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)

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.

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 entrediferentes 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 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 biotecnológico 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.