aat cat gat gac ttt tgc cta gca tac v F С I D S N F L N L N S 0 N н D D F L A Y att ttt aca tac aga gac ttc tca ggt ggg aca ctt gga ctt gca tgg gtg gca tct gct tca ggg т Y R D F S G G т L G L A W v A S A gct tct gga ggt ata tgt gaa aag tac aaa tca tac acc gag aat att gct ggt cga caa gtt cag S C G Ι C Е K Y ĸ S Y т E N Ι A G R acc aag cgt agt ctc aat act ggt gtc ata aca ttt gtg aat tac aac agc cgt gta cct cct aag F т K R S L N т G v I т v N Y N S R v P P K gtt tet gaa etg aet ett gea eat gaa att ggg eat aat ttt gge tea eeg eat gae tat eea aag H H v S E L т L A D I G 🗄 N F G S P D Y P K gag tgt cga ccc gga ggc tca aga gga aat ttt ata atg tat gca agt gcg aca tcc ggt gac agg E С R P G G S R G N F I M Y A S A т S D G R

A. XI - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur66621_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Ajur66621_seq1

ttg acg ttt gaa gac aag aaa cgt ggt cgt gtg aat tta gac atc cgc ttt gaa gaa ggt gat cat D v ਜ Е ĸ ĸ R G R N L D Ι R т Е E р н т. т G gga gac ggc gat cct ttt gat gga cca gga aag aca ctt gct cat gct ttt ttt ccg cag ttc ggt G D G D P F D G P G к т L Α н Α F F Ρ 0 F G ggc gat gcc cat ttt gac gat gaa gaa aaa tgg acc atc agt gaa aga tat gga act aat tta ttc Е ĸ W Е E т Y N D Α н F D D Ι S R G т L F caa gtt gca gct cac gag ttc gga cac tca ctg ggt cta gct cat tcc gac aac caa aag gct tta Е Q K AH F H S L G L A Ħ S D N 0 Α G Α L atg get eea tat tat agg aaa tae gaa eea gee ttt gag eta eat tet gat gae gte aaa gee att Y Е v М Α Ρ Y Y R K Е Ρ Α F L н S D D ĸ Α Ι caa gct ctt tac ggt tct tct gag gac cca gtg aca gaa gaa agc gaa gaa gat gca tct ggt cca Е Y S S Е D Ρ v т Е E S Е D S Ρ Q Α г G Α G ccg cct gac att agc gat gcc ccc gat tta tgt cag gat gga tca att gat gcc gtt acg aga acc Ρ Ρ D Ι S D Α Ρ D L С 0 D G S I D Α v т R т cta aat gga agc aca tat gtc ttt aaa ggt gcc ttc tat tgg aga att ctg act gat ggc atc gcc v L N G S т Y F ĸ G Α F Y W RIL т D G I Α agc ggt tat cct aga aga ata aca gac gac tgg gat gga ctt gaa ggc aat tta gat gcc gct ctg YPRRI т D D W D E G N D s G G L L A A L acg tgg tct aat ggc aaa acc tat ttt ttt aag cgt gga aga tac tgg agg ttt aca aac aag gta N к т Y F к R R Y R F т Ν G atg gat gtt ggg tac ccc aag ctg cta agt gtc gga ttt gaa ggc ata cca gac gga cct gac gct D v Y Ρ K L L S v G F \mathbf{E} G I Ρ D G Ρ М G D Α gca ttt gtt tgg agt gga aat ggt aaa act tat ttc ttt aaa ggt gat gaa tac tgg cgc ttc gac Α F v W S G N G ĸ т Y F F K G D E Y W R F D age aac aac gaa eea eet gtg age age aaa tae eet aaa eea ate age age tgg aaa gga ttg eee Ν Ν \mathbf{E} P Ρ v S S ĸ Y Ρ ĸ P I S S W ĸ G L Ρ S aat tat atc gac gct gca ttc caa tgg gaa aat cag cga atg tac ttc ttc aaa gga gac aag tac A F E N R M Y F F D K N Y Ι D 0 W 0 K G Y Α tac agg ttc aac gat ttg gct ttt gag gtt gat tcc ggt gat cct ccg tat cca cgt tcc act tca Y R F N D L A F Е v D S G D Ρ Ρ Y Ρ R S т S gtg tgg tgg ttt gac tgt cgt tct ata tct cat caa acc gtt cca ccg gag agt ttg gaa gac tat v D R S Ι S н Q т Ρ Ρ Е L W W F С S Е D Y aca aat ttt acg ata tct ctg aat tac acg gaa tca gca aat ttt aca gag tcc tga т N F т Ι S L N Y т Ε S Α N F т Е S

A. XII - Sequência nucleotídica do *contig* Ajur76134_seq1 e seus respectivos aminoácidos traduzidos.

Ajur76134_seq1

atg gaa tgg ttg tta ttc att gcc ctc atc gca gtc atc ttt gca aca tca act tct ttt cca gag v м E W т. т. F т Α т. т Α т F Α т S т S ਜ Ρ Б aga aaa gag att gaa gca aag tta ttt ctt caa aag tat ggg tac ttt gaa gat cca aat ggg aac Y Y F R ĸ E I E Α ĸ L F L 0 ĸ G \mathbf{E} D P N G Ν ttg tta gga get get gtt tet gta eea cat gae acg ttt eag gae gee eta aga gaa ttt eaa aga v Ρ н D т F R S D Α L Α Α 0 tat gct ggc ctc aat cag aca ggc aaa cta gat aaa cca act cta gag aaa atg aag gct cct agg N т G K L D ĸ P т L Е ĸ м K Y Α G L Q Α Ρ R tgt gga gta aag gac aaa gtt ggt cca gct aat tca gtc aga aga aag aga tat gct ctg caa ggc v ĸ D ĸ v G P Α N S v R R K R Y т. С G Α 0 G age caa tgg atg gag act tet ate tet tae aaa ate agt aaa tat tee aaa aaa etg get gat cag М т S Y K ĸ ĸ ĸ 0 W Е I s I s Y s г Α D 0 aag aag acg aaa aga gaa att gtt aga gca ctt aat ata tgg agt gaa gtt act ccc ctt gat ttt т ĸ R Е I v L N I W s Е v т Р L D F к к R Α gtg gaa caa aaa aaa aca aaa cac ggt aaa ggc gtt atc gat atc cgc ttt gaa cga gga gaa cat к к н к G v D I F Е v Е Q ĸ т G I R R G E H gge gae gge gat eet tte gat gga eea gat atg ace eta geg eat gee tte ttt eet eaa ttt ggt D D Ρ г D G Ρ D м т т. Ά н Ά F F Ρ 0 G F ggt gat gtc cat ttc gat gat gat gaa gag tgg acc ctt gat gaa caa aaa acc gga aca aat tta v ĸ т н F D D D Е W т L D Е т N D E 0 G L tte caa att get get cae gaa tte gge cat tet ttg ggt tta tet eat teg gat aat gta aaa get F 0 Ι Α Α H Е F G H S L G L S H S D N v K Α tta atg aat cca tat cca ccg tgg aaa tac aga ccg aca ttt aaa ctc cat gca gac gac ata aaa Κ Ρ т м Ν Ρ Y Ρ Ρ W Y R F к L н Α D D gcg gtt caa acc ctt tat gga ccc agg gaa aag aaa cca aac aat atg ata gaa ggt gat aat gac v 0 т L Y G Ρ R Е ĸ K Ρ N N Μ Ι Е G D N D gtc acc tca gtt tca gat gtc agt gat gct cca aat cta tgc caa gac gca tct ata gat act gtg v S v D v Ρ N L D S т S S D Α С 0 Α I D т v acc aga acc caa gac ggg aac act tac ttt ttt aaa ggt gat tat tat tgg aaa gta tta cgt aaa т R т Q D G N т Y F F ĸ G D Y Y W ĸ v L R ĸ ggt ata gcc aaa gga tat cca agg aga ata cta gat gac tgg ggc gga cta cca ggg aac ttg gac к G Y Ρ R R Ι L D D G G L Ρ N gct tet ttt aca aga tet aat gga aaa acg tte ttt tte aaa ggt aca aag tte tgg agg tte ace S F т R S N G Κ т F F F K G т ĸ F W R F т Α aac aag gac atg gac gaa ggt tat ccg aaa ttg cta agt gcg aga ttc aag agc atc cca cca gga Y Κ FK N K D м D E G Ρ L L S Α R S I P P G att gat get gee tte gat tgg ggt gge aat gae aaa att tat ttt gtt aaa ggt eet eag ttt tgg F D Ν D к Y F v к Ρ Α W G Ι G 0 Α G cgc tat gat agt gaa gaa cca cat atc agt ccg gag ttc ccg aaa cct ctt aaa gtt tgg aag gga н Ρ F Ρ Y D S Е E Ρ Ι S Е к Ρ L K v W ĸ ett eee aat ege ate gat gee get ttt eaa tgg gaa gat ggt eae aet tae ttt tte aaa gga gaa Ρ N R I D Α Α F Q W E D G н т Y F F ĸ Е L G aag tat tat aaa tte aat gae age aca ttt aaa gte gat gae ggt gat eet eeg tae eet egt ttg к N т к v D D Ρ Y к Y Y F D S F G D Ρ Ρ R L act tcc gtg tgg tgg ttt ggc tgt tga F S W W G

ANEXO A - Artigo científico submetido para a revista Royal Society Open Science

Royal Society Open Science: For review only

ROYAL SOCIETY OPEN SCIENCE

Metalloproteinases from the mygalomorph spider Avicularia juruensis venom

Journal:	Royal Society Open Science
Manuscript ID	RSOS-160517
Article Type:	Research
Date Submitted by the Author:	14-Jul-2016
Complete List of Authors:	Nascimento, Soraia; Universidade de Sao Paulo, Programa de Pós- Graduação Interunidades em Biotecnologia - Instituto de Ciências Biomédicas; Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada Oliveira, Ursula ; Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada Nishiyama Junior , Milton; Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada Tashima, Alexandre; Universidade Federal de Sao Paulo Escola Paulista de Medicina, Departamento de Bioquímica Junqueira-de-Azevedo , Inácio; Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada; Universidade de Sao Paulo, Programa de Pós- Graduação Interunidades em Biotecnologia - Instituto de Ciências Biomédicas da Silva Junior, Pedro; Butantan Institute, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA); Universidade de Sao Paulo, Programa de Pós- Graduação Interunidades em Biotecnologia - Instituto de Ciências Biomédicas
Subject:	biochemistry < CROSS-DISCIPLINARY SCIENCES, biochemistry < BIOLOGY
Keywords:	ADAM toxins, <i>Avicularia juruensis</i> , enzymes, metalloproteinases, spider venom
Subject Category:	Biochemistry & Biophysics

SCHOLARONE[™] Manuscripts

Metalloproteinases from the mygalomorph spider Avicularia juruensis venom

Soraia M. Nascimento^{1,2,*}, Ursula C. Oliveira¹, Milton Y. Nishiyama Junior¹, Alexandre K. Tashima³, Inácio L. M. Junqueira-de-Azevedo^{1,2} and Pedro I. Silva Junior^{1,2,*}

¹ Laboratory of Applied Toxinology, Butantan Institute, Av. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil

- ² Graduate Interunits Program in Biotechnology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, ICB III, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil
- ³ Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, Rua Botucatu, 862, 04023-901, São Paulo, SP, Brazil

*Correspondence: soraia.nascimento@butantan.gov.br; pedro.junior@butantan.gov.br; Tel.: +55 11 26279731

Abstract: Spiders are one of the most diverse groups of terrestrial animals, distributed all over the world, which inhabit almost every environment. Venom is a key factor that contributed to the evolutionary success of spiders. However, little is known about the key players of venoms - toxic enzymes - in neglected groups of spiders, such as the Avicularia genus. In this work, we analyzed the venom from the spider Avicularia juruensis, an arboreal mygalomorph spider known as the bird eating yellow-banded pinktoe tarantula. Combining gel filtration chromatography, mass spectrometry and transcriptomic analysis yielded the identification of metalloproteinases in A. juruensis venom. These enzymes showed conserved domains typical from ADAMs, MMPs and astacin-like metallopeptidases. The active site of one metalloproteinase with caseinolytic activity is composed by the HMxxHxxGxxH motif, similar to that observed in ADAMs from Limulus polyphemus (Xiphosura, Limulidae) and Polistes canadensis (Hymenoptera, Vespidae). The substitution of a methionine in the site where a glutamate is usually found apparently does not affect this enzyme function. In conclusion, metalloproteinases in the venom of Avicularia juruensis are described for the first time in this work. We suggest these metalloproteinases play an important role in pre-oral digestion and may contribute to their venom toxicity.

Keywords: ADAM toxins; Avicularia juruensis; enzymes; metalloproteinases; spider venom

1. Introduction

Spiders are one of the most diverse groups of terrestrial animals, with the oldest known fossil record dating 300 million years ago, from the Carboniferous period [1]. They are distributed all over the world and inhabit almost every environment, with the exception of Earth poles and oceans [2]. Venom production is a key adaptation that contributed to spider's evolutionary success, since it is used both for predation and self-defense. Thus, spider venoms are the product of millions years of evolution and constituted by a complex mixture of highly diverse toxins [1,3].

Six groups of molecules can be found in spider venoms: low molecular mass compounds, acylpolyamines, linear peptides, cysteine-rich mini-proteins, large proteins and enzymes. Enzymes have a wide variety of activities and perform two significant tasks: destroy the extracellular matrix and the cell membranes, facilitating the entry of other toxins, as well as initiating pre-oral digestion of preys [4].

Avicularia juruensis [5] is an arboreal species endemic from the Amazon rainforest region and that belong to the Theraphosidae family [6]. A. juruensis has broad feeding habits, preying on invertebrates and small vertebrates, including bird chicks. Thus, their venom might be a potential source of enzymes toxic to vertebrates.

However, venoms of Theraphosidae spiders are poorly studied, with only 226 toxin sequences described for approximately 20 species [7]. Therefore, the study of venoms in this family is important to describe their composition and, eventually, identify molecules with biotechnological applications. For instance, our group has previously identified U-theraphotoxin-Ajula, a putative neurotoxin from *A. juruensis* that shows pharmaceutical potential as a candidate antifungal drug and possibly as a template for the development of cardiovascular and neuromodulatory drugs [8].

Here, we combined mass spectrometry and transcriptomic analysis to identify enzymes in the venom of *A. juruensis*. One isolated enzyme showed proteolytic activity on casein, and

bioinformatics analysis revealed conserved domains and similarities with metalloproteinases from other arthropods species. Another five metalloproteinases were identified using only predicted proteins from the transcriptome. These enzymes have similarities with ADAMs, MMPs and astacinlike metallopeptidases. Our results suggest, for the first time, the presence of metalloproteinases in the venom of the arboreal spider A. juruensis.

2. Materials and Methods

28

54

(a) Spiders and venom milking

Spiders were collected in the cities of Porto Velho and Monte Negro, Rondônia, Brazil, under license Permanent Zoological Material no.11024-3-IBAMA and Special Authorization for Access to Genetic Patrimony no.010345/2014-0. They were kept in the biotherium of the Laboratory of Applied Toxinology at Butantan Institute (São Paulo, Brazil) and were fed with cockroaches and meat every 15 days, with water at ease.

Venom was extracted by electrical stimulation as described by Rocha-e-Silva et al. [27]. The shocks (15-30 V, 10 Hz for 2 ms) were delivered with an electrical stimulator. After milking, the venom yield was centrifuged and the supernatant was lyophilized and stored at -80 °C.

(b) Enzymes isolation

Avicularia juruensis crude venom (10 mg) was dissolved in 700 µL of ammonium acetate buffer (50 mM) and centrifuged at 16,000 xG for 5 minutes to remove the insoluble materials. The clear supernatant was fractionated by a Superose® 12 HR 10/300 gel filtration column (11 µm; 10 mm x 300 mm) (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), with an isocratic elution of the same buffer cited before. Fractions of 1 mL/tube were automatically collected at a flow rate of 1 mL/minute, during 36 minutes, using an ÄKTA-Purifier chromatographic system (GE Healthcare). The elution profile was determined by monitoring the absorbance at 280 nm. The obtained fractions were lyophilized and stored at -80 °C.

(c) Proteolytic activity assays

The fractions isolated by gel filtration chromatography were dissolved in 200 µL of ultrapure water, 20 µL aliquots were collected and applied into microcentrifuge tubes. 5 µL of 2% (m/v) casein solution and 8 µL of buffer solution (100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8.8) were added. The samples were incubated at 37 °C for 3 hours. 25 µg of Bothrops jararaca venom was used as positive control, whereas the casein solution, incubated just with buffer solution, was employed as negative control. After, the degradation profile of casein was evaluated by electrophoresis, using the method described by Laemmli [28]. Samples were applied into 12% polyacrylamide gels under reduced conditions. The silver staining was made using the method described by Bassam et al. [29].

(d) Measure of sample concentration

The concentration of fractions with caseinolytic activity was measured in the equipment NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, EUA), using a wavelength 280 nm.

(e) Protein digestion in solution (reduction, alkylation and trypsinization)

Fractions that showed caseinolytic activity were reduced, alkylated and trypsinized using the method described by Stone et al. [30]. Approximately 30 µg of the samples was resuspended in 20 µL of a solution of 8 M urea and 0.4 M ammonium bicarbonate, to which 5 µL of 45 mM dithiothreitol was added and incubated at 50 °C for 15 minutes. After cooling at room temperature, 5 µL of 100 mM iodoacetamide was added and incubated at room temperature for 15 minutes, protected from light. 130 µL of ultrapure water and trypsin (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) was added in a 1:25 (enzyme/protein) ratio. Samples were incubated at 37 °C for 24 hours and digestion was stopped by adding trifluoroacetic acid (TFA) 0.1%. After protein digestion, the sample was desalinated by ZipTip® Pipette Tips (Merck Millipore) with a unique elution step using acetonitrile (ACN) 80%. Purified sample was concentrated in a vacuum centrifuge and then analyzed by tandem mass spectrometry.

https://mc.manuscriptcentral.com/rsos

Page 2 of 18

 113 (f) Mass spectrometry

Trypsinized samples were resuspended in formic acid 0.1% and analyzed by LC-MS/MS in a LTO-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) linked to a liquid nano-chromatography system Easy-nLCII (Thermo Scientific). For the chromatographic step, 5 μ L of each sample were automatically applied in a C18 pre-column (100 µm I.D. x 50 mm; Jupiter 10 µm, Phenomenex Inc., Torrance, California, USA) coupled to a C18 analytical column (75 µm I.D. x 100 mm; ACQUA 5 µm, Phenomenex Inc.). Samples were eluted using gradients of solution B (0.1% formic acid in ACN) as follows: 5%-95% B over 15 min, 95% B for 5 min, 95%-5% B for 1 min and 5% B for 19 more min at a flow rate of 200 nL/min. The eluate was electro-sprayed at 2 kV and 200 °C in positive ion mode. Mass spectra were acquired by FTMS analyzer, the mass scan interval considered for full scan (MS1) was 200-2000 m/z (60,000 resolution at 400 m/z) and the instrument was operated on Data Dependent Acquisition, where the five most intense ions per scan were selected for fragmentation by Collision Induced Dissociation. The minimum threshold for selecting an ion for a fragmentation event (MS2) was set to 5000 cps. The dynamic exclusion time used was 15 s repeating in intervals of 30 s.

129 (g) cDNA library construction

Venom glands of 5 adult female spiders were removed 72 h after the venom milking. They were homogenized in Polytron® Tissue Homogenizer (Kinematica, Luzern, Switzerland) and the total RNA was extracted using TRIzol® reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.). The RNA integrity was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EUA) with the RNA 6000 Nano assay. mRNA was extracted with an oligo (dT) using Dynabeads mRNA DIRECT kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). mRNA was quantified by Quant-iT RiboGreen® RNA reagent and Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) and the integrity of mRNA was evaluated in a 2100 Bioanalyzer, picochip series (Agilent Technologies). cDNA library were prepared following the standard TruSeq RNA Sample Prep Kit protocol (Illumina, San Diego, California, EUA). The cDNA libraries were sequenced on the Illumina HiSeq 1500 System, into a rapid paired end flowcell in a 300 cycles of 2*150 bp paired end technique, according to the standard manufacturer's protocol (Illumina). The reads were filtered and trimmed with fastq-mcf version 1.04.662 [31]. First, we applied a quality filter by trimming reads using mean Phred quality scores below 25, reads covered for more than 90% of homopolymer or low complexity, reads with at least 5 N's or 5 poly-A/T's and adapters in the ends, and removing reads with minimum length of 40 after trimming, and assembled by Trinity (version r20131110) [32], with parameters: --CuffFly and -min_contig_length=300. Reads were combined, and the minimum sequence length in the assembly was set to 300 bp.

(h) Bioinformatics

The MS and MS/MS spectras were analyzed in PEAKS 7.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Ontario, Canada) using the function PEAKS DB (Database Searching) against a database of proteins predicted from the transcriptome of the venom gland of Avicularia juruensis. To the identification of potential coding regions within reconstructed transcripts, and construction of the predicted proteins database, was used the TransDecoder software (version r20140704). Analysis was performed with error tolerances of 10 ppm and 0.6 Da for precursor and fragment ions, respectively, with Trypsin enzyme specificity. Cysteine carbamidomethylation was considered as a fixed modification, whereas N-terminal acetylation and methionine oxidation were considered as variable modifications.

To identify the class of enzymes, the contigs that showed similarity with the fragments identified in mass spectrometry analysis were submitted to searches using InterPro [9] and BLASTP [10] with default parameters.

In order to find others metalloproteinases, based on the predicted proteins from the
 transcriptome, were made searches using the patterns: "HE[A-Za-z]{2}H[A-Za-z]{2}G[A-Za z]{2}H" and "HM[A-Za-z]{2}H[A-Za-z]{2}H[A-Za-z]{2}H". The metalloproteinases identified
 were also submitted to searches using InterPro [9] and BLASTP [10] with default parameters.

The complete sequence of different types of metalloproteinases were obtained on NCBI
 database [33] and employed to identify similar sequences on enzymes from the *A. juruensis* venom.
 The alignments were made in SeaView [34] and the coloring was made using Boxshade



Page 4 of 18

Ajur72031_seq 10 Fraction 7

1	MHCNSLLTIR	MKIQKMHFSL	FSHLPVIFTL	LFIICLGNSK	KTDLRQLFQN	YPRNQELAAN	LGTSYEVVYP	VQLKVNRFRG
81	LTTRKISADN	AVEHVSNTSF	LIEAHQFKIY	IDLELNINLL	PPTLTQFLIS	TTSRQLIDED	IENCYYHATV	RNRSDSFGAF
161	RTCSGLSGVL	YLEDNVFSIH	PLDGDHTSKQ	PHLLFHHYQT	NEDEWKCDVD	DEDEKFHCLQ	ERLREIADYG	SDIPLRKKYI
241	ELALIMDQAF	FEMHNTPPKE	VIGNAIQMIN	CADLHYRSLN	TSISLVHIEL	WTEDVIHVEH	NIQQNLQNLQ	EYLAQQYDQR
321	SMDAIHVLSG	ATFNDSVIGT	AESNSICTVK	AVGITKVGNI	HQTHVTSHVI	THMLGHNLGM	THDHDCCNCP	YKSGCHMFNS
401	IQSAQPFHFS	SCSTEDYFRT	LRKGYGVCLF	NMPMLRESIC	GNGILETGEE	CDCGTSEVCK	NSDSCCDHIT	CKFVKNAQCS
481	SGPCCDKCKP	RSPAFVCRPA	KGECDIPEYC	DGKNGQCPLD	LFMKNGILCA	GGNGYCYQGN	CPVINDQCKQ	LWGSDSETAD
561	PVCYQKLNVQ	GTPNGNCGLD	RKGGYIKCSE	ENTPCGSLQC	KHGEKVPISS	RSTVQFKINK	VHQEGKTHEC	KAAPSLVDKD
641	NEVHYGLVKD	GTKCGYQSVC	VNRTCTSLKN	YVSGRCPKDS	SYKPCSGHG	VCTNINTCYC	DEGWMGHDCS	RQSDDESTET
			_		-			

721 TSEADILDNA EYVRRAFTVG SRSSAAGTNL AIAVVATSTV IGVVLVICFT ALFIHRKSK



	ion o							
1	MHCNSLLTIR	MKIQKMHFSL	FSHLPVIFTL	LFIICLGNSK	KTDLRQLFQN	YPRNQELAAN	LGTSYEVVYP	VQLKVNRFRO
81	LTTRKISADN	AVEHVSNTSF	LIEAHQFKIY	IDLELNINLL	PPTLTQFLIS	TTSRQLIDED	IENCYYHATV	RNRSDSFGA
161	RTCSGLSGVL	YLEDNVFSIH	PLDGDHTSKQ	PHLLFHHYQT	NEDEWKCDVD	DEDEKFHCLQ	ERLREIADYG	SDIPLRKKY
241	ELALIMDQAF	FEMHNTPPKE	VIGNAIQMIN	CADLHYRSLN	TSISLVHIEL	WTEDVIHVEH	NIQQNLQNLQ	EYLAQQYDQ
321	SMDAIHVLSG	ATFNDSVIGT	AESNSICTVK	AVGITKVGNI	HQTHVTSHVI	THMLGHNLGM	THDHDCCNCP	YKSGCHMFNS
401	IQSAQPFHFS	SCSTEDYFRT	LRKGYGVCLF	NMPMLRESIC	GNGILETGEE	CDCGTSEVCK	NSDSCCDHIT	CKFVKNAQCS
481	SGPCCDKCKP	RSPAFVCRPA	KGECDIPEYC	DGKNGQCPLD	LFMKNGILCA	GGNGYCYQGN	CPVINDQCKQ	LWGSDSETAI
561	PVCYQKLNVQ	GTPNGNCGLD	RKGGYIKCSE	ENTPCGSLQC	KHGEKVPISS	RSTVQFKINK	VHQEGKTHEC	KAAPSLVDKI
641	NEVHYGLVKD	GTKCGYQSVC	VNRTCTSLKN	YVSGRCPKDS	SSYKPCSGHG	VCTNINTCYC	DEGWMGHDCS	RQSDDESTE
721	TSEADILDNA	EYVRRAFTVG	SRSSAAGTNL	AIAVVATSTV	IGVVLVICFT	ALFIHRKSK		
		477 475	N D O - W					
		Intensity (%) PVI	NDAIDY	У2 У2-NH3 pre[3+]				
		Intensity (%) PVI	p2-NH3]	V2 V2-NH3 V2-H20 b3	¥3			
		100 50-	00 200	Y2-NH3 Y2-NH3 Y2-H20 b3 300	400 Y3	500 600	m/z	
Fract	ion 9	109 50	200 200	Y2-NH3 Y2-NH3 Y2-H2O B3 300	400	500 600		
Fract	ion 9 MHCNSLLTIR	MKIQKMHFSL	PSHLPVIFTL	Y2-NH3 Y2-NH3 Y2-H2O b3 300	KTDLRQLFQN	500 600 YPRNQELAAN	LGTSYEVVYP	VQLKVNRFRO
Fract 1 81 161	ion 9 MHCNSLLTIR LTTRKISADN FTCSGLSGVL	MKIQKMHFSL AVEHVSNTSF YLEDNVFSIH	FSHLPVIFTL LIEAHQFKIY PLDGDHTSKQ	y2-NH3 y2-H20	400 KTDLRQLFQN PPTLTQFLIS NEDEWKCDVD	500 600 YPRNQELAAN TTSRQLIDED DEDEKFHCLQ	mz LGTSYEVVYP IENCYYHATV ERLREIADYG	VQLKVNRFRG RNRSDSFGAB SDIPLRKKYJ
Fract 1 81 161	ion 9 MHCNSLLTIR LTTRKISADN RTCSGLSGVL	MKIQKMHFSL AVEHVSNTSF YLEDNVFSIH	PSHLPVIFTL LIEAHQFKIY PLOCDHT	y2-H53 Y2-H30 S30 LFIICLGNSK IDLELNINLL PHLLFHHYQT	400 KTDLRQLFQN PPTLTQFLIS NEDEWKCDVD	500 600 YPRNQELAAN TTSRQLIDED DEDEKFHCLQ	miz LGTSYEVVYP IENCYYHATV ERLREIADYG	VQLKVNRFRG RNRSDSFGAB SDIPLRKKY1
Fract 1 81 161 241	ion 9 MHCNSLLTIR LTTRKISADN RTCSGLSGVL	MKIQKMHFSL AVEHVSNTSF YLEDNVFSIH FEMHNTPPKE	ESHLPVIFTL LIEAHQFKIY PLGGHTSKQ VIGNAIQMIN	y2-NH3 Y2-NH3 Y2-H400 300 LFIICLGNSK IDLELNINLL PHLLFHHYQT CADLHYRSLN	400 KTDLRQLFQN PPTLTQFLIS NEDEWKCDVD TSISLVHIEL	500 600 YPRNQELAAN TTSRQLIDED DEDEKFHCLQ WTEDVIHVEH	nž LGTSYEVVYP IENCYYHATV ERLREIADYG NIQQNLQNLQ	VQLKVNRFR(RNRSDSFGAH SDIPLRKKY1 EYLAQQYDQF
Fract 1 81 161 241 321	ion 9 MHCNSLLTIR LTTKRISADN PTCSGLSCVL	MKIQKMHFSL AVEHVSNTSF YLEDNVFSIH FEMHNTPPKE ATFNDSVIGT	ESHLPVIFTL LIEAHQFKIY PLOCDHTSXQ VIGNAIQMIN AESNSICTVK	y2 y2+H00 y2+H00 x0 LFIICLGNSK IDLELNINLL PHLLFHHYQT CADLHYRSLN AVGITKVGNI	Y3 400 KTDLRQLFQN PPTLTQFLIS NEDEWKCDVD TSISLVHIEL HQTHVTSHVI	500 600 YPRNQELAAN TTSRQLIDED DEDEKFHCLQ WTEDVIHVEH THMLGHNLGM	MZ LGTSYEVVYP IENCYYHATV ERLREIADYG NIQQNLQNLQ THDHDCCNCP	VQLKVNRFRG RNRSDSFGAH SDIPLRKKYJ EYLAQQYDQH YKSGCHMFNS
Fract 1 161 241 321 401	ion 9 MHCNSLLTIR LTTRKISADN RTCSGLSGVI, SELALIMQAF SMDAIHVLSG IQSAQPFHFS	MKIQKMHFSL AVEHVSNTSF YLEDNVFSIH FEMHNTPPKE ATFNDSVIGT SCSTEDYFRT	PSHLPVIFTL LIEAHQFKIY PLOGDHTSKQ VIGNAIQMIN AESNSICTVK LRKGYGVCLF	y2 y2 y2 y2 y2 y2 y2 y2 y2 y2 y2 y2 y2 y	xy do ktdlrQlFQN PPTLTQFLIS NEDEWKCDVD TSISLVHIEL HQTHVTSHVI GNGILETGEE	500 600 YPRNQELAAN TTSRQLIDED DEDEKFHCLQ WTEDVIHVEH THMLGHNLGM CDCGTSEVCK	mt LGTSYEVVYP IENCYYHATV ERLREIADYG NIQQNLQNLQ THDHDCCNCP NSDSCCDHIT	VQLKVNRFRG RNRSDSFGAH SDIPLRKKYJ EYLAQQYDQF YKSGCHMFNS CKFVKNAQCS
Fract 1 81 161 241 321 401 481	IN 9 MHCNSLLTIR LTTRKISADN PTCSGLSGVI, SMDAILWLSG SMDAILWLSG IQSAQPFHFS SGPCCDKCKP	MKIQKMHFSL MKIQKMHFSL AVEHVSNTSF YLEDNVFSIH FEMHNTPPKE ATFNDSVIGT SCSTEDYFRT RSPAFVCRPA	FSHLPVIFTL LIEAHQFKIY PLOCOHTSXQ VIGNAIQMIN AESNSICTVK LRKGYGVCLF KGECDIPEYC	V2-W5) V2-W5) DFICLGNSK IDLELNINLL PHLLFHHYQT CADLHYRSLN AVGITKVGNI NMPMLRESIC DGKNGQCPLD	400 KTDLRQLFQN PPTLTQFLIS NEDEWKCDVD TSISLVHIEL HQTHVTSNVI GNGILETGEE LFMKNGILCA	500 600 YPRNQELAAN TTSRQLIDED DEDEKFHCLQ WTEDVIHVEH THMIGHNIGM CDCGTSEVCK GGNGYCYQGN	nt LGTSYEVVYP IENCYYHATV ERLREIADYG NIQQIAQNLQ THDHDCCNCP NSDSCCHIT CPVINDQCKQ	VQLKVNRFRG RNRSDSFGAH SDIPLRKKYJ EYLAQQYDQF YKSGCHMFN3 CKFVKNAQC3 LWGSDSETAI
Fract 1 81 161 241 321 401 481 561	ION 9 MHCNSLLTIR LTTRKISADN PTCSGLSGVL MC ELALIMDQAF SMDAIHVLSG IQSAQPFHFS SGPCCDKCKP PVCYQKLNVQ	MKIQKMHFSL AVEHVSNTSF YLEDNVFSTH FEMHNTPPKE ATFNDSVIGT RSPAFVCRPA GTPNGNCGLD	FSHLPVIFTL LIEAHQFKIY PLOGHTSKQ VIGNAIQMIN AESNSICTVK KGGCDIPEYC RKGGYIKCSE	yz-ws. press yz-ws. zoo LFIICLGNSK IDLELNINLL PHLLFHHYQT CADLHYRSLM AVGITKVGNI NMPMLRESIC DGKNGQCPLD ENTPCGSLQC	KTDLRQLFQN PPTLTQFLIS NEDEWKCDVD TSISLVHIEL HQTHVTSHVI LFMKNGILCA KHGEKVPISS	500 600 YPRNQELAAN TTSRQLIDED DEDEKFHCLQ WTEDVHVEH THMLGHNLGM CDCGTSEVCK GGNGYCYQGN RSTVQFKINK	miz LGTSYEVVYP IENCYYHATV ERLREIADYG THDHDCCNCP NSDSCCDHIT CPVINDQCKQ VHQEKTHEC	VQLKVNRFRO RNRSDSFGAI SDIPLRKKYJ YKSGCHMFN3 CKFVKNAQCI LWGSDSETAI KAAPSLVDKI
Fract 1 81 161 241 321 401 481 561 641	ion 9 MHCNSLLTIR LTTRKISADN PTCSGLSGVI SE ELALIMDQAF SMDAIHVLSG IQSAQPFHSS SGPCCDKCKP PVCYQKLNVQ NEVHYGLVKD	MKIQKMHFSL AVEHVSNTSF YLEDNVFSIH FEMHNTPPKE ATFNDSVIGT SCSTEDYFRT GTPNGNCGLD GTKCGYQSVC	FSHLPVIFTL LIEAHQFKIY PLOCHTSKQ VIGNAIQMIN AESNSICTVK LRKGYGVCLF RKGGYIKCSE VNRTCTSLKN	yz-ths yz-ths zoo LFIICLGNSK IDLELNINLL PHLLFHHYQT CADLHYRSLN AVGITKVGNI NMFMLRESIC DGKNQCPLD ENTPCGSLQC YVSGRCPKDS	Y3 400 KTDLRQLFQN PPTLTQFLIS NEDEWKCDVD TSISLVHIEL HQTHVTSHVI GNGILETGEE LFMKNGILCA KHGEKVPISS SSYKPCSGHG	200 600 YPRNQELAAN TTSRQLIDED DEDEKFHCLQ WTEDVIHVEH THMLGHNLGM CDCCTSEVCK GGNGYCYQGN RSTVQFKINK VCTNINTCYC	miz LGTSYEVVYP IENCYYHATV ERLREIADYG NIQQNLQNLQ NHDDCCNCP NSDSCCDHIT CPVINDQCRQ VHQEGKTHEC DEGWMGHDCS	VQLKVNRFRG RNRSDSFGAI SDIPLRKKY EYLAQQYDQI YKSGCHMFN: CKFVKNAQCI LWGSDSETAI KAAPSLVDKI RQSDDESTE

Acetylation (N-term) (+42.01) Carbamidomethylation (+57.02

Figure 3. Complete amino acid sequence of contig Ajur72031_seq10, obtained by transcriptomic analysis from A. *juruensis* venom glands. Tryptic peptides identified by mass spectrometry in the fractions 7, 8 and 9 are highlighted by gray shadows. Their mass spectra are indicated into the boxes. The post-translational modifications (N-terminal acetylation and cysteine carbamidomethylation) are also indicated with colored boxes. Figures were generated in Peaks 7.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Ontario, Canada).

(c) Bioinformatics analysis

203 204

211

Conserved domains and similarities with others molecules were identified by InterPro [9] and BLASTP [10]. The contig Ajur72031_seq10 has the conserved domains Pep_M12B_propep, ZnMc_adamalysin_II_like/Reprolysin, Disintegrin and ACR/ADAM_CR (Figure 4).



Page 6 of 18

1		
2		
3		Ajur72031_seq10 152 %rsdsy <mark>e/Arrosco.scv/vy</mark> rdrungstiffldg-drysko <mark>rfilmig/</mark> htQ-tran-terrodvddedbyrfClQerlreindygsddrerryter
4		gi j26630664 145 WIREANABARCING SCYLIN ON THING SCHEMENTING - "FOR DIRKTS GONETTO, TASS"BRITSK, KRO TO, MATHE gi j26637610 153 DIREANABARCING SCHEMENTING SCHEMENTING IN HER BUT TO THE SCHEMENT SCHEMENT SCHEMENT SCHEMENTING
5		Gi 194573061 177 DIECNOTASHCOR SCYLLAGISTYLLING COLORIDU HIGARODOROG NEGREM ROK LINGERATED INSDU CATAVIDA TI 192130019
6		gi/297593890 114 JOADSTISISACCONCENTING REPAIRS
7		
2		Ajur72031_seq10 243 Mir DOTEDHENEPERZHIGH CHITCHONHTSINGES UN-HEATED TEVHILENNOONGOLO TAQOYD gi j25630664 235 Mir DOTEDHE NS
0		gi 1926537610 249 AVVLORVSLSSCLLFDSKNC VTSUTSON OTTION (1110) TO
9		g1 122130019 8 FAREVO FCHDFETVI NODF-BVD R JE-ON LADDGPLFTERNAR DOOL PNG-DIVIE SPO OTEQIIREA RIDE NICI FRRR
10		g1[297593890] 206 V.MAGTIMBRYDRNSTALKTRIYBMUTLNGALIVFSIHAATH-HEIGSKKDQIKGQSAADVHHLG6_RREMUL
11		Active site
12		Ajur 2031 med 10 319
13		g1 926637610 335
14		gi 1945/3001 352 - Kanajina ang sa kanajina ang
15		gi 297593890 28371KK NAQMMCING_KC71 Br LV86 G P\$38] G 297593890 -CKN7P <mark>B/ B 60001/63</mark> 0 D -66@ G97 K-8 <mark>91K</mark> 8AVA
16		มาการวิติมี 86/10 402
17		
18		
19		gi122130019 178 WEDKLMENNTENGEDODINLIGAT-AFSKOTRAFFINGEDERENKSILDERKSTTUTVKVKLKEPEVNETFOGURFYNU gi129759380 366
20		
21		
22		
23		gi 1945/3061 528 HARARGUNESTNAH) 1931HUM CONSULTION CONSULTING SPEED THE CHILANNLOCKO, UMISSIAS, KOHRONINSKA MEHRAND, SCH 10 941122130013
24		GI 1297593890 454 GIRBINGTEGGTSSIGH VERVORDGE VERVORDGE VERVORD GEGI TINGGIN TRUGUELA MARKET VERVORDE AGE-INITAL
25		Atur72031 eed10 588 โดยสีมีการสีสสีสีสีนได้อนี้หลังเสียงราบอิหาหลังเสียงหลังสีนักบอยชายะโสสีนตัวสีสารได้เป็นอิหาส์สีนตัวโด-หลีนอรรรหย
26		
27		
27		gi 122130019 gi 129793890 552 SARODE CONPERSON - CHILDRON -
20		
29		Ajur72031 seq10 686 CSCHEVCYN NYCYODECIMCHOOSROSDDESTETTSEADIL NAEYVRRAFNYCSRSSAAGT-NLAWWATSTVIGW VICTA 100%
30		gi 1926630664 691 83616 CHINARCOORGELSMSGOZLDAGETKOVGKIKU AAKTIKTVSPSAANTR ASVKKNDSLSASSAV CHISVOCOVENSALIMATVI gi 1926637610 706 SSGNEVCINATGECARGINSPSGSAVKYETVTPPVDTROTKOVSKNSSSG-HUVEKRDSLSASSAVTVISVOCOVENTHALITVIST gi 1926637610 706 SSGNEVCINATGECARGINSPSGSAVKYETVTPPVDTROTKOVSKNSSSG-HUVEKRDSLSASSAVTVISVOCOVENTHALITVIST
31		gi 954573061 726 CSCHEVENTRESENDERSCHESSTOODIPTLEPATIPATEDES VGSSTERNEKKERPHENY-HESNYVFMCHLESVVCOVENYALLALCYRES 37.304
32	255	g 1122130019 19.318 g 1297393890 29.96%
33	256	Figure 5. Alignment of amino acid sequences of contig Ajur72031 seal0 with ADAMs proteins from Limulus
34	257	polyphemus and Polistes canadensis, a SVMP from the venom of Echis coloratus and an Astacin-like metalloproteinase
35	258	from the venom of Loxosceles intermedia. Variations in gray scale indicate levels of percent identity of the residues in
36	259	each column with consensus sequence. The identity percentages, compared to first sequence, are indicated in the end of
37	260	amino acid sequences. The symbol (-) represents gaps to improve the alignment. The active sites are indicated by a black
38	261	line. gi/926630664 - disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 11-like (Limulus polyphemus),
39	262	g 92063/610 - disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9-like (<i>Limilus polyphemus</i>), g 954573061 -
40	263	usiniegrin and metalloproteinase domain-containing protein 11 isoform X12 (<i>Polistes canadensis</i>), gi122130019 - Lorosceles astacin-like protease 1 and gi207503800 - metalloproteinase (<i>Echis calaratus</i>)
-0	204	Lonosceles asiacin-like processe 1 and gif277393090 - inclanoproteinase (Echis coloranis).

46

264

Page 8 of 18

Ajur8793_seq 1 1 Kill vitrali atta Nipelanie-75 IVAAMÉI GÁLLŐG 105 Ajur16413_seq 1 Ajur64801_seq 2 Ajur66621_seq 1 AMMM A ZnMc superfamily 195 211 EGNL DÁRL TU SNOKT YFFI HX cu Ajur76134_seq 1 PG_binding_1 PG_binding_1 superfamily 10 ZnMc superfamily 360 LODING CL POINL DAST TR 405 . 420 . 465 VSDAPNLCQDAS10 HK superfamily 266 267 268 269 270 271 272 273

Figure 6. Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated.

1		
2		
3		Ajura / 93 seq1 6
4		A JUE 6662_ med 2 3 FARLER VILLAN-EXAMPLE CONFERENCE FOR UNDER VILLANDE V
5		
6		GI 954573051 326 AUQUITION CANONE CANONESE CONTRACTOR C
7		gi 227593890 257 KDQIKVQSAA
8		Active site
9		Ajur8793_seq1 50VN-KRLEKVNS <mark>VAL</mark> IEDSGGFSGIVAAHB (BLUCCVHDGSPPSYLGGPGATHOFWEDGFIXSDLRHTERGIA BSGSVEQ K Ajur16413_seq1 46
10		Ajuré6401_seq2_383_ENLAGRQVQTRRSLNTGVGTFVNTNSRVPFX_SELE_1015_G077_S57_TYPEKCPPGSRGNFU*ASATSGOR Ajuré6621_seq1_43_pcgGO_ARFDDERNTTSSFTVG-TVRTVQALED_GSMGDASSONGRAL
11		⅄ⅉ⅃ℷℾⅉℇ⅃℁⅃໊ℴ℮գ⅃ஂℤℨℰℙΩℙ℮ⅆ℮ℙℍℙ⅁℮─ⅅℇℇℍℼⅉ⅁ℇΩKℸ℈℮ℸℾℍℽΩℷ⅄ℿℙⅇℿⅆℭ℧℩℁⅁⅏ℎKℷ⅃ ℊℹ⅃℁ℴℰ℈ℷℨℰ℄⅃℁⅃ℴ ՠֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈֈ
12		gi i 226637610 365EF-A
13		gi122130019 131
14		
15		Ajur8793 seql 135 LHGET T
10		A_JUE66651aeq2 A_JUE66621aeq2 A_JUE66621_aeq2 AT 6 SDDVK_3AM30SSER_4TEE
17		n jus 2633 564 415 FRANK TELEVIEL TE
10		
19		G1(297593890 385 ENSDOSK
20		Ajur8793 seq1
21		Ajur16413_eeq1
22		Ajur66621_seq1 172 LIDGIASGYPRN T DHDCLEONLDAA TWSMERTYFFKRGRYWRFINKVADVGYPKLLSVGFEGIPDGPDA VY SONGKTYFFKGDETAR DSN Ajur76134_seq1 338 LIRKGIAKGYPRN L DHOCLPONLDASFIRSMERTFFKGTKFWRFINKDMDEGYPKLLSARFKSIPFGIDA D, GONDKIYFVKGPORT DSE
23		gi i 226530664 487 PRTAELCRIERADECO P 2005SECEPPO PRRE
24		gi 195673061 530 margivcrestnicourpicoprocopourrecorrection and a second s
25		g1 297593890 456 FRPARTECRG7SSDCD_P_TCTEQS_ECPLD_FORME
20		Ajur8793_seq1
28		Ajur64801_soq2 Ajur6621_soq2 Ajur6621_soq1_269_NEPPVSSKYPKPISSWKELPNYIDAAFOWENORMYFFKGDKYYRFNDLAFEVDSGDPPGPSTSVWWFDGRSGSHOTVPPESLEDYTNFTISLNYTES
29		Ajur 76134 seq1 435 - EPHISPEPFRFLKVWRCLPNRIDAAFQWEDdETYFFRGEKYYKRWSTFFKVD-OPF, PLISVWWFG+ gi 926630664 555 TSELECFQQFWTGGIMGENC
30		gi 926637610 580 TAQDECFK-FNMQGIISCHCGSDCKGC_ISCSP-DMMRGSP_QCQRGAASPLISGMAANYTRTIASIEG gi 954573061 598 ASDKQCFEQFNSKGSINCHC
31	274	gi 122130019 gi 297593890 524 VAPDACFE-YNLQGTYKHHCGS_NGRUICAR-ODINGRUPCVEPSTGN
32	275	Figure 7. Alignment of amino acid sequences of contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2,
33	276	Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 with ADAMs proteins from the horseshoe crab Limulus polyphemus, the wasp
34	277	Polistes canadensis, a SVMP from the snake <i>Echis coloratus</i> and an Astacin-like metalloproteinase from the venom of the begin and the snake <i>Echis coloratus</i> and an Astacin-like metalloproteinase from the venom of the
35	278	brown sphere <i>Lobosceres intermedia</i> . Variations in gray scale indicate revers of percent identity of the restatues in each column with consensus sequence. The symbol (-) represents gaps to improve the alignment. A black line indicates the
36	280	active sites. gi/926630664 - disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 11-like (Limulus polyphemus),
37	281	gi 926637610 - disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9-like (Limulus polyphemus), gi 954573061 -
38	282	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 11 isoform X12 (Polistes canadensis), gi122130019 -
39	203	<i>Loxosceles</i> astacin-like protease 1 and gi ₁ 297593890 - metalloprotemase (<i>Ecnis coloratus</i>).
40	204	4 Discussion
41	200	4. Discussion
42	200	in this work, we define a fractions from the vertice of <i>Expression</i> and <i></i>
43	207	these fractions correspond to L contig: <i>LineT2021</i> , coold
44	200	Analysis by InterPro [0] and PL ASTD [10] indicated that this conting is a metalloproteiness
45	209	with conserved domains tunied from ADAMS. Metalloprotenses are protoclutic angumes, which
46	290	white conserved domains typical norm ADAMS. Metanophoteases are proteory to enzymes, which activity is domained by the domain stypical form and the statistic activity is domained by the statistic activity of the statistic acti
47	291	activity is dependent on divalent ions at their catalytic center, usually zinc, but sometimes mekel,
48	292	manganese of cobart [11]. They are common in several animal venomis, such as snakes, brown spiders and scorpions, and may act in call proliferation, differentiation and in extracellular matrix.
49	295	splicts and scorptons, and have in cert prometation, differentiation and in extra certainta matrix
50	294	remodeling [12]. The metal-officing residues present in the catalytic center are mostly instituties,
51	295	aspartates and glutamates. For ADAWS, the active site is characteristicany composed by the HEnviller (ULD) metifilial lighting are involved in motel blinding, which is preserved for the
52	290	$\pi E x \pi x x x x (\pi, D)$ moul [11]. A sense and mean involved in metal binding, which is necessary for the
53	297	catalytic activity [15]. A general/base actd, mostly a glutamate, is found close to the catalytic metal
54	298	binding and is required for catalysis [11]. The contig Ajur/2031_seq10 has an active site composed
55	299	by the HMXXHXXGXXH motil, similar to ADAMs from the non-venomous horseshoe crab <i>Limulus</i>
56	300	polypnemus (NCBI reference sequence: gi 926630664 and gi 926637610) and the wasp Polistes
57	301	canadensis (NCBI reference sequence: gi:954573061). Our results suggest that the substitution of
58	302	glutamate for methionine, a non-polar aliphatic amino acid, does not affect the proteolytic function
59	303	of these metalloproteinase from A. juruensis venom.
60		

ADAMs (also called adamalysins or reprolysins) are a family of proteins with approximately 750 amino acids in length. Their domain structure is responsible for their variety of functions, including proteolytic, adhesive and putative signalling activities. They have been identified in many species, from the protozoans to vertebrates [14,15,16]. These proteins, also known as metalloendopeptidases, belong to the M12B adamalysin protease subfamily in the MEROPS classification [15], which includes also ADAMTSs and class P-III SVMP [11,17]. Another five metalloproteinases were identified examining only the results obtained by transcriptomic analysis of A. juruensis venom gland. The contig Ajur64801_seq1 has conserved domains typical from ADAMs and, as well as Ajur72031_seq10, showed similarities with these type of enzymes from horseshoe crab Limulus polyphemus. Contig Ajur8793_seq1 presented similarities with ADAMTS, a subclass of ADAMs, from spider Stegodyphus mimosarum. Ajur16413 seq1 possesses identity with an astacin-like metallopeptidase from Tityus serrulatus. The astacin family of metalloproteases is involved in the activation of growth factors, degradation of polypeptides and the processing of extracellular molecules, as well as, digestive process [18]. The contigs Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 showed typical domains and similarity with MMPs from the spiders Parasteatoda tepidariorum and Stegodyphus mimosarum. The MMPs, also

[19]. The presence of several types of enzymes, such as, hyaluroidases, collagenases and sphingomyelinase D, is already known in spider venoms [4]. Metalloproteinases have been found in venoms from the araneomorph spider families Araneidae, Nephilidae, Sparassidae, Lycosidae, Sicariidae [20], including the species Latrodectus spp. [21], Loxosceles spp. [22], Parawixia bistriata [23] and Hippasa partita [24]. Regarding mygalomorph spiders from the Theraphosidae family, the presence of metalloproteinases has already been described in venoms from Grammostola inhering [25] and Haplopelma hainanum [26]. Thus, the presence of metalloproteinases in the venom of Avicularia juruensis is described for first time in this work. Because this arboreal species has broad feeding habits, preying a wide variety of invertebrates and small vertebrates including bird chicks, we suggest that these metalloproteinases in their venom are likely involved in a key role during pre-oral digestion.

known as matrixins, are proteinases capable to degrade all components of the extracellular matrix

5. Conclusion

The study of Theraphosidae spider venom is important to describe its composition, since this group is less studied in comparison to spiders with medical importance, such as Latrodectus spp. [21] and Loxosceles spp. [22]. In addition to their biological importance, the study of these venoms can, eventually, result in identification of molecules with biotechnological applications, such as the U-theraphotoxin-Aju1a from A. juruensis with potential de develop antifungal drugs [8].

Authors' contributions. P.I.S.Jr. and S.M.N. conceived and designed the experiments; S.M.N. and U.C.O. performed the experiments; M.Y.N.Jr., S.M.N. and U.C.O. analyzed the data; A.K.T., I.L.M.J. and P.I.S.Jr. contributed reagents, materials and analysis tools; P.I.S.Jr. and S.M.N. wrote the paper, and all authors contributed substantially to revisions.

Competing interests. We have no competing interests

Acknowledgments. This work was supported by FAPESP, Fundap and CNPq. We are also grateful to I.L. Candido-Ferreira whose comments improved the manuscript

Reference

- Rash LD, Hodgson WC. 2002 Pharmacology and biochemistry of spider venoms. Toxicon 40, 225-254. (doi:10.1016/S0041-0101(01)00199-4)
- Coclix RF, 2011 *Biology of Spiders*, 3rd edn. New York, USA: Oxford University Press.
 Windley MJ, Herzig V, Dziemborowicz SA, Hardy MC, King GF, Nicholson GM. 2012 Spider-venom peptides as bioinsecticides. Toxins 4, 191-227. (doi:10.3390/toxins4030191)
 4. Nentwig W, Kuhn-Nentwig L. 2013 Main components of spiders venoms. In Spider Ecophysiology (ed. Nentwig W),
- Ist edn. Berlin, Germany: Spinger Heidelberg. 5. Mello-Leitão CF. 1922 *Theraphosoideas do Brasil*. São Paulo, Brazil: Revista do Museu Paulista (In Portuguese).
- 6. World Spider Catalog. 2016 Available online: http://wsc.nmbe.ch
 - García-Arteolodo A, Rodríguez-Peios L, Diaz-Peña LF, Vega-Ángeles R. 2015 Pharmacological characterization of venoms from three theraphosid spiders: *Poecilotheria regalis, Ceratogyrus darlingi* and *Brachypelma epicureanum. J* Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 21, 1-9. (doi:10.1186/s40409-015-0017-8)

https://mc.manuscriptcentral.com/rsos

Page 10 of 18

34 35

1		
2		
3	363	8. Ayroza G, Ferreira ILC, Sayegh RSR, Tashima AK, Silva Junior PI. 2012 Juruin: an antifungal peptide from the venom
4	364	of the Amazonian Pink Toe spider, Avicularia juruensis, which contains the inhibitory cystine knot motif. Front
5	365	<i>Microbiol</i> 3 , 1-10. (doi:10.3389/fmicb.2012.00324)
6	367	9. Mitchell A <i>et al.</i> 2015 The interPro protein families database: the classification resource after 15 years. <i>Nucleic Acids</i> <i>Bas A</i> D213. (doi:10.1003/nar/dku12/43).
7	368	10 Altschul SF Madden TL Schäffer AA Zhang I Zhang Z Miller W Linman DI 1997 Ganned BLAST and PSI-
8	369	BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25, 3389–3402.
0	370	(doi:10.1093/nar/25.17.3389)
9	371	11. Cerdà-Costa N, Gomis-Rüth FX. 2013 Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. Protein Sci
10	372	23 , 123-144. (doi:10.1002/pro.2400)
10	3/3	12. Oliverra UC, Candido DM, Dorce VAC, Junquera-de-Azevedo ILM. 2015 The transcriptome recipe for the venom
12	374	cocktail of <i>Highs ballensis</i> scorpton. <i>Loxicol</i> 95 , 52-01. (doi:10.1016).10000.2014.12.015) 13 Greenki II <i>H et al.</i> 2014 <i>Becont</i> advances in the understanding of howar spider venome. From the biology of spiders to
13	376	the molecular mechanisms of toxins. <i>Toxicon</i> 83, 91-120. (doi:10.1016/j.toxicon.2014.02.023)
14	377	14. Huovila APJ, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Kärkkäinen I, Ortiz RM. 2005 Shedding light on ADAM
15	378	metalloproteinases. Trends Biochem Sci 30, 413-422. (doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2005.05.006)
16	379	15. Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. 2016 Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their
17	380	substrates and inhibitors. <i>Nucleic Acids Res</i> 44, D343–D350. (doi:10.1093/nar/gkv1118)
18	382	10. Keiss K, Saftig P. 2009 The "A Disintegrin And Metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: Physiological and callbar functions. Samira Relation 126 137 (doi:10.1016/j.samadh.2009.11.002)
19	383	certural milectoris. <i>Semin Cert Dev Biol</i> 20, 120-137. (doi:10.1010/J.Semicol.2008.11.002) 17 Takeda S. Takeda H. Juanzoa S. 2012 Snake venom metallonroteinases: Structure function and relevance to the
20	384	mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. Biochim Biophys Acta 1824, 164-176.
21	385	(doi:10.1016/j.bbapap.2011.04.009)
22	386	18. da Silveira RB et al. 2007 Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like
23	387	metalloprotease toxin from Loxosceles intermedia (brown spider) venom. Biochem J 406, 355-563.
24	388	(doi:10.1042/BJ200/0365) 10.1.85645 S.Sakilling O. Experies CW 2011 Richards and of matrix matellogue tainesses a gritical kalance. <i>Fun Respire L</i>
25	390	19. Lonex 5, Schning O, Franzke C w. 2011 Biological role of matrix metanoproteinases, a critical balance. Eur Respir 5 38 191-208 (doi:10.1183/09031936.00146510)
26	391	20. Kuhn-Nentwig L, Stöcklin R, Nentwig W. 2011 Venom Composition and Strategies in Spiders: Is Everything
27	392	Possible? In Advances in Insect Physiology (ed. Casas J). Burlington, USA: Elsevier academic press.
28	393	21. Yan S, Wang X. 2015 Recent Advances in Research on Widow Spider Venoms and Toxins. Toxins 7, 5055-5067.
29	394	(doi:10.3390/toxins7124862)
30	395	22. Fertosa L, Gremski W, Verga SS, Elias MC, Graner E, Mangilli OC, Brentani RR. 1998 Detection and characterization
31	397	of metanoprotemases with genation (i.e. noronecono)yuc and normogenolytic activities in brown spider (Loxosceles intermedia) venam Tavican 36 (1039-1051) (doi:10.1016/S0041-0101(97)00083-4)
32	398	23. Gimenz GS et al. 2014 Biochemical and functional characterization of Parawixia bistriata spider venom with
33	399	potential proteolytic and larvicidal activities. Biomed Res Int 2014, 1-14. (doi:10.1155/2014/950538)
34	400	24. Nagaraju S, Girish KS, Fox JW, Kemparaju K. 2007 'Partitagin' a hemorrhagic metalloprotease from Hippasa partita
35	401	spider venom: Role in tissue necrosis. <i>Biochimie</i> 89 , 1322-1331. (doi:10.1016/j.biochi.2007.04.005)
36	402	22. Borges MH, Figueredo SG, Leprevost FV, de Lima ME, Corderio MN, Diniz MRV, Moresco J, Carvalho PC, Yates B. 2016 Vingergang autorate protein profile of Bearing the Granupacity information for a particular
37	403	JA. 2010 venomous extract protein protein of brazinan transmus drammostora meringi, searching for potential biotechnological analications. J Proteomics 136, 35-47 (doi:10.1016/j.jprot.2016.01.013)
38	405	26. Cheng TC et al. 2016 Identification and characterization of toxins in the venom gland of the Chinese bird spider.
30	406	Haplopelma hainanum, by transcriptomic analysis. Insect Sci 23, 487-499. (doi:10.1111/1744-7917.12305)
40	407	27. Rocha-E-Silva TA, Sutti R, Hyslop S. 2009 Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider
40	408	Vitalius dubius (Theraphosidae). Toxicon 53, 153-161. (doi:10.1016/j.toxicon.2008.10.026)
41	409	28. Laemmli UK. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage 14. <i>Nature</i> 227, 695 (1):101003(27260-0)
42	410	080-085. (doi:10.1038/22/08000) 29 Bassam BL Castano-Anollés G. Gresshoff PM 1991 Fast and sensitive silver staining of DNA in polyaerylamide cele
43	412	Anal Biochem 196, 80-83. (doi:10.1016/0003-2697(91)90120-1)
44	413	30. Stone KL, Gulcicek EE, Willians KR. 2009 Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrylamide
45	414	gels. In The Protein Protocols Handbook (ed. Walker JM), 3rd edn. New Jersey, USA: Humana Press.
46	415	31. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2014 Available online:
47	416	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastq.
48	417	<i>Sz.</i> Orabnett MO <i>et al.</i> 2011 Timity: reconstructing a full-tength transcriptome without a genome from RNA-sed data. <i>Nat Riotechnol</i> 29, 644-652 (doi:10.1038/pbt.1883).
49	419	33. Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, Liu C, Shi W, Brvant SH. 2010 The NCBI BioSystems
50	420	database. Nucleic Acids Res 38, D492-D496. (doi:10.1093/nar/gkp858)
51	421	34. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010 SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence
52	422	alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol 27, 221-224. (doi:10.1093/molbev/msp259)
53		
54		
55		
56		
57		
58		
59		
60		
		https://mampucarinteentral.com/roop
		nups.//nic.manuscriptcentral.com/rsos



https://mc.manuscriptcentral.com/rsos

Page 12 of 18



Page 14 of 18





Page 16 of 18



Alignment of amino acid sequences of contig Ajur72031_seq10 with ADAMs proteins from *Limulus polyphemus* and *Polistes canadensis*, a SVMP from the venom of *Echis coloratus* and an Astacin-like metalloproteinase from the venom of *Loxosceles intermedia*. Variations in gray scale indicate levels of percent identity of the residues in each column with consensus sequence. The identity percentages, compared to first sequence, are indicated in the end of amino acid sequences. The symbol (-) represents gaps to improve the alignment. The active sites are indicated by a black line. gi|926630664 - disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 11-like (*Limulus polyphemus*), gi|926637610 - disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 11 isoform X12 (*Polistes canadensis*), gi122130019 -*Loxosceles* astacin-like protease 1 and gi|297593890 - metalloproteinase (*Echis coloratus*). 160x137mm (300 x 300 DPI)

1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	Ajur8793_seq 1
8	ไลป. สารสารที่ไม่หาวิเสารที่ได้เสารที่สารสารที่สารสารที่ได้เสารที่ได้สารสารที่สารสารที่สารที่ได้เสารที่ได้เสารไ
q	2 De prestato
10	Ajur16413_seq 1
10	Tet Medenter wallen Leiten and State and the State and State and the State and S
12	A Areas
13	Ajur64801_seq 2
14	จึงหนึ่งสืมสองของสามที่สามารถและสามารถไม่สามารถสามารถไม่สามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถส
15	Pag. J128_propage superfamility
16	ในประการเพิ่มสารของสน้ำมาและส่วนสองสารสารสารสารสารสารสารสารสารสารสารสารสารส
17	ل بند بنده با
18	Ajur66621_seq 1
19	h ar tealainte de ar tealainte de airte de airte de airte
20	A ALLENT A A ALL Core appertunity
21	реклама.ии п. п. п
22	
23	HC sportaulty
20	Ajur76134_seq 1
25	Fanitelach.Scientrataclu.Scienterinaisettariaettariaettariaetta
26	Pro Biologica - San Pro Biologica - Pro Biolog
27	้ถึงมีไหม่แปนกำเว็บแอ่นออกไม้ที่สนอนเลขาชี้เอย่างแล้วระเมืองหลังและได้เป็นแปนเลขาดเลขาดเลขางการหลังเมืองการที่ไ
28	The state and th
29	Papel Idams, MG
30	
31	100 mpc 7 mily
32	
32 33	Concerned demoins of the contine Aium0702 and Aium16412 and Aium64004 and Aium66624 and and
32 33 34	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur26134, seq1, appendent of BLASTP alignments [10]. Contins Ajur8793, seq1, and Ajur16413, seq1, have
32 33 34 35	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also
32 33 34 35 36	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX
32 33 34 35 36 37	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur6621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All
32 33 34 35 36 37 38	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated.
32 33 34 35 36 37 38 39	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
312 333 3435 3637 3839 4041 4243 444 4546 4748 4950 511 522 53 5455	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
312 333 3435 3637 3839 4041 4243 444 4546 4748 4950 511 522 534 555 56	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur6621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur6621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
312 333 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 45 56 57	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PC_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
312 333 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 45 56 57 58	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur6621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
312 333 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 546 47 48 49 50 51 52 53 45 56 57 58 59	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses same domain and also Pep_M12B_propep superfamily. Ajur66621_seq1 possesses domains ZnMc_MMP/Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
312 333 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 546 47 48 49 50 51 52 53 45 56 57 85 960	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses domains ZnMC_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)
312 333 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 50 51 52 53 54 55 56 57 8 9 60	Conserved domains of the contigs Ajur8793_seq1, Ajur16413_seq1, Ajur64801_seq2, Ajur66621_seq1 and Ajur76134_seq1 generated in BLASTP alignments [10]. Contigs Ajur8793_seq1 and Ajur16413_seq1 have the conserved domain ZnMc superfamily. Ajur64801_seq2 possesses domains ZnMc_MMP/ Peptidase M10 and HX superfamily. And the contig Ajur76134_seq1 has the same domains and also PG_binding_1 superfamily. All of them have the active site composed by HExxHxxxxH motif, which is also indicated. 160x125mm (300 x 300 DPI)

Page 18 of 18

