

Soraia Maria do Nascimento

Toxinas do veneno da aranha
Avicularia juruensis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2023

Soraia Maria do Nascimento

Toxinas do veneno da aranha
Avicularia juruensis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Pedro Ismael da Silva Junior

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2023

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Nascimento, Soraia Maria do
Toxinas do veneno da aranha Avicularia juruensis
/ Soraia Maria do Nascimento; orientador Pedro
Ismael da Silva Junior. -- São Paulo, 2023.
180 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Caracterização. 2. Veneno. 3. Toxina. 4.
Transcriptoma. 5. Theraphosidae. I. Silva Junior,
Pedro Ismael da, orientador. II. Título.

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

Título da Tese: Toxinas do veneno da aranha *Avicularia juruensis*

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Júnior

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Pedro Ismael Da Silva Junior
Área: Lab. Especial De Toxicologia Aplicada
Dr. Pedro Ismael Da Silva Junior (orientador)

Título do projeto: "Toxinas do veneno da aranha Avicularia juruensis".

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, na reunião de 21/09/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE SÃO PAULO
- IFSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Toxinas do veneno da aranha Avicularia juruensis

Pesquisador: SORAIA MARIA DO NASCIMENTO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15390119.9.0000.5473

Instituição Proponente: Instituto Butantan

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.486.142

Apresentação do Projeto:

O projeto tem como objetivo isolar e identificar peptídeos antimicrobianos presentes no veneno da aranha Avicularia juruensis. Será coletado veneno de aranhas da espécie mencionada e testadas em ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido contra bactérias Gram positivas, negativas, fungos e leveduras. Além disso, frações que forem capazes de inibir o crescimento de algum dos microrganismos testados também serão testadas contra hemácias humanas. Será coletado sangue do tipo A+ de dois doadores humanos.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo tem como objetivo fazer a caracterização total do veneno da aranha migalomorfa Avicularia juruensis, bem como avaliar a presença de peptídeos antimicrobianos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

O doador humano poderá estar exposto aos riscos de dor ou incômodo no ato da coleta de sangue. Também poderá ocorrer a formação de hematoma no local onde a agulha será introduzida para a coleta de sangue.

Benefícios

Endereço: Rua Pedro Vicente, 625

Bairro: Canindé

UF: SP

Telefone: (11)3775-4665

Município: SAO PAULO

CEP: 01.109-010

E-mail: cep_ifsp@ifsp.edu.br

Continuação do Parecer: 3.486.142

Ao participar dessa pesquisa o doador de sangue humano não terá benefício direto, porém sua colaboração será essencial para a descoberta e caracterização de peptídeos antimicrobianos. Tais moléculas são fortes candidatas para a criação de novos medicamentos antibióticos que podem vir a ser empregados no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos disponíveis atualmente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo relevante para a área de conhecimento de ciências da saúde e apresenta objetivos e métodos claros.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Todas as recomendações apontadas no parecer anterior foram realizadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a declarar.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1346737.pdf	15/07/2019 15:42:51		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	15/07/2019 15:40:57	SORAIA MARIA DO NASCIMENTO	Aceito
Outros	Termo_de_consentimento.pdf	15/07/2019 15:40:38	SORAIA MARIA DO NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_assinado.pdf	15/07/2019 15:39:42	SORAIA MARIA DO NASCIMENTO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	31/05/2019 15:47:30	SORAIA MARIA DO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_de_uso_material_biologico.pdf	03/05/2019 15:03:31	SORAIA MARIA DO NASCIMENTO	Aceito

Endereço: Rua Pedro Vicente, 625

Bairro: Canindé

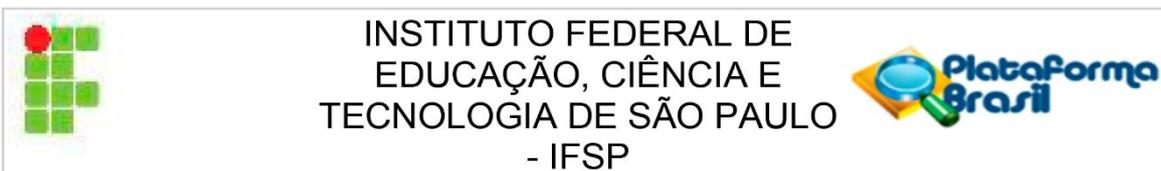
CEP: 01.109-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3775-4665

E-mail: cep_ifsp@ifsp.edu.br



Continuação do Parecer: 3.486.142

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Agosto de 2019

Assinado por:

**Camila Collpy Gonzalez Fernandez
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Pedro Vicente, 625

Bairro: Canindé

CEP: 01.109-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3775-4665

E-mail: cep_ifsp@ifsp.edu.br



Projeto de Pesquisa:
Toxinas do veneno da aranha Avicularia juruensis

Informações Preliminares

Responsável Principal

CPF/Documento: 360.976.378-70	Nome: SORAIA MARIA DO NASCIMENTO
Telefone: 11966180735	E-mail: soraia.nascimento@butantan.gov.br

Instituição Proponente

CNPJ: 61.821.344/0001-56	Nome da Instituição: Instituto Butantan
--------------------------	---

É um estudo internacional? Não

■ **Assistentes**

CPF/Documento	Nome
782.296.268-04	PEDRO ISMAEL DA SILVA JUNIOR

■ **Equipe de Pesquisa**

CPF/Documento	Nome
782.296.268-04	PEDRO ISMAEL DA SILVA JUNIOR

Área de Estudo

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 2. Ciências Biológicas
- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Ciências Básicas

Título Público da Pesquisa: Toxinas do veneno da aranha Avicularia juruensis

Contato Público

CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
360.976.378-70	SORAIA MARIA DO NASCIMENTO	11966180735	soraia.nascimento@butantan.gov.br

Contato Científico: SORAIA MARIA DO NASCIMENTO

Desenho:

Este projeto visa o isolamento e identificação de peptídeos antimicrobianos presentes no veneno da aranha *Avicularia juruensis*. Exemplos desta espécie serão coletados e utilizados neste estudo sob as licenças Sisbio nº 11024-3 e CGEN nº 010345/2014-0. O veneno será obtido por estimulação elétrica e fracionado por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa. As frações obtidas serão testadas em ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido contra bactérias Gram positivas, negativas, fungos e leveduras. As frações que forem capazes de inibir o crescimento de algum dos microrganismos testados também serão testadas contra hemácias humanas, a fim de se verificar se elas possuem atividade hemolítica. O sangue do tipo A+ será 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 será descartado e as hemácias serão 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 serão feitas novas centrifugações a 700 xG por 15 minutos e o sobrenadante será descartado. Por fim, as hemácias serão ressuspensas no mesmo tampão PBS 1 X até a concentração final de 3% (v/v). Serão coletadas alíquotas de 20 L das frações antimicrobianas, as quais serão testadas em duplicata em diluições seriadas iniciadas a partir da maior concentração na qual elas apresentarem capacidade de inibir o crescimento de microrganismos. Como controle positivo (100% de hemólise) serão utilizados 50 L de solução de Triton X-100 (0,1%) e como controle negativo (0% de hemólise) serão utilizados 50 L do tampão PBS 1 X, citado anteriormente. O teste será feito numa microplaca de 96 poços com fundo em "U". A cada poço, que já conterá as amostras e os controles, serão adicionados 50 L da solução de hemácias 3% (v/v). A placa será incubada durante 1 hora a 37 °C. Após a incubação, o sobrenadante será recolhido de cada poço e transferido para outra microplaca de 96 poços (sem fundo "U"). A presença ou ausência de hemólise será 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 será determinado pela média dos valores obtidos. A porcentagem de hemólise será calculada pela fórmula indicada no trabalho realizado por Hao et al., 2009.

Apoio Financeiro

CNPJ	Nome	E-mail	Telefone	Tipo
				Financiamento Próprio

Palavra Chave

Palavra-chave
Veneno
Peptídeos antimicrobianos
Aranha

Detalhamento do Estudo

Resumo:

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. Sendo assim, 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 tem como objetivo analisar moléculas bioativas presentes no veneno da aranha migalomorfa *Avicularia juruensis*, com foco em peptídeos antimicrobianos.

Introdução:

As aranhas têm registro fóssil mais antigo datando de 300 milhões de anos atrás, no período Carbonífero (Cheng et al., 2015). Elas pertencem ao subfilo Chelicerata, Classe Arachnida e Ordem Araneae, sendo subdivididas em três subordens: Mesothelae, Mygalomorphae e Araneomorphae (Foelix, 2011; Ruppert, Barnes, 1996).

Estes animais formam um dos grupos de maior sucesso em termos de diversidade, com mais de 48 mil espécies descritas, e estão entre os predadores terrestres mais bem-sucedidos (Akef, 2018; Nicholson, Kastin, 2013; World Spider Catalog, 2019). Elas distribuem-se por todo o planeta e habitam praticamente todos os ambientes, com exceção do ar, oceanos e polos (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 de defesa eficientes. Um destes mecanismos 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).

O peptídeos antimicrobianos (PAMs), por sua vez, são moléculas amplamente distribuídas na natureza, possuindo uma grande diversidade de estruturas e espectro de atividade (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 (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 desnaturação (Daffre et al., 2001).

Porém, eles também são capazes de se ligar com receptores de membranas, interagir com DNA, agir sobre a produção de peróxido de hidrogênio ou induzir 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, sendo que 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 tarabaei* (Kozlov et al., 2006); e as licotoxinas I e II, de *Lycosa carolinensis* (Yan, Adams, 1998).

Hipótese:

A proposta em questão trata-se de pesquisa qualitativa, portanto, não utilizará de hipótese.

Objetivo Primário:

Este trabalho tem como objetivo principal estudar moléculas bioativas presentes no veneno da aranha migalomorfa *Avicularia juruensis*, bem como identificá-las e caracterizá-las. Um dos objetivos específicos é identificar e caracterizar os peptídeos antimicrobianos.

Metodologia Proposta:

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

Obtenção do veneno: O veneno analisado neste estudo será extraído seguindo-se a metodologia descrita por Rocha-e-Silva et al., (2009).

Fracionamento: 10 mg de veneno serão fracionados utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa, num sistema Prominence LC-20A (Shimadzu). A eluição será realizada com um gradiente de 2 a 80% de acetonitrila durante 60 minutos, com fluxo de 1,5 mL/minuto e absorbância monitorada a 225 nm. As frações correspondentes aos picos observados no cromatograma serão coletadas manualmente e separadamente e utilizadas no ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido.

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

Ensaio hemolítico: O sangue do tipo A+ será 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 será descartado e as hemácias serão 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 serão feitas novas centrifugações a 700 xG por 15 minutos e o sobrenadante será descartado. Por fim, as hemácias serão ressuspendidas no mesmo tampão PBS 1 X até a concentração final de 3% (v/v).

Serão coletadas alíquotas de 20 L das frações antimicrobianas, as quais serão testadas em duplicata em diluições seriadas iniciadas a partir da maior concentração na qual elas apresentarem capacidade de inibir o crescimento de microrganismos. Como controle positivo (100% de hemólise) serão utilizados 50 L de solução de Triton X-100 (0,1%) e como controle negativo (0% de hemólise) serão utilizados 50 L do tampão PBS 1 X, citado anteriormente. O teste será feito numa microplaca de 96 poços com fundo em "U". A cada poço, que já conterá as amostras e os controles, serão adicionados 50 L da solução de hemácias 3% (v/v).

A placa será incubada durante 1 hora a 37 °C. Após a incubação, o sobrenadante será recolhido de cada poço e transferido para outra microplaca de 96 poços (sem fundo "U"). A presença ou ausência de hemólise será 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 será determinado pela média dos valores obtidos. A porcentagem de hemólise será calculada pela fórmula indicada no trabalho realizado por Hao et al., 2009.

Riscos:

Não se aplica.

Benefícios:

Não se aplica.

Metodologia de Análise de Dados:

A análise dos resultados será feita manualmente e também com o auxílio do software Excel para a construção dos gráficos de porcentagem de hemólise.

Desfecho Primário:

O desfecho primário esperado é a identificação de peptídeos com ação antimicrobiana frente à diferentes microrganismos.

O estudo de peptídeos antimicrobianos se faz importante porque estes podem vir a ser empregados para o desenvolvimento de novos antibióticos empregados no tratamento de microrganismos resistentes.

Tamanho da Amostra no Brasil: 2

Países de Recrutamento

País de Origem do Estudo	País	Nº de participantes da pesquisa
Sim	BRASIL	2

Outras Informações

Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)?

Não

Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa:

2

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro

ID Grupo	Nº de Indivíduos	Intervenções a serem realizadas
Grupo único	2	Coleta de sangue

O Estudo é Multicêntrico no Brasil?

Não

Propõe dispensa do TCLE?

Não

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Não

Cronograma de Execução

Identificação da Etapa	Início (DD/MM/AAAA)	Término (DD/MM/AAAA)
Desenvolvimento do projeto	03/05/2019	04/11/2020

Orçamento Financeiro

Identificação de Orçamento	Tipo	Valor em Reais (R\$)
Bolsa de estudos	Bolsas	R\$ 30.800,00
Total em R\$		R\$ 30.800,00

Bibliografia:

Akef HM. Anticancer, antimicrobial, and analgesic activities of spider venoms. *Toxicology Research*. 2018;7(3):381-95. 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. Brogden KA, Ackermann M, McCray PB Jr, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22(5):465-78. Bulet P, et al. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem*. 1993;268(20):14893-7. Cheng T-C, Long R-W, Wu Y-Q, Guo Y-B, Liu D-L, Peng L, et al. Identification and characterization of toxins in the venom gland of the Chinese bird spider, *Haplopelma hainanum*, by transcriptomic analysis. *Insect Science*. 2015;23(3):487-99. Choi SJ, et al. Isolation and characterization of Psalmopeptoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula *Psalmopoeus cambridgei*. *FEBS Lett*. 2004;572(1-3):109-17. Daffre S, et al. Peptídeos antibióticos: peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. *Biocombustíveis, Ciência & Desenvolvimento*. 2001;23:48-55. Escoubas P, Diochot S, Corzo G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*. 2000;82(9):893-907. Foelix R. *Biology of Spiders*. 3rd, editor. New York: Oxford University Press; 2011. 419 p. 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, et al. ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic Acids Research*. 2011;39:D653-7. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway JRCA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 1999;284(5418):1313-8. Kozlov SA, Vassilevski AA, Feofanov AV, Surovov AY, Karpunin DV, Grishin EV. Laticarins,

Data de Submissão do Projeto: 03/05/2019

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1346737.pdf

Versão do Projeto: 1

antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *J Biol Chem*. 2006;281(30):20983-92. Nicholson GM, Kastin AJ. Chapter 63 - Spider Peptides. *Handbook of Biologically Active Peptides* (Second Edition). Boston: Academic Press; 2013. p. 461-72. Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol*. 2012;32(2):143-71. 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. Ruppert E, Barnes R. *Zoologia dos invertebrados*. 6th, editor. São Paulo: Editora Roca; 1996. 1029 p. 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. Windley MJ, Herzig V, Dziemborowicz SA, Hardy MC, King GF, Nicholson GM. Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins*. 2012;4(3):191-227. *World Spider Catalog*. [Internet]. Natural History Museum Bern. [2019 May 02]. Available from: <http://wsc.nmbe.ch> 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. Yan L, Adams ME. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J Biol Chem*. 1998;273(4):2059-66.

Upload de Documentos

Arquivo Anexos:

Tipo	Arquivo
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento.pdf
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_de_uso_material_biologico.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf

Finalizar

Manter sigilo da integra do projeto de pesquisa: Não

Data de Submissão do Projeto: 03/05/2019

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1346737.pdf

Versão do Projeto: 1

*Aos meus pais, Luiz e Conceição, e à
minha irmã, Juliana, minha família
que sempre fez o melhor por mim.
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Luiz e Conceição, e à minha irmã, Juliana, por todo suporte que sempre me deram. Sem vocês eu nada teria conquistado!

Ao Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior, pela confiança em mim depositada, por ter acreditado na minha capacidade de realizar este e outros trabalhos. Também por todos os seus ensinamentos e orientação, com certeza tive muita sorte em tê-lo como orientador!

A todos os meus amigos do laboratório de Química de Proteínas: Thiago, Bruna, Laura, Norton, Paula, Débora, Sandra, André, Patrícia Yumi, Rosa, Kátia, Andrea Grespan, Andrea Roa, Elisa, Katie e Thaís. Muito obrigada pelo companheirismo de todos vocês. Juntos conseguimos superar as dificuldades e realizamos ótimos trabalhos!

Aos alunos e pesquisadores dos demais setores do Laboratório de Toxinologia Aplicada, por sempre terem me ajudado quando precisei e me esclareceram muitas dúvidas. Também a todos os funcionários, sem exceções, que são essenciais para o bom funcionamento do laboratório! Em especial ao Ismael, por ter me auxiliado todas as vezes que precisei usar os espectrômetros de massas.

À equipe do setor de Genômica e Transcriptômica: Mariana, Dra. Nancy, Dra. Úrsula, Dr. Milton e Dr. Inácio, pela realização da análise transcriptômica, bem como ao Dr. Alexandre Tashima, que proporcionou o suporte financeiro a esta etapa e também auxiliou em análises complementares de espectrometria de massas, juntamente com seus alunos Me. Érika Nishiduka, Me. Rafael Lomazi e Dr. Marcus Buri.

À Dra. Mônica Lopes Ferreira, antiga diretora do Laboratório de Toxinologia Aplicada, e ao Dr. Inácio Junqueira, atual diretor, por permitirem que eu realizasse meu trabalho neste laboratório, onde tive toda a estrutura necessária. Ao Dr. Hugo Armelin, coordenador do CeTICS, que aprovou o apoio financeiro para que eu participasse do XV Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia.

Aos Doutores Rafael Sutti e Thomaz Rocha-e-Silva, por terem me ensinado a fazer a extração do veneno, essencial para a realização desta tese.

Às minhas eternas amigas da faculdade: Débora, Natália, Annelly, Kelly e Hellen. Apesar de não termos mais tanto tempo para nos encontrarmos pessoalmente, sempre mantivemos contato. Vocês foram os melhores presentes que conquistei durante a graduação!

Às secretárias da Pós-Graduação, Eliane e Fábria, que sempre foram atenciosas, prestativas e muito competentes.

Ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao Instituto Butantan.

À Dra. Margareth Capurro, Dra. Adriana Rios e ao Dr. Rafael Sutti, membros da minha banca de qualificação, que deram ótimas sugestões para a melhoria deste trabalho. E aos membros da atual banca, por aceitarem o convite para avaliar minha tese.

A todos os colaboradores dos setores Vacinas Aeróbicas e Vacinas Anaeróbicas do Instituto Butantan, pelos ensinamentos e pela paciência nos últimos anos do meu Doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, bem como do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processo nº 472744/2012-7) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (projeto CeTICS, processo nº 2013/07467-1). Sendo assim, agradeço à CAPES, pela bolsa auxílio a mim concedida durante o doutorado, também ao CNPq e à FAPESP, pelo suporte financeiro ao projeto e ao laboratório onde estudo foi conduzido.

Muito obrigada a cada um de vocês!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas, graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

RESUMO

Nascimento SM. Toxinas do veneno da aranha *Avicularia juruensis*. [tese (Doutorado em Biotecnologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

As aranhas formam um dos grupos mais diversificados em número de espécies e estão entre os animais venenosos mais bem sucedidos, pois distribuem-se por todo o planeta e habitam praticamente todos os ambientes. Essa ampla distribuição sugere que elas possuam mecanismos de defesa muito eficientes, um deles é a produção de veneno, que é resultado de milhões de anos de evolução e é constituído por uma complexa mistura de toxinas. Os venenos animais podem vir a ser boas fontes de moléculas com potencial terapêutico e biotecnológico, já que contém um grande número de componentes biologicamente ativos que possuem alta especificidade a seus alvos. Uma ampla variedade de atividades já foi detectada no veneno de aranhas e algumas toxinas isoladas têm ajudado no desenvolvimento de biotecnologias em diferentes áreas. Visto estes fatos, esse estudo teve como objetivo identificar as toxinas do veneno da aranha *Avicularia juruensis*, que foi escolhida para este estudo devido ao fato de geralmente consumir pequenas aves e, por este motivo, provavelmente possuir veneno bastante tóxico e com ação rápida. Para isso, foi feita a análise transcriptômica de suas glândulas de veneno e a análise proteômica do veneno. A análise transcriptômica retornou 64.020 transcritos ao todo e, após a remoção dos redundantes e dos que possuíam FPKM menor do que 1, foram obtidos 46.537. Com eles foi montado um banco de dados denominado “*Best candidates*”. Estes transcritos também foram submetidos a buscas utilizando-se as ferramentas *UniprotToxins* e *VenomKB*, os que apresentaram homologia com moléculas depositadas nestes bancos foram utilizados para a montagem de um segundo banco de dados, nomeado “*Uniprot toxins*”. Os 46.537 transcritos também foram manualmente anotados, obtendo-se ao final 203, estes compuseram um terceiro banco de dados chamado “*Transcriptoma anotado*”. Os três bancos criados com os transcritos foram empregados na análise dos resultados obtidos por espectrometria de massas. A combinação das técnicas de análise transcriptômica e espectrometria de massas foi empregada com o objetivo de verificar se as toxinas observadas no transcriptoma realmente estavam presentes no veneno. Com esta abordagem, foi possível verificar que as terafotoxinas são as moléculas mais abundantes, em especial as U-terafotoxinas. Elas são toxinas encontradas em venenos de aranhas pertencentes à família Theraphosidae e, em sua maioria, possuem ação neurotóxica e podem agir numa

ampla gama de alvos moleculares. Ademais, tendo em vista que as U-terafotoxinas foram as toxinas mais abundantes, foi construída uma árvore filogenética ilustrativa com as mesmas, o que ajudou a compreender um pouco mais sobre a evolução destas toxinas entre as aranhas. Além das terafotoxinas também foi observada a presença de CRISPs, hialuronidase e neprilisinases. Visto estes resultados, é provável que o veneno de *A. juruensis* é bastante neurotóxico e a presença das enzimas é um indicativo de que ele age rapidamente. Estudos posteriores são necessários para a avaliação do modo de ação deste veneno sobre vertebrados e invertebrados e novas análises empregando-se diferentes metodologias podem ajudar a identificar uma maior quantidade de toxinas.

Palavras-chave: Caracterização. Veneno. Toxina. Transcriptoma. Theraphosidae.

ABSTRACT

Nascimento SM. Toxins from *Avicularia juruensis*'s spider venom. Ph.D thesis [(Biotechnology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

Spiders are one of the most diverse groups in the number of species and are among the most successful venomous animals because they are distributed all over the world and inhabit practically all environments. This broad distribution suggests that they have very efficient defense mechanisms, one of them is the production of venom, which is the result of millions of years of evolution and consists of a complex mixture of toxins. Animal venoms can be good sources of molecules with therapeutic and biotechnological potential since it contains many biologically active components that have high target specificity. A wide variety of activities have already been detected in spider venom and some isolated toxins are being used in the development of biotechnologies in different areas. Given these facts, this study aimed to identify the toxins in the venom of the spider *Avicularia juruensis*, which was chosen because it generally eats small birds and, for this reason, it probably has a very toxic and fast-acting venom. For this, the transcriptomic analysis of their venom glands and the proteomic analysis of the venom were performed. The transcriptomic analysis returned a total of 64,020 transcripts and, after removing the redundant ones and those with FPKM <1, 46,537 were obtained. With them, a database named “Best candidates” was created. These transcripts were also searched using the UniprotToxins and VenomKB tools, those that showed homology with molecules deposited in these tools were used to assemble a second database named “Uniprot toxins.” The 46,537 transcripts were also manually annotated, resulting in 203, which made up the third database “Annotated transcriptome”. These three databases created with the transcripts were used to analyze the results obtained by mass spectrometry. The combination of transcriptomic analysis and mass spectrometry approaches was used to verify if the toxins observed in the transcriptome are present in the venom. So, it was possible to verify that terafotoxins are the most abundant molecules, especially the U-terafotoxins. They are toxins found in the venoms of spiders belonging to the Theraphosidae family and, most of them, have neurotoxic action and can act on a wide range of molecular targets. Furthermore, considering that U-terafotoxins were the most abundant toxins, an illustrative phylogenetic tree was constructed with them, which helped to understand a little more about the evolution of these toxins among spiders. In addition to terafotoxins, the presence of CRISPs,

hyaluronidase, and neprilysins was also observed. Considering these results, it is probable that *A. juruensis* venom is quite neurotoxic and the presence of enzymes indicates that it acts fast. Further studies are needed to evaluate the mode of action of this venom on vertebrates and invertebrates, and new analyzes using different methodologies may help to identify more toxins.

Keywords: Characterization. Venom. Toxin. Transcriptome. Theraphosidae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Divisões e estruturas do corpo de um quelicerado	30
Figura 2 - A espécie <i>Liphistius pinlaung</i> , pertencente à Subordem Mesothelae.....	31
Figura 3 - Disposição das quelíceras de aranhas migalomorfas.....	31
Figura 4 - Disposição das quelíceras de aranhas araneomorfas	32
Figura 5 - Crânio do animal pré-histórico <i>Euchambersia mirabilis</i>	33
Figura 6 - Três mecanismos de desnaturação de membranas celulares causadas por peptídeos antimicrobianos	37
Figura 7 - Exemplos de peptídeos de venenos de aranhas que possuem os três tipos de motivos “nó de cistina”	39
Figura 8 - A espécie <i>Avicularia juruensis</i>	42
Figura 9 - Extração de veneno de uma fêmea da espécie <i>Avicularia juruensis</i>	45
Figura 10 - Etapas da remoção das glândulas de veneno de fêmeas de <i>Avicularia juruensis</i>	46
Figura 11 - Gráfico indicando as porcentagens de expressão gênica das categorias nas quais os transcritos obtidos na análise transcriptômica das glândulas de veneno de <i>Avicularia juruensis</i> foram classificados.....	53
Figura 12 - Gráfico indicando as porcentagens de expressão gênica das categorias nas quais os transcritos “ <i>Toxin</i> ”, que representam potenciais toxinas, foram classificados após as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp.....	55
Figura 13 - Alinhamento e comparação do transcrito Ajur1413 com a acetilcolinesterase do veneno da aranha <i>Trittame loki</i> (UniProt ID: W4VSJ0).....	58
Figura 14 - Alinhamento e comparação dos transcritos Ajur3310 e Ajur11434 com a EF-hand protein-like protein de <i>Haplopelma schmidti</i> (UniProt ID: B5M6G5).....	59
Figura 15 - Alinhamento e comparação dos transcritos Ajur8701 e Ajur10276 com a toxina TCTP1-1 (<i>Translationally-controlled tumor protein homolog</i>) do veneno da aranha <i>Grammostola rosea</i> (UniProt ID: M5B4R7)	60
Figura 16 - Alinhamento e comparação dos transcritos Ajur5422 e Ajur39949 com a CRISP GTx-VA1 (UniProt ID: M5AWW7) do veneno da aranha <i>Grammostola rosea</i>	61
Figura 17 - Alinhamento e comparação do transcrito Ajur5801 com a CRISP GTx-CRISP1 (UniProt ID: M5AYF1) do veneno da aranha <i>Grammostola rósea</i>	62
Figura 18 - Alinhamento e comparação dos transcritos Ajur8771 e Ajur29642 com fosfolipases A2 e D dos venenos da lacraia <i>Scolopendra viridis</i> e da aranha <i>Sicarius albospinosus</i>	64
Figura 19 - Alinhamento e comparação do transcrito Ajur2769 com uma hialuronidase do veneno da aranha <i>Loxosceles intermedia</i> (UniProt ID: R4J7Z9).....	65
Figura 20 - Alinhamento e comparação dos transcritos Ajur479 e Ajur27716 com uma neprilisina do veneno da aranha <i>Trittame loki</i> (UniProt ID: W4VS99).....	69

Figura 21 - Diagrama de Venn representando a sobreposição das toxinas em comum identificadas utilizando-se os bancos de dados Transcriptoma anotado, <i>UniProt toxins</i> e <i>Best candidates</i>	75
Figura 22 - Resultado obtido na análise por espectrometria de massas do transcrito Ajur56021, identificado no transcriptoma das glândulas de veneno e no proteoma do veneno da aranha <i>Avicularia juruensis</i>	78
Figura 23 - Alinhamento e comparação do transcrito Ajur56021 com a U6- <i>theraphotoxin-Hhn1a 1</i> do veneno da aranha <i>Haplopelma hainanum</i> (<i>UniProt</i> ID: D2Y2C1), <i>Ômega-theraphotoxin-Avspla</i> de <i>Avicularia</i> sp. (<i>UniProt</i> ID: P0DW96), <i>Kappa-theraphotoxin-Aala</i> de <i>Avicularia aurantiaca</i> (<i>UniProt</i> ID: A0A3F2YLP5) e <i>Mu/kappa-theraphotoxin-Apla</i> de <i>Avicularia purpurea</i> (<i>UniProt</i> ID: P0DQJ6).....	79
Figura 24 - Árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i> e toxinas depositadas nos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i>	80
Figura 25 - Subgrupo I da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i> e toxinas depositadas nos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i>	81
Figura 26 - Subgrupo II da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i> e toxinas depositadas nos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i>	83
Figura 27 - Subgrupo III da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i> e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i>	85
Figura 28 - Subgrupo IV da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i> e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i>	87
Figura 29 - Subgrupo V da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i> e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i>	89
Figura 30 - Subgrupo VI da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i> e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i>	91
Figura 31 - Subgrupo VII da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i> e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i>	93
Figura 32 - Subgrupo VIII da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i> e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i>	95
Figura 33 - Subgrupo IX da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i> e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Toxinas com as quais os transcritos da categoria “Componente de veneno” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp	56
Tabela 2 - Toxinas com as quais os transcritos da categoria “Terafotoxina” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp	71
Tabela 3 - Resultados obtidos na análise por espectrometria de massas do veneno da espécie <i>Avicularia juruensis</i>	74
Tabela 4 - Transcritos referentes a toxinas identificadas em comum nos bancos de dados Transcriptoma anotado, <i>UniProt toxins</i> e <i>Best candidates</i> através da análise por espectrometria de massas do veneno da aranha <i>Avicularia juruensis</i>	76
Tabela 5 - Toxinas obtidas dos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i> que foram reunidas no subgrupo I da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i>	82
Tabela 6 - Toxinas obtidas dos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i> que foram reunidas no subgrupo II da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i>	84
Tabela 7 - Toxinas obtidas dos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i> que foram reunidas no subgrupo III da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i>	86
Tabela 8 - Toxinas obtidas dos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i> que foram reunidas no subgrupo IV da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i>	88
Tabela 9 - Toxinas obtidas dos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i> que foram reunidas no subgrupo V da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i>	90
Tabela 10 - Toxinas obtidas dos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i> que foram reunidas no subgrupo VI da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i>	92
Tabela 11 - Toxinas obtidas dos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i> que foram reunidas no subgrupo VII da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i>	94
Tabela 12 - Toxinas obtidas dos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i> que foram reunidas no subgrupo VIII da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i>	96
Tabela 13 - Toxinas obtidas dos bancos de dados <i>UniProt</i> e <i>GenBank</i> que foram reunidas no subgrupo IX da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de <i>Avicularia juruensis</i>	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Letra Alfa do alfabeto grego
β	Letra Beta do alfabeto grego
δ	Letra Delta do alfabeto grego
κ	Letra Kappa do alfabeto grego
ω	Letra Ômega do alfabeto grego
π	Letra Pi do alfabeto grego
τ	Letra Tau do alfabeto grego
ASICs	Canais iônicos sensíveis à ácidos
BEH	<i>Ethylene bridged hybrid</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTp	<i>Basic Local Alignment Search Tool - Realiza a pesquisa de proteínas em um banco de dados de proteínas</i>
BLASTx	<i>Basic Local Alignment Search Tool - Realiza a pesquisa de nucleotídeos em um banco de dados de proteínas</i>
CA	Califórnia
Cav	Canais de cálcio dependentes de voltagem
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>
CRISP	<i>Cysteine Rich Secretory Protein</i>
DDA	<i>Data Dependent Acquisition</i>
DDH	<i>Disulfide-directed β-hairpin</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESTs	<i>Expressed sequence tags</i>
EUA	Estados Unidos da América
<i>e-value</i>	<i>Expected value</i>
FPKM	<i>Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped</i>
HDMS	<i>High Definition Mass Spectrometry</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICK	<i>Inhibitory cysteine knot</i>
ID	<i>Identifier</i>
Kv	Canais de potássio dependentes de voltagem

LC-MS/MS.....	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (do inglês <i>Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i>)
MA.....	Massachusetts
MCMC.....	<i>Markov Chain Monte Carlo</i>
MO.....	Missouri
mRNA.....	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
Nav.....	Canais de sódio dependentes de voltagem
NCBI.....	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NJ.....	Nova Jersey
nr.....	Banco de dados <i>Non-Redundant protein sequences</i>
PA.....	Pensilvânia
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
pb	Pares de bases
Pfam.....	<i>The protein families database</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA.....	Ácido ribonucleico
RSEM	<i>RNA-Seq Expectation Maximization</i>
Sisbio	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SP.....	São Paulo
tsa_nr	Banco de dados <i>Transcriptome Shotgun Assembly</i>
UPLC.....	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
WI.....	Wisconsin

Unidades de medida

%.....	Por cento
µg.....	Micrograma
µg/µL	Micrograma por microlitro
µL	Microlitro
µL/min	Microlitro por minuto
µm.....	Micrometro
°C.....	Graus Celsius
cm	Centímetro

Da	Dalton
fmol/ μ L.....	Fentomol por microlitro
Hz	Hertz
kDa	Quilodalton
mM	Milimolar
mm	Milimetro
ms	Milissegundo
m/z	Razão massa/carga
ppm.....	Partes por milhão
rpm.....	Rotações por minuto
V	Volts
xG	Força gravitacional

Elementos químicos

C	Carbono
Ca ²⁺	Íon de cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
K ⁺	Íon de potássio
N	Nitrogênio
Zn ²⁺	Íon de zinco

LISTA DE AMINOÁCIDOS E NUCLEOTÍDEOS

Alanina	A
Cisteína	C
Ácido Aspártico	D
Ácido Glutâmico	E
Fenilalanina	F
Glicina	G
Histidina	H
Lisina	K
Isoleucina.....	I
Leucina	L
Metionina.....	M
Asparagina	N
Prolina.....	P
Glutamina	Q
Arginina	R
Serina	S
Treonina.....	T
Valina	V
Triptofano	W
Tirosina.....	Y
Adenina.....	A
Citosina.....	C
Guanina.....	G
Timina.....	T

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	30
1.1 Venenos animais.....	32
1.2 Tecnologias ômicas no estudo de venenos	34
1.3 Venenos de aranhas	35
1.3.1 Compostos de baixa massa molecular	35
1.3.2 Peptídeos antimicrobianos - PAMs	36
1.3.3 Peptídeos neurotóxicos.....	38
1.3.4 Proteínas e enzimas	40
1.4 Diversidade do veneno de aranhas	41
1.5 A espécie <i>Avicularia juruensis</i>	42
2 OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo geral	44
2.2 Objetivos específicos.....	44
3 METODOLOGIA	45
3.1 Animais.....	45
3.2 Extração do veneno	45
3.3 Análise transcriptômica	46
3.3.1 Estimativa de abundância	47
3.3.2 Anotação funcional.....	47
3.3.3 Anotação manual.....	48
3.4 Preparo das amostras para a análise por espectrometria de massas (redução, alquilação e tripsinização).....	49
3.5 Análise por espectrometria de massas	50
3.6 Análise bioinformática	51
3.7 Árvore filogenética ilustrativa	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 Análise transcriptômica das glândulas de veneno de <i>Avicularia juruensis</i>	53
4.1.1 Componentes de veneno	56
4.1.2 CRISPs (<i>Cysteine rich secretory proteins</i>).....	61
4.1.3 Fosfolipases A e D e hialuronidases	63
4.1.4 Neprilisinases.....	67
4.1.5 Terafotoxinas	70

4.2 Análise proteômica do veneno de <i>Avicularia juruensis</i>	73
4.3 Árvore filogenética ilustrativa	80
5 CONCLUSÕES	99
ANEXO A - Artigos científicos de primeira autoria publicados durante o doutorado	129
ANEXO B - Artigo científico publicado em colaboração durante o doutorado	179

1 INTRODUÇÃO

As aranhas formam um dos mais diversos e bem-sucedidos grupos de animais do Filo Arthropoda (Garwood et al., 2016). Dentro deste Filo, elas estão organizadas no Subfilo Chelicerata, que engloba espécies que possuem o corpo dividido em cefalotórax e abdômen e não apresentam antenas, característica mais marcante do grupo. O primeiro par de apêndices destes animais são estruturas alimentares denominadas quelíceras, o segundo par corresponde aos pedipalpos, os quais são seguidos por quatro pares de pernas (Ruppert, Barnes, 1996) (Figura 1).

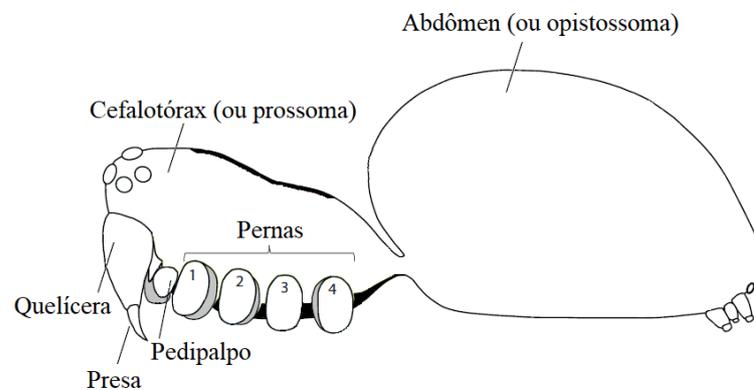


Figura 1 - Divisões e estruturas do corpo de um quelicerado. Adaptado de: Nentwig et al., 2022.

O Subfilo Chelicerata é dividido entre as Classes Pycnogonida, Eurypterida, Xiphosura e Arachnida (Thorp, Rogers, 2015). As aranhas pertencem à Classe Arachnida, Ordem Araneae e organizam-se entre as Subordens Mesothelae, Mygalomorphae e Araneomorphae (Foelix, 2011).

A Subordem Mesothelae agrupa aranhas que são consideradas “fósseis vivos”, uma vez que apresentam características primitivas como abdômen segmentado e fiandeiras posicionadas no meio da região ventral (Xu et al., 2021) (Figura 2). Atualmente esta Subordem possui apenas duas famílias, Heptathelidae e Liphistiidae, com 8 gêneros e 174 espécies descritas, as quais têm sua distribuição limitada ao leste e sudeste da Ásia (World Spider Catalog, 2022; Xu et al., 2021).

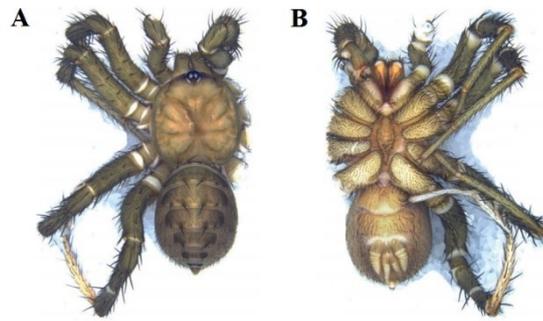


Figura 2 - A espécie *Liphistius pinlaung*, pertencente à Subordem Mesothelae. **A)** Foto exibindo o dorso do animal e seu abdômen segmentado. **B)** Foto exibindo o ventre do animal, onde observa-se que as fiandeiras estão localizadas no meio do abdômen. Adaptado de: Aung et al., 2019.

A Subordem Mygalomorphae é também denominada Orthognatha, em referência ao alinhamento paralelo das quelíceras das espécies pertencentes a esse grupo (orto = ângulo quase totalmente reto; gnata = maxilar, queixo) (Figura 3). Ela abrange todo o grupo de aranhas conhecidas como “caranguejeiras” ou “tarântulas”, que são, em sua maioria, animais grandes que possuem glândulas de veneno pequenas posicionadas no segmento basal das quelíceras (Foelix, 2011; Kuhn-Nentwig et al., 2011).

Até o momento, esta Subordem apresenta 31 famílias com mais de 3.300 espécies descritas, que estão amplamente distribuídas em todo o mundo em especial na região neotropical (Pérez-Miles, Perafán, 2017; World Spider Catalog, 2022).

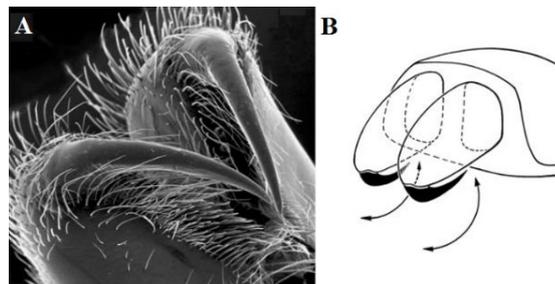


Figura 3 - Disposição das quelíceras de aranhas migalomorfos. **A)** Foto detalhando a disposição paralela das quelíceras. **B)** Ilustração indicando como ocorre a movimentação destas estruturas. Adaptado de: Foelix, 2011.

A Subordem Araneomorphae é também conhecida como Labidognatha, em referência ao alinhamento perpendicular das quelíceras dos animais deste grupo (labido = pinça; gnata = maxilar, queixo) (Figura 4). Ela reúne espécies conhecidas como “aranhas verdadeiras”, que apresentam grande diversidade de tamanho, forma, cor e hábitos (Santos et al., 2017). Estas possuem glândulas de veneno muito longas que alcançam a parte interna do cefalotórax e produzem venenos bastante tóxicos, o que possibilita a captura de presas maiores (Foelix, 2011; Kuhn-Nentwig et al., 2011).

Atualmente, esta Subordem está organizada em 99 famílias com mais de 46.800 espécies descritas, o que representa mais de 93% de toda a diversidade conhecida (World Spider Catalog, 2022).

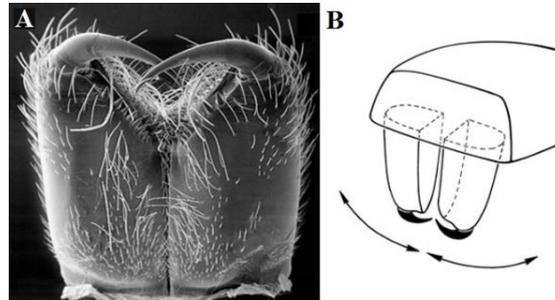


Figura 4 - Disposição das quelíceras de aranhas araneomorfas. A) Foto detalhando a disposição perpendicular das quelíceras. B) Ilustração indicando como ocorre a movimentação destas estruturas. Adaptado de: Foelix, 2011.

As aranhas formam um dos grupos de maior sucesso em termos de diversidade e estão entre os predadores mais bem-sucedidos (Akef, 2018; Nicholson, 2013). Elas ocorrem em todos os habitats terrestres, geralmente em densidades notavelmente altas de espécies e indivíduos e, portanto, são ecologicamente importantes. Apenas a aranha d'água (*Argyroneta aquática*) é encontrada em água doce e no mar as aranhas estão completamente ausentes (Nentwig et al., 2022).

Por terem uma ampla distribuição e sucesso nos ambientes em que são encontradas é certo que as aranhas possuem mecanismos de defesa muito eficientes. Um destes mecanismos 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 animais

Animais venenosos são onipresentes, visto que todos os filos conhecidos contêm tais animais (Holford et al., 2018). Além da ampla distribuição, estima-se que espécies que produzem venenos existam desde os tempos pré-históricos. O réptil extinto *Euchambersia mirabilis*, por exemplo, foi um animal pré-histórico que viveu durante o período Permiano-Triássico, 257 milhões de anos atrás, e que já possuía estruturas características de animais peçonhentos, como uma grande fossa maxilar para abrigar glândulas de veneno, sulcos ou canais para o transporte do veneno até a cavidade bucal e dentes inoculadores (Benoit et al., 2017) (Figura 5).

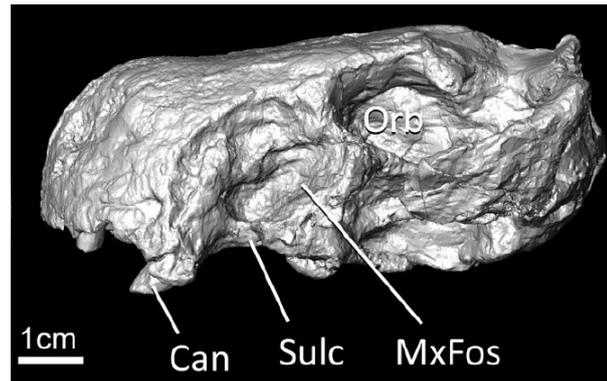


Figura 5 - Crânio do animal pré-histórico *Euchambersia mirabilis*. Estão indicados o dente canino (Can), o sulco que une a fossa maxilar à cavidade bucal (Sulc), a fossa maxilar (MxFos) e a órbita (Orb). Essa anatomia levou à conclusão comumente aceita de que a fossa maxilar acomodava uma glândula de veneno. Adaptado de: Benoit, 2016.

A aquisição de veneno é um evento transformador na evolução de um animal, pois lhe confere vantagens ecológicas e remodela a interação predador-presa, transformando uma batalha física em uma batalha bioquímica e permitindo a caça e defesa contra espécies maiores (Holford et al., 2018; King, Hardy, 2013).

Os venenos animais são secreções produzidas por glândulas especializadas associadas ou não a dentes, ferrões e espinhos. A composição varia de animal para animal, mas, em geral, sabe-se que eles são constituídos por uma mistura heterogênea de sais inorgânicos, moléculas orgânicas de baixa massa molecular, peptídeos e enzimas (Khusro et al., 2018; King, 2011).

A constante evolução dos animais venenosos e de suas presas resultou em venenos extremamente complexos, contendo toxinas que buscam alvos moleculares com excelente potência, afinidade e seletividade (Arbuckle et al., 2017). Os processos de duplicação gênica, *splicing* e modificações pós-traducionais asseguraram que as toxinas possuam tais características (Sabatier et al., 2013).

Apesar de sua toxicidade, os venenos animais representam ótimas ferramentas para a investigação de mecanismos fisiológicos e patológicos. Além disso, são fontes naturais de diversos componentes bioativos cuja maioria possui propriedades ímpares como baixa massa molecular, estabilidade, meia vida longa e alta potência, os quais podem ser empregados para o desenvolvimento de novas drogas e métodos de diagnóstico para uma variedade de doenças como artrite, diabetes, câncer, trombose, hipertensão, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral (Khusro et al., 2018; Martinez et al., 2022; Sabatier et al., 2013). Portanto, não é de se surpreender que as pesquisas mais recentes se concentrem na identificação dos

principais constituintes de venenos (Khusro et al., 2018), sendo que as tecnologias ômicas representam uma das melhores ferramentas para este objetivo.

1.2 Tecnologias ômicas no estudo de venenos

As transformações tecnológicas que expandiram o conhecimento sobre biologia molecular durante a década de 1980 trouxeram novos métodos para isolamento e caracterização gênica. Técnicas sofisticadas para triagem de bibliotecas específicas e aleatórias de cDNA e a descoberta de marcadores de sequências expressas (ESTs - *expressed sequence tags*) permitiram a análise do transcriptoma, abrindo novos caminhos para o estudo de animais peçonhentos e venenosos e os componentes de seus venenos (Diego-García et al., 2016).

Um dos primeiros grupos de pesquisa a investigar transcritos de toxina de aranha foi o do professor Eugene Grishin, que descreveu o cDNA de uma α -latrotoxina obtido de glândulas da espécie *Latrodectus mactans* (Diego-García et al., 2016; Kiyatkin et al., 1990). Atualmente, os avanços realizados nos campos de proteômica, transcriptômica, genômica e bioinformática favoreceram o estudo rápido e aprofundado de quantidades diminutas de amostras complexas provenientes de animais que são pequenos, raros ou de difícil manutenção no laboratório (Holford et al., 2018; Oldrati et al., 2017). A análise holística da composição de venenos aplicando-se a combinação destas técnicas é denominada venômica (Pineda et al., 2014). Utilizando esta abordagem, diversos trabalhos elucidaram a composição de venenos de diferentes animais. Santibáñez-López et al. (2016), por exemplo, analisaram o escorpião *Superstitionia donensis* e observaram a presença de toxinas que agem sobre canais de sódio, potássio e cálcio, inibidores de proteases, enzimas, entre outros componentes. De Oliveira et al. (2018), realizaram um estudo comparativo dos escorpiões *Tityus obscurus* e *Tityus serrulatus* e constaram grande abundância de metaloproteinases para ambos. Ao analisar o veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, Diniz et al. (2018) mostraram que os peptídeos ricos em cisteína são os componentes mais abundantes e a maioria deles contém em sua estrutura o motivo “nó de cistina” do tipo ICK (*inhibitory cysteine knot*).

Com relação aos venenos de aranhas ainda há muito a ser desvendado, visto que são menos analisados em comparação aos de organismos marinhos, escorpiões e serpentes. Em buscas realizadas com a ferramenta *UniProt*, por exemplo, são retornados 3.608 resultados utilizando-se as palavras-chave “*spider venom*”. Em contrapartida, são obtidos 100.902 e

6.687 resultados nas buscas com as palavras-chave “*snake venom*” e “*conus venom*”, respectivamente.

Desta forma, as tecnologias ômicas são uma ótima alternativa para o estudo destes venenos, pois elas fornecem um sistema inigualável para a caracterização de toxinas e têm grande importância para a descoberta e identificação de novas moléculas potencialmente terapêuticas (Garb et al., 2018; Perumal Samy et al., 2017).

1.3 Venenos de aranhas

Por dependerem completamente da predação para se alimentarem, as aranhas desenvolveram venenos bastante complexos ao longo de sua evolução, os quais são capazes de provocar alterações bioquímicas e neurológicas variadas em diversos animais (Beleboni et al., 2004; Gimenez, 2013; Nicholson, 2013). Em geral, eles podem ser constituídos por uma mistura de mais de cem componentes que atuam em diferentes alvos, incluindo vários receptores localizados no sistema muscular ou nervoso, membranas celulares e matriz extracelular. Embora algumas toxinas isoladas possam agir independentemente é a ação sinérgica entre os componentes que desencadeia toda a toxicidade do veneno. Tais componentes são normalmente classificados em quatro grupos: compostos de baixa massa molecular, peptídeos antimicrobianos, peptídeos neurotóxicos e proteínas (incluindo as enzimas) (Langenegger et al., 2019).

1.3.1 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 e acilpoliaminas. Eles possuem massa menor do que 1 kDa e muitos deles agem como neurotransmissores (Langenegger et al., 2019; Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013).

As espécies *Cupiennius salei* e *Aphonopelma hentzi*, por exemplo, possuem venenos ricos em potássio (aproximadamente 200 mM e 70 mM, respectivamente) e pobres em sódio (aproximadamente 10 mM), concentrações opostas às encontradas na hemolinfa. Este alto teor de potássio é capaz de induzir a despolarização das membranas celulares excitáveis, causando a paralisia da presa, e aumenta sinergicamente a atividade dos peptídeos do veneno (Langenegger et al., 2019; Wullschleger et al., 2004; Wullschleger et al., 2005).

Os ácidos orgânicos auxiliam na manutenção do pH dos venenos de aranha que, em geral, varia entre 5,3 e 6,1. O principal deles é o ácido cítrico, cuja presença também é observada em venenos de serpentes, escorpiões, abelhas, vespas e formigas. Além do seu papel na manutenção do pH, propõe-se que este ácido inibe reversivelmente enzimas dependentes de cátions divalentes (fosfolipase A2 ou metalopeptidases, por exemplo) através da complexação dos íons Ca^{2+} e Zn^{2+} . Após a inoculação do veneno na presa, a diluição do ácido cítrico muda o equilíbrio de complexação dos cátions pelas enzimas, as quais são reativadas (Kuhn-Nentwig et al., 2011; Langenegger et al., 2019; Odell et al., 1999).

Os nucleosídeos são um dos principais componentes dos venenos de *Loxosceles* spp. (Schroeder et al., 2008) e *Tegenaria* spp. (Taggi et al., 2004) e têm a função de afetar a transdução de sinal neuronal ou neuromuscular (McCormick et al., 1999).

Já 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 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 Ca^{2+} , K^+ e receptores ionotrópicos (Kuhn-Nentwig et al., 2011).

Como a maioria dos estudos sobre 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 as conhecidas atualmente e que elas estejam presentes na maioria das espécies (Langenegger et al., 2019).

1.3.2 Peptídeos antimicrobianos - PAMs

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

Os PAMs geralmente apresentam cargas positivas e um elevado número de aminoácidos hidrofóbicos. Eles são atraídos para a superfície da membrana devido à interação de suas cadeias laterais positivamente carregadas com os fosfolipídios ou outras moléculas negativamente carregadas e, então, assumem uma conformação anfipática em α -hélice (Langenegger et al., 2019).

O modo de ação mais conhecido dos PAMs se caracteriza pela sua inserção na membrana celular, provocando desnaturação. São conhecidos três diferentes mecanismos:

barril-estável, poro toroidal e carpete. No modelo barril-estável os PAMs interagem com a face externa da membrana, 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 fosfolipídios 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 PAMs é atingida ocorre a formação de micelas, levando à destruição da membrana (Brogden, 2005; Daffre et al., 2001) (Figura 6).

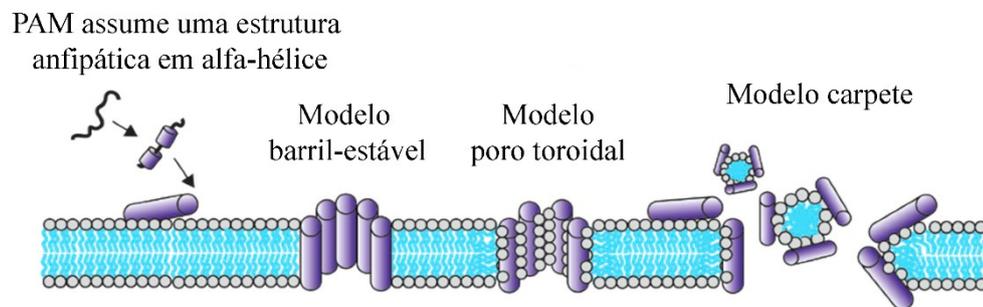


Figura 6 - Três mecanismos de desnaturação de membranas celulares causadas por peptídeos antimicrobianos. Em soluções aquosas os peptídeos estão desestruturados, mas, ao serem atraídos para a superfície da membrana, eles assumem uma conformação anfipática em α -hélice. Quando atingem uma concentração ideal, eles são capazes de desnaturar a membrana de três modos diferentes: modelo barril-estável, modelo poro toroidal ou modelo carpete. Adaptado de: Langenegger et al., 2019.

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).

Outras funções propostas para PAMs de venenos de aranha incluem a defesa antimicrobiana da glândula e do aparato de inoculação (Kuhn-Nentwig, 2003), auxiliar a movimentação e o acesso de neurotoxinas aos seus alvos (Wullschlegler et al., 2005) e até mesmo, mas controversamente discutido, a pré-digestão da presa (Kuhn-Nentwig et al., 2011; Vassilevski et al., 2009).

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 outros peptídeos foram identificados. 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 I e II, de *Lycosa carolinensis* (Yan, Adams, 1998); e as Cupieninas, de *Cupiennius salei* (Kuhn-Nentwig et al., 2002), para estas últimas foi, inclusive, demonstrado que elas podem atuar sinergicamente com neurotoxinas (Kuhn-Nentwig, 2003), assim como as Oxiopininas do veneno de *Oxyopes takobius* (Corzo et al., 2002).

Com relação à espécie que é objeto de estudo deste trabalho, sete peptídeos antimicrobianos já foram identificados em seu veneno: Juruína, Juruína_2, Avilina, Avinina, Aviensina, Jruenina e Jruensina. Todos possuem o motivo “nó de cistina” do tipo ICK em sua estrutura e apresentaram similaridade com neurotoxinas de venenos de outras espécies de aranhas (Ayroza et al., 2012; Nascimento, 2016).

1.3.3 Peptídeos neurotóxicos

Os venenos de aranha contêm uma vasta variedade de peptídeos ricos em cisteína, dos quais acredita-se que a maioria aja em canais e receptores de membranas de células excitáveis e, por este motivo, também podem ser chamados de peptídeos neurotóxicos. Eles normalmente têm massas moleculares entre 3 e 9 kDa e apresentam ≥ 6 resíduos de cisteína, que comumente se estruturam em motivos conservados denominados “nó de cistina”. Estes motivos são compostos por folhas β pregueadas antiparalelas interconectadas por pontes dissulfeto formadas entre as cisteínas presentes na molécula e podem ocorrer em três tipos: *inhibitory cysteine knot* - ICK, *disulfide-directed β -hairpin* - DDH ou Kunitz (Escoubas, Rash, 2004; Langenegger et al., 2019; Norton, Pallaghy, 1998).

O motivo ICK possui uma estrutura que consiste de três folhas β pregueadas e pontes dissulfeto formadas entre as cisteínas C1-C4, C2-C5 e C3-C6. A ligação C3-C6 penetra no anel formado pelas outras duas ligações dissulfeto e a cadeia peptídica. Em proteínas com oito cisteínas as pontes dissulfeto seguem a disposição C1-C4, C2-C5, C3-C8 e C6-C7 (Langenegger et al., 2019; Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013; Norton, Pallaghy, 1998) (Figura 7A).

O motivo DDH é, provavelmente, o mais ancestral. Ele formado por duas folhas β antiparalelas estabilizadas por duas pontes dissulfeto e uma terceira ponte se forma sem ligar as folhas β . As ligações têm a disposição C1-C3, C2-C5 e C4-C6 (Kuhn-Nentwig et al., 2011; Shu et al., 2002) (Figura 7B).

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. Apesar da semelhança estrutural com inibidores de protease, muitos peptídeos de veneno que possuem o domínio Kunitz foram descritos como bloqueadores de canais de potássio (Langenegger et al., 2019; Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013) (Figura 7C).

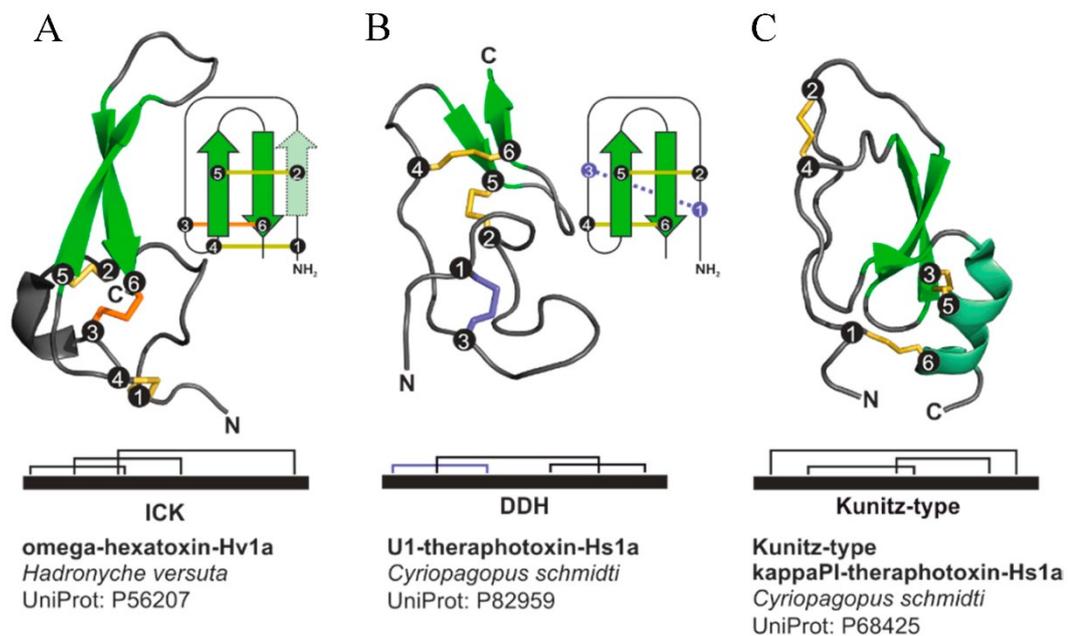


Figura 7 - Exemplos de peptídeos de venenos de aranhas que possuem os três tipos de motivos “nó de cistina”. As cisteínas conectadas por pontes dissulfeto estão numeradas, sendo que estas pontes são mostradas em amarelo. Uma representação esquemática linear de cada motivo está mostrada abaixo de cada imagem correspondente. A porção N-terminal das moléculas está indicada pela letra N. **(A)** Toxina Ômega-hexatoxin-Hv1a, que possui o motivo tipo *inhibitory cysteine knot*. A ponte dissulfeto colorida em laranja penetra no anel formado pelas outras duas ligações dissulfeto e a cadeia peptídica. **(B)** Toxina U1-theraphotoxin-Hs1a, que possui o motivo tipo *disulfide-directed β -hairpin*. A ponte dissulfeto colorida em azul é opcional para este motivo. **(C)** Toxina Kappa PI-theraphotoxin-Hs1a, que possui o motivo tipo Kunitz. Adaptado de: Langenegger et al., 2019.

Os peptídeos neurotóxicos formam complexos estáveis com uma ampla gama de canais e receptores de membranas de células excitáveis e são eficazes até em concentrações nanomolares. Eles podem atuar em canais iônicos sensíveis à voltagem de diferentes subtipos, retardando a inativação, inibindo a abertura ou alterando o limite potencial para ativação. Outros alvos incluem canais iônicos sensíveis a ácido, canais de potássio ativados por cálcio e canais iônicos receptores de potencial transitório (Langenegger et al., 2019).

Os canais iônicos de células excitáveis são responsáveis pela transdução de sinal adequada e a interrupção desta função pode afetar a coordenação, locomoção, respiração e funções cardíacas levando a vários sintomas como convulsões, paralisia e até morte. Os

efeitos tóxicos, no entanto, podem ser dependentes do tipo de presa, da especificidade das neurotoxinas e dos receptores presentes nas células (Langenegger et al., 2019).

1.3.4 Proteínas e enzimas

Por muito tempo acreditava-se que as enzimas e proteínas tinham um papel menos importante em venenos de aranha. A maioria das publicações restringia-se a descrever as enzimas que agem na matriz extracelular ou na membrana das células, facilitando o espalhamento das toxinas. Mais recentemente um número crescente de proteínas foi identificado e então sugeriu-se a separação destas em três classes funcionais: enzimas que atuam como fator de espalhamento, proteínas que têm uma função dentro da glândula de veneno e as que atuam diretamente em alvos importantes das presas (Langenegger et al., 2019).

Entre as enzimas que auxiliam o espalhamento do veneno estão as hialuronidasas (da Silveira et al., 2007; Kaiser, 1956; Rocha-e-Silva et al., 2009), colagenases (Atkinson, Wright, 1992; Nagaraju et al., 2007) e fosfolipases do tipo A (Kuhn-Nentwig et al., 2011). Aranhas da família Sicariidae possuem também esfingomielinase D (fosfolipase tipo D), enzima responsável por efeitos necróticos em humanos e com potente efeito neurotóxico em insetos (Langenegger et al., 2019; Zobel-Thropp et al., 2012).

Proteínas com uma função potencial na glândula de veneno incluem, por exemplo, serino proteases responsáveis pela clivagem de propeptídeos de toxinas imaturas, proteínas dissulfeto isomerases e carboxipeptidasas (Kuhn-Nentwig et al., 2019; Langenegger et al., 2019). Entre as proteínas que atuam diretamente em alvos importantes das presas podem ser citadas uma acetilcolinesterase do veneno de *Trittame loki* (Undheim et al., 2013) e uma α -amilase, que pode causar hiperglicemia devido à liberação rápida de grandes quantidades de glicose (Kuhn-Nentwig et al., 2019).

As latrotoxinas são os componentes de maior tamanho presentes em venenos de aranhas, possuindo massa molecular variada entre 110 e 140 kDa, e são proteínas que não possuem atividade enzimática. Elas foram identificadas nos gêneros *Latrodectus*, *Steatoda* e *Achaearanea* (Nentwig, Kuhn-Nentwig, 2013). Em estudos realizados com as espécies *Latrodectus mactans*, *L. tredecimguttatus* e *L. hasselti* foram identificadas sete destas proteínas, 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 são as

mais bem caracterizadas, elas 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 Ca^{2+} e o bloqueio da transmissão de sinais, levando à paralisia muscular (Rohou et al., 2007).

1.4 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 (Escoubas, Rash, 2004).

Devido à sua grande especificidade, toxinas provenientes do veneno de aranhas podem apresentar alto potencial terapêutico (Pimenta, de Lima, 2005). Tais moléculas foram utilizadas, por exemplo, como ferramentas para elucidação da estrutura, função e farmacologia de receptores celulares (Adams, 2004; Ushkaryov et al., 2004). Além disso, elas também podem vir a ajudar no desenvolvimento de biotecnologias nas mais diversas áreas como bioinseticidas (Jin et al., 2017; Xiao et al., 2018), drogas usadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Yang et al., 2019), infecciosas (de Oliveira Domingos et al., 2018; Reis et al., 2018; Tan et al., 2018) e câncer (Barreto dos Santos et al., 2019; Lian et al., 2018; Shen et al., 2018).

No entanto, a maior parte dos estudos realizados se restringem a analisar gêneros que causam efeitos deletérios a humanos, como *Loxosceles*, *Phoneutria* e *Latrodectus*. Entre as aranhas migalomorfas os gêneros mais estudados são *Atrax*, *Hadronyche* e *Illawarra*, pois estes agrupam espécies que possuem veneno bastante tóxico (Pineda et al., 2012).

Sendo assim, 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 caracterização de venenos de aranhas que são de famílias menos estudadas em comparação àquelas que causam acidente com humanos.

1.5 A espécie *Avicularia juruensis*

A aranha *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). Os indivíduos desta família despertam o interesse de pesquisadores, pois quantidades significativas de veneno ou de hemolinfa podem ser facilmente obtidas destes animais (Foelix, 2011).

A *A. juruensis* (Figura 8) difere-se das demais caranguejeiras terafosídeas 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 8 - A espécie *Avicularia juruensis*. **A)** Exemplar filhote. **B)** Fêmea adulta (Fotos: Soraia Maria do Nascimento). **C)** A espécie em seu habitat natural. Registro feito na cidade de Porto Velho, Rondônia, Brasil (Foto: Katie Cristina Takeuti Riciluca).

Como pode ser observado nas Figuras 8A e 8B, esta espécie apresenta diferenças na coloração entre filhotes e adultos. 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 é verificada com as 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 do Peru, Colômbia e Equador. Ela possui hábitos arborícolas (Figura 8C) e normalmente vive solitária em troncos de árvores e folhas de palmeiras, onde constrói seus abrigos numa altura entre 1,5 e 3 metros. (Bertani, 2012; Fukushima, 2011; Fukushima, Bertani, 2017). Esses abrigos geralmente são construídos próximos a ninhos de aves, que podem vir a servir de alimento para esta espécie. O nome de seu gênero é, inclusive, 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 ação rápida e diferentes tipos de componentes que merecem ser cuidadosamente analisados utilizando-se as tecnologias ômicas transcriptômica e proteômica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo fazer a caracterização do veneno da aranha migalomorfa *Avicularia juruensis*.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- identificar as moléculas que compõem o veneno da espécie *Avicularia juruensis* através de análise transcriptômica de suas glândulas de veneno;
- confirmar a presença de tais moléculas através da análise proteômica do veneno;
- construir uma árvore filogenética ilustrativa com os principais componentes identificados;
- verificar as similaridades destas moléculas com toxinas já depositadas em diferentes bancos de dados.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

As aranhas da espécie *Avicularia juruensis* foram coletadas nas cidades de Porto Velho e Monte Negro, Rondônia, Brasil, sob as licenças Sisbio nº 11024-3-IBAMA e CGEN nº 010345/2014-0. Elas foram mantidas no biotério do Laboratório de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan (São Paulo, São Paulo, Brasil) sob temperatura controlada entre 24°C e 26°C, sendo alimentadas a cada 15 dias com baratas e tendo água disponível *ad libitum*.

Este trabalho seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, tendo sido aprovado na reunião realizada no dia 21 de setembro de 2016 (protocolo nº CEUAX 5082310816).

3.2 Extração do veneno

O veneno analisado neste estudo foi extraído através de estimulação elétrica, baseando-se na metodologia descrita por Rocha-e-Silva et al. (2009).

Primeiramente, fêmeas em diferentes estágios de desenvolvimento foram anestesiadas com CO₂ e imobilizadas num suporte especialmente adaptado para a contenção de aranhas. Os eletrodos foram posicionados na base de suas quelíceras e utilizando-se um estimulador elétrico modelo *Neurodyn Portable* (Ibramed, Amparo, SP, Brasil) foram aplicados choques de 35 V, com frequência de 10 Hz e duração de 0,5 ms. O veneno foi coletado diretamente dentro do tubo de microcentrífuga onde as presas estavam posicionadas (Figura 9), desta forma, evitou-se a contaminação por fluidos digestivos.

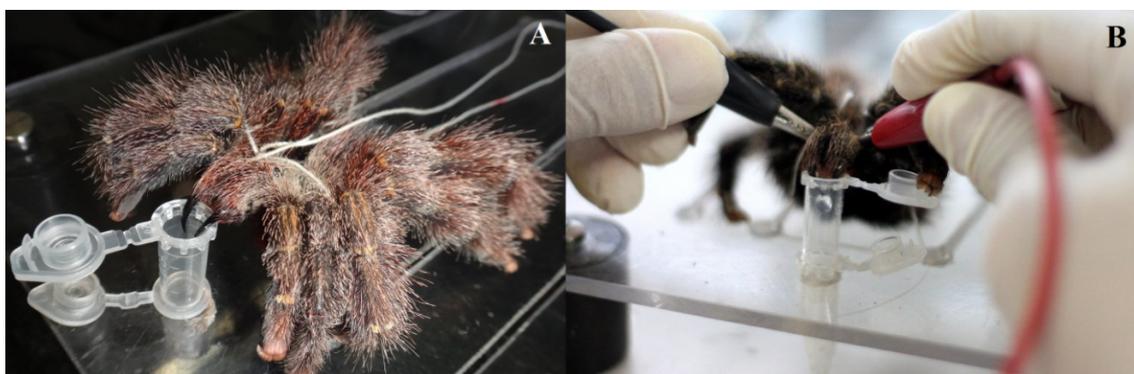


Figura 9 - Extração de veneno de uma fêmea da espécie *Avicularia juruensis*. **A)** A aranha, anestesiada com CO₂, foi imobilizada num suporte especial e suas presas foram posicionadas dentro de um tubo de microcentrífuga. **B)** Os choques foram aplicados na região basal das quelíceras e o veneno foi diretamente coletado dentro do tubo de microcentrífuga, 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 2.450 xG, durante 10 minutos e sob temperatura de 4°C. Sua fração solúvel foi coletada, liofilizada e conservada a -80°C até o uso.

3.3 Análise transcriptômica

O transcriptoma completo das glândulas de veneno de *A. juruensis* foi feito em parceria com o Setor de Genômica e Transcriptômica do Laboratório de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan.

Para a execução do experimento, cinco fêmeas foram submetidas à extração de veneno três dias antes da remoção de suas glândulas, esse intervalo foi empregado para que elas tivessem tempo suficiente para produzir uma boa quantidade de mRNA contendo a informação para a síntese das toxinas. Em seguida, as aranhas foram anestesiadas com CO₂ 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 retirada das glândulas (Figura 10), as quais foram imediatamente conservadas em freezer -80°C. Por fim, os animais foram eutanasiados.



Figura 10 - Etapas da remoção das glândulas de veneno de fêmeas de *Avicularia juruensis*. **A)** Primeiramente as quelíceras inteiras foram removidas. **B)** Realizou-se uma secção da parte inferior da quelícera. **C)** Por fim, a glândula de veneno foi retirada intacta (Fotos: Soraia Maria do Nascimento).

As glândulas obtidas foram homogeneizadas no equipamento *Polytron*[®] *Tissue Homogenizer* (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA) e o RNA total foi extraído com *TRIzol*[™] *Reagent* (Thermo Fisher Scientific Incorporated, Waltham, MA, EUA). O mRNA foi isolado com esferas magnéticas oligo (dT) do kit *Dynabeads*[®] *mRNA DIRECT*[™] (Thermo) e quantificado utilizando-se *Quant-iT*[™] *RiboGreen*[®] *RNA Assay Kit* (Thermo), em seguida, sua integridade foi avaliada através de eletroforese capilar em *chip* RNA 6000 Pico no equipamento 2100 *BioAnalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

O mRNA obtido foi usado para construir a biblioteca de cDNA, a qual foi preparada seguindo o protocolo padrão do kit *TruSeq RNA Sample Prep* (Illumina, San Diego, CA, EUA). Posteriormente, essa biblioteca foi sequenciada no sistema *Illumina HiSeq 1500* em uma célula de fluxo *paired end*, módulo *Rapid Run* de 2*150 pb (pares de bases) por 300 ciclos, de acordo com o procedimento padrão do fabricante do equipamento (*Illumina*).

Para extrair os dados adquiridos pelo sequenciador *Illumina HiSeq 1500* foi utilizado o *software* CASAVA, versão 1.8.2 (*Illumina*). Após o pré-processamento e aplicação de filtros para obtenção de *reads* de alta qualidade, iniciou-se a montagem *de novo* dos transcritos com a ferramenta *rnaSPADES*, versão 3.10.1 (Bushmanova et al. 2019). Em seguida, os transcritos montados foram filtrados de acordo com o tamanho mínimo de 300 pb e cujo nível de expressão apresentasse FPKM (*Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped*) maior do que 1, excluindo-se, assim, resultados que podem representar artefatos. Adicionalmente, os transcritos redundantes foram removidos utilizando-se o *software* CD-HIT (Fu et al., 2012; Li, Godzik, 2006).

3.3.1 Estimativa de abundância

A estimativa de abundância foi avaliada através do alinhamento dos transcritos obtidos contra o transcriptoma montado, seguido pela análise utilizando o método RSEM (*RNA-Seq Expectation Maximization*) (Li, Dewey, 2011). O RSEM tem o objetivo de estimar o nível de expressão aproximado para cada transcrito, gerando o FPKM para cada um. Este método foi utilizado pois não necessita de genoma de referência e pode determinar com confiabilidade a abundância de isoformas, variantes de *splicing* e genes duplicados em transcriptomas montados pelo método *de novo*.

3.3.2 Anotação funcional

Inicialmente, os transcritos foram mapeados com a ferramenta BLASTx (Altschul et al., 1990) contra bancos específicos de toxinas como o *Animal Toxin Database* (He et al., 2008), *UniProtToxinVenom* (The UniProt Consortium, 2015) e *ArachnoServer* (Pineda et al., 2018). De forma mais abrangente, foram feitos alinhamentos contra os bancos *Non-Redundant protein sequences - nr* e *Transcriptome Shotgun Assembly - tsa_nr* do NCBI, além do *Gene Ontology* (Ashburner et al., 2000) e *UniProtKB/Swiss-Prot* (Apweiler et al., 2004). Para os alinhamentos foram utilizados parâmetros de *e-value* menor do que 1e-05.

A identificação de potenciais sequências codificadoras e a predição das proteínas foram feitas empregando-se a ferramenta *TransDecoder*, versão 2.0.1 (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki/>) considerando o parâmetro padrão *minimum length* de 60 pb.

Os transcritos contendo sequências codificantes foram alinhados por BLASTp (Altschul et al., 1990) contra os bancos de dados *UniProtKB/Swiss-Prot*, *nr* e *tsa_nr* do NCBI, com corte de *e-value* de $1e-05$. As proteínas preditas foram avaliadas quanto à presença de domínios conservados utilizando-se o *software* HMMER3 (Wheeler, Eddy, 2013), alinhando-as contra o banco de dados de domínios Pfam (El-Gebali et al. 2019).

O *TransDecoder* pode identificar mais de uma sequência codificante por transcrito, mas apenas uma foi selecionada baseando-se na ordem de prioridade: *UniProtKB/Swiss-Prot*, banco de dados Pfam e *tsa_nr*. Sendo assim, todos estes bancos de dados foram utilizados para anotação e seleção do melhor candidato para transcrito.

3.3.3 Anotação manual

A anotação manual do transcriptoma foi feita analisando-se cada transcrito e comparando-se os resultados obtidos nos alinhamentos feitos contra os bancos de dados *UniProtKB/Swiss-Prot* e *ArachnoServer*, com corte de *e-value* $\leq 1e-06$. Desta forma, os transcritos foram classificados como:

- “*Cell*”: transcritos com similaridade com moléculas envolvidas em funções celulares;
- “*No match*”: transcritos que não apresentaram similaridades com as moléculas depositadas nos bancos *UniProtKB/Swiss-Prot* e *ArachnoServer*;
- “*Toxin*”: transcritos que apresentaram similaridade com toxinas depositadas nos bancos *UniProtKB/Swiss-Prot* e *ArachnoServer* (em ambos ou em um dos dois, com *e-value* $\leq 1e-06$);
- “*Unknown*”: transcritos que apresentaram similaridade com moléculas classificadas como putativas ou não caracterizadas.

Após a classificação dos transcritos, foi feito o cálculo da porcentagem de expressão gênica para cada categoria. Para isso, somou-se o FPKM de todos os transcritos da mesma categoria e o valor obtido foi dividido pela soma do FPKM total do transcriptoma, o resultado obtido foi então multiplicado por 100.

Os transcritos classificados como “*Toxin*” foram submetidos a buscas mais minuciosas utilizando-se a ferramenta BLASTp e agrupados de acordo com os dados obtidos. Considerou-se apenas os resultados onde houveram similaridades com componentes de venenos, nos quais os alinhamentos ocorreram com a região ativa das moléculas, com *e-value* $\leq 1e-06$. Também foram feitos cálculos da porcentagem de expressão gênica para cada grupo de toxinas, seguindo-se os passos já citados anteriormente.

3.3.3.1 Bancos de dados montados a partir do transcriptoma

A partir dos resultados do transcriptoma foram criados três bancos de dados, que foram utilizados na análise bioinformática. Eles foram denominados:

- “*Best candidates*”: contendo os 46.537 transcritos obtidos após a anotação funcional. Foram excluídos os redundantes e os que possuíam FPKM menor do que 1;
- “*UniProt toxins*”: contendo 447 transcritos, os quais apresentaram similaridade com toxinas depositadas nos bancos de dados *UniProtToxins* e *VenomKB* (Romano et al., 2018);
- “Transcriptoma anotado”: contendo os 203 transcritos (que correspondem às proteínas preditas) obtidos após a anotação manual. Estes apresentaram similaridades com componentes de venenos nas análises feitas utilizando-se BLASTp.

3.4 Preparo das amostras para a análise por espectrometria de massas (redução, alquilação e tripsinização)

O processo de digestão proteica foi feito baseando-se no protocolo utilizado pela equipe do Laboratório de Proteômica da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP (de Almeida, 2018).

Um miligrama de veneno liofilizado de *A. juruensis* foi reconstituído em 100 μL de água ultrapura *Milli-Q* (*Merck Millipore*, Burlington, MA, EUA), foram coletadas duas alíquotas de 13 μL cada (correspondente à 130 μg de veneno cada) e o volume das mesmas foi completado para 50 μL utilizando-se uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM. Em seguida, realizou-se uma incubação sob temperatura de 80°C durante 15 minutos e, posteriormente, uma centrifugação a 2.000 rpm por 3 minutos.

A redução das ligações dissulfeto nos resíduos de cisteína foi feita pela adição de 2,5 μL de solução 100 mM ditioneitol (*GE healthcare*, Center Valley, PA, EUA), as amostras foram incubadas a 60°C durante 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 2.000 rpm por 3 minutos. A fim de se evitar que as ligações dissulfeto se formassem novamente, as cisteínas

foram alquiladas através da adição de 2,5 μL de solução 300 mM iodoacetamida (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MO, EUA), sendo também realizada uma nova incubação de 30 minutos, sob temperatura ambiente e protegida da luz. Após esse intervalo, adicionou-se 2 μL de solução de tripsina bovina (*Promega*, Madison, WI, EUA), com concentração de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (proporção final de 1:250 enzima/proteína, aproximadamente), e as amostras foram então incubadas sob temperatura de 37°C *overnight*. Após esse período, a ação da enzima foi interrompida com a adição de 10 μL de solução de ácido trifluoracético 5%, as amostras foram aquecidas a 37°C e incubadas nesta temperatura durante 90 minutos. Ao final de todo este processo, a concentração do veneno na solução era de, aproximadamente, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Possíveis materiais particulados foram removidos do volume final das amostras com o uso de filtros de fluoreto de polivinilideno (*Merck Millipore*) com tamanho de poro de 0,22 μm . As amostras de veneno foram inseridas em *vials* e encaminhadas para análise no espectrômetro de massas.

3.5 Análise por espectrometria de massas

A análise por espectrometria de massas foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicadas à Biomoléculas - LEMBio da Escola Paulista de Medicina EPM/UNIFESP, utilizando-se o equipamento *Synapt G2 HDMS* (*Waters*, Milford, MA, EUA) acoplado a um sistema de cromatografia *nanoAcquity UPLC* (*Waters*).

As amostras previamente digeridas foram submetidas à análise por LC-MS/MS pela metodologia *Data Dependent Acquisition* - DDA. Inicialmente, 5 μL de cada amostra (aproximadamente 10 μg de veneno) foram aplicados em uma coluna C18 *nanoAcquity trap Symmetry* (180 μm x 20 mm) (*Waters*) utilizando-se solução de ácido fórmico 0,1%, sob fluxo de 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 5 minutos. Em seguida, os peptídeos foram fracionados em uma coluna analítica capilar C18 *nanoAcquity BEH* (75 μm x 150 mm, 1,7 μm) (*Waters*) empregando-se uma fase móvel binária composta por água (Fase A) e acetonitrila (Fase B), ambas com 0,1% de ácido fórmico. As eluições foram realizadas com um gradiente de 7% até 35% de Fase B durante 90 minutos, sob fluxo de 0,275 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Foi adquirido o MS *full scan* dos íons precursores em faixa de m/z entre 300-1.600 em ciclos de 0,5 segundo. Para análise MS/MS, foram selecionados os quatro íons precursores duplamente ou triplamente carregados que apresentaram maior intensidade, em seguida, os espectros MS/MS obtidos por CID com argônio foram adquiridos por 0,5 segundo na faixa de m/z entre 50-2.000. Para evitar a seleção de um mesmo íon pelos 45 segundos seguintes,

foram utilizados outros critérios como a intensidade mínima de íons de 2.500 contagens e aplicação de exclusão dinâmica de picos.

A calibração do equipamento foi realizada anteriormente à primeira injeção e durante a corrida analítica a cada 60 segundos, utilizando como padrão o Glufibrinopeptídeo (*Waters*) em concentração igual a 500 fmol/ μ L e fluxo de 0,5 μ L/min.

3.6 Análise bioinformática

Os dados obtidos por espectrometria de massas foram submetidos à análise bioinformática utilizando-se o *software* PEAKS 8.5 (*Bioinformatics Solutions Incorporated*, Waterloo, Ontario, Canadá). Através da função PEAKS DB (*Database Search*) os espectros foram comparados com os bancos de dados previamente criados (item 3.3.3.1), aplicando-se os seguintes parâmetros: tolerância de erro de 10 ppm e de 0,025 Da para o íon precursor e para os fragmentos, respectivamente; carbamidometilação das cisteínas determinada como uma modificação pós-traducional fixa; deamidação da asparagina e da glutamina, oxidação das metioninas e acetilação dos N-terminais determinadas como modificações variáveis.

As sequências de aminoácidos foram alinhadas com o *software* SeaView (Gouy et al., 2010) utilizando-se a opção ClustalO e, posteriormente, coloridas com a ferramenta *Sequence Manipulation Suite* (Stothard, 2000) e *Jalview* (Waterhouse et al., 2009).

O diagrama de Venn foi gerado com a ferramenta *online* Venny 2.0 (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), que realizou a montagem por meio da sobreposição das listas de proteínas identificadas para cada banco de dados. Tais listas foram fornecidas pelo *software* PEAKS 8.5 após a análise dos resultados obtidos por espectrometria de massas.

3.7 Árvore filogenética ilustrativa

Através das análises transcriptômica, proteômica e bioinformática observou-se que as U-terafotoxinas são os componentes mais abundantes do veneno de *A. juruensis* e, por essa razão, estas toxinas foram selecionadas para a construção de uma árvore filogenética ilustrativa. Para isso, primeiramente, foram obtidas as U-terafotoxinas disponíveis nos bancos de dados *UniProt* (The UniProt Consortium, 2017) e *GenBank* (Benson et al., 2017), sendo escolhidas as classificadas como *Reviewed* e as que possuíam mais detalhes sobre sua estrutura e função. Todas as U-terafotoxinas assim obtidas foram alinhadas com as U-

terafotoxinas do veneno de *A. juruensis*, selecionando-se aquelas que foram identificadas em comum tanto na análise transcriptômica quanto proteômica (total de 50). Adicionalmente, nestes alinhamentos foram utilizadas como referências duas toxinas de grupos externos: U2-sicaritoxin-L1a (*UniProt* ID: Q6B4T3), do veneno de *Loxosceles intermedia*, e U7-ctenitoxin-Pn1a (*UniProt* ID: P81791), do veneno de *Phoneutria nigriventer*.

Em seguida, os resultados foram analisados com a ferramenta *Protest* 2.4 (Abascal et al., 2005), que selecionou o modelo de substituição de aminoácidos de Whelan e Goldman, com distribuição Gamma, como o modelo de evolução de proteínas que melhor se ajustou aos alinhamentos das toxinas. As análises estatísticas bayesianas foram realizadas no pacote *BEAST* 1.7.5 (Drummond, Rambaut, 2007), utilizando-se o método *Markov Chain Monte Carlo* - MCMC. Foram executadas quatro análises MCMC independentes, cada uma delas consistiu em 25 milhões de gerações e as árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações. Posteriormente, a convergência foi inspecionada com *Tracer* versão 1.5 (Rambaut et al., 2018), empregando-se um nível estacionário após *BurnIn* de 10%. As árvores obtidas foram usadas para gerar uma única árvore de credibilidade máxima com a ferramenta *TreeAnnotator* versão 1.7.5 (Helfrich et al., 2018), a visualização e edição foi feita utilizando-se *FigTree* versão 1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise transcriptômica das glândulas de veneno de *Avicularia juruensis*

No experimento de análise transcriptômica das glândulas de veneno da aranha *A. juruensis* foram obtidos 64.020 transcritos. Deste total foram removidos os que possuíam FPKM menor do que 1 e os redundantes, ou seja, aqueles com sequência nucleotídica exatamente igual entre si, sendo mantidos apenas os que apresentaram maior FPKM. Desta forma, foi obtida uma listagem final com 46.537 transcritos. Estes foram manualmente anotados seguindo-se a metodologia descrita anteriormente no item 3.3.3. 10.715 transcritos foram classificados como “*Cell*”, 34.953 como “*No match*”, 365 como “*Toxin*” e 509 como “*Unknown*”. Estes resultados podem ser observados na Figura 11, que mostra as porcentagens de expressão gênica de cada categoria. Estas medidas indicam o quanto determinado transcrito estava sendo expresso pelas células da glândula de veneno no momento em que foi realizada a análise transcriptômica.

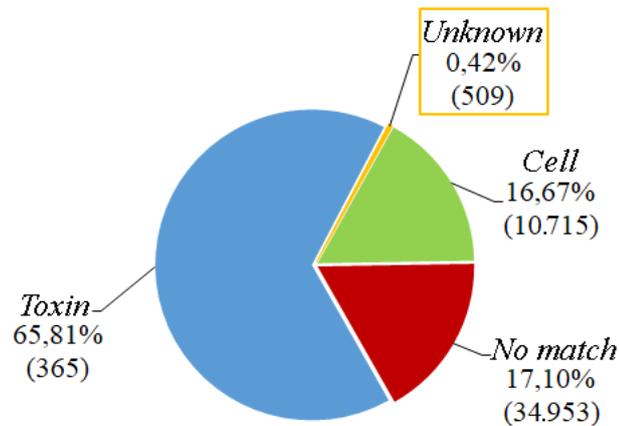


Figura 11 - Gráfico indicando as porcentagens de expressão gênica das categorias nas quais os transcritos obtidos na análise transcriptômica das glândulas de veneno de *Avicularia juruensis* foram classificados, de acordo com os resultados obtidos nas buscas realizadas utilizando-se os bancos de dados *UniProt* e *ArachnoServer*. Entre parênteses são mostradas as quantidades de transcritos incluídos em cada categoria.

Uma pequena parte dos transcritos foi classificada como “*Unknown*”, eles representam 0,42% da expressão gênica das células da glândula de veneno. As moléculas com as quais eles apresentaram similaridade não foram totalmente caracterizadas ou são proteínas putativas ligadas a funções ou estruturas celulares.

Os transcritos incluídos na categoria “*Cell*” totalizam 16,67% da expressão gênica, eles correspondem a componentes celulares e a proteínas ligadas ao metabolismo como, por exemplo, transposases, histonas e ubiquitinas. A presença destes tipos de moléculas é normal

em análises transcriptômicas, visto que todas as células necessitam sintetizar componentes que são indispensáveis para sua manutenção. Fuzita et al. (2015) utilizaram análise transcriptômica e proteômica para investigar o processo digestivo no escorpião *Tityus serrulatus* e identificaram transcritos envolvidos não apenas com a digestão, mas também em muitos aspectos diferentes da homeostase celular.

A presença de transcritos que apresentaram similaridade com moléculas envolvidas em funções celulares também pode confirmar o quanto as células das glândulas estão envolvidas na produção de veneno. Em trabalho realizado por Diniz et al. (2018), onde foi feita a análise transcriptômica das glândulas de veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, foi visto que dos 49.992 transcritos, 21.882 correspondiam a proteínas ligadas a processos biológicos, funções moleculares ou eram componentes celulares. As moléculas ligadas à processos biológicos, como a tradução, eram abundantes, indicando que a glândula é altamente comprometida com a síntese proteica. Além disso, foram identificados muitos transcritos com funções relacionadas à síntese e processamento de proteínas, confirmando que a maior parte da atividade da glândula é dedicada à produção de veneno.

Quase 35 mil transcritos, que representam 17,10% da expressão gênica das glândulas de veneno de *A. juruensis*, não apresentaram similaridades com as moléculas depositadas nos bancos de dados *UniProt* e *ArachnoServer* e foram classificados como “*No match*”. Eles podem representar toxinas que são específicas para o veneno da espécie estudada. De Oliveira et al. (2018) também observaram no transcriptoma das glândulas de veneno dos escorpiões *Tityus obscurus* e *Tityus serrulatus* a presença de transcritos que não possuem similaridades com moléculas já descritas, eles representam 14,97% e 21,99% do total de transcritos, respectivamente. Os autores deste trabalho também propõem que estes transcritos podem representar toxinas que são exclusivas para as espécies analisadas.

É importante destacar que mesmo estando em menor quantidade os transcritos classificados “*Toxin*” apresentam a maior porcentagem de expressão gênica, totalizando 65,81%. Eles representam transcritos que possivelmente são toxinas.

Diniz et al. (2018) também observaram que, mesmo estando em menor quantidade (apenas 2% de um total de 49.992), os transcritos que correspondem a componentes de veneno respondem por 65% da expressão gênica das células da glândula de veneno de *P. nigriventer*. Este resultado mostra que a maioria das proteínas produzidas nas glândulas de veneno desta espécie estão relacionadas às toxinas do veneno, assim como em *A. juruensis*.

Com o objetivo de melhor caracterizá-los, os transcritos “*Toxin*” foram submetidos a novas buscas utilizando-se a ferramenta BLASTp e foram classificados de acordo com as

similaridades observadas. Os resultados podem ser verificados na Figura 12, que mostra as porcentagens de expressão gênica de cada categoria:

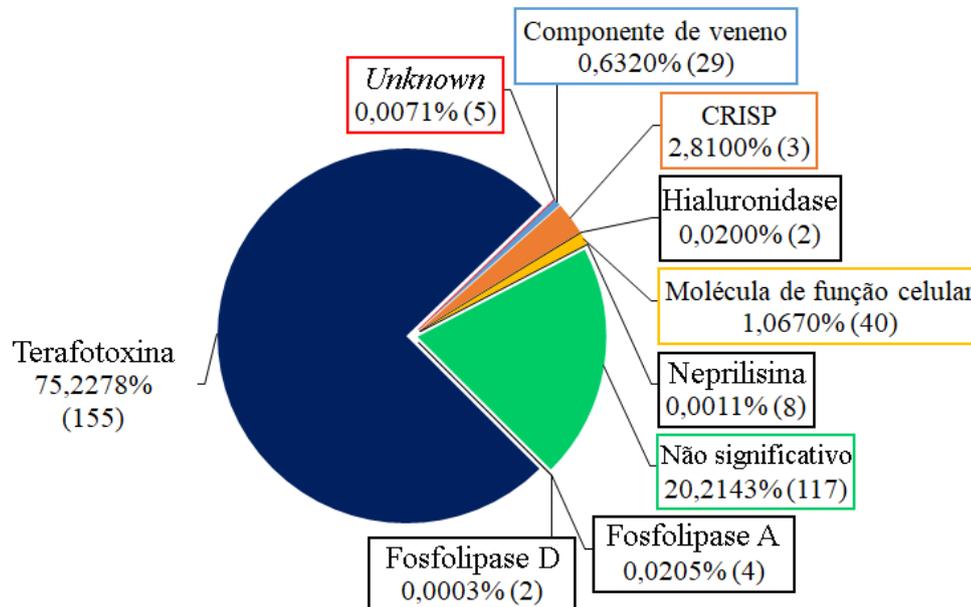


Figura 12 - Gráfico indicando as porcentagens de expressão gênica das categorias nas quais os transcritos “*Toxin*”, que representam potenciais toxinas, foram classificados após as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp. Entre parênteses são mostradas as quantidades de transcritos incluídos em cada categoria.

Após as análises com BLASTp, 117 transcritos, que representam 20,2143% da expressão gênica dentro do grupo “*Toxin*”, foram classificados como “Não significativo”, pois não se alinharam com as regiões ativas das toxinas com as quais apresentaram similaridade. Isso pode ser explicado pelo fato de que estes transcritos não foram completamente montados durante a análise transcriptômica.

Quarenta transcritos (1,0670% da expressão gênica) foram classificados como “Molécula de função celular”, por apresentarem similaridade com proteínas envolvidas em funções celulares, e 5 transcritos (0,0071% da expressão gênica) foram classificados como “*Unknown*”, pois possuem similaridade com moléculas classificadas como putativas ou não caracterizadas. Nestes casos os valores de *e-value* obtidos por BLASTp foram melhores dos que os obtidos nas buscas feitas com *UniProt* e *ArachnoServer*. Como o BLASTp possui maior quantidade e variedade de moléculas depositadas em seu banco de dados foi possível identificar estas reais similaridades, sendo assim, estes transcritos que inicialmente eram considerados como possíveis toxinas foram reclassificados.

Excluindo-se os transcritos das categorias “Molécula de função celular”, “Não significativo” e “*Unknown*” obtêm-se uma lista com 203 deles. Estes foram analisados cuidadosamente e foram utilizados para montar o banco de dados denominado

“Transcriptoma anotado”, empregado na análise bioinformática dos resultados adquiridos por espectrometria de massas.

4.1.1 Componentes de veneno

A categoria “Componente de veneno” reúne 29 transcritos que possuem similaridade com diferentes tipos de moléculas. A Tabela 1, a seguir, mostra os resultados obtidos nas análises feitas utilizando-se a ferramenta BLASTp e a Tabela A. I. (Apêndice I) indica estes resultados com mais detalhes.

Tabela 1 - Toxinas com as quais os transcritos da categoria “Componente de veneno” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp. A Tabela também indica a função descrita para estas toxinas. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. As porcentagens de expressão gênica se referem ao conjunto dos transcritos que possuem similaridade com uma mesma toxina.

Toxina	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	Expressão gênica dentro da categoria
BLTX228	Não conhecida	Ajur8384 Ajur21511 Ajur25684	0,2310%
BLTX669	Não conhecida	Ajur17621 Ajur48290	0,8675%
<i>Carboxylic ester hydrolase</i>	Acetilcolinesterase	Ajur1413	0,8521%
<i>Chymotrypsin inhibitor-like</i>	Inibidor enzimático	Ajur23233 Ajur24070	5,7016%
<i>Cystatin-1</i>	Inibidor enzimático	Ajur7877 Ajur15507	3,6776%
<i>EF-hand protein-like protein</i>	Papel na secreção de toxinas	Ajur3310 Ajur11434	19,5719%
<i>Endothelin-converting enzyme 1</i>	Metaloendopeptidase	Ajur48047	0,0212%
<i>Kunitz-type serine protease inhibitor spermatin</i>	Inibidor de serino protease	Ajur18807	0,4029%
<i>Peptidase-like protein</i>	Metaloendopeptidase	Ajur5037 Ajur5674 Ajur19434	0,4677%
<i>Spider venom protein</i> NPTX_C771	Não conhecida	Ajur29594	0,1073%

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Continua na página 57.

Continuação da Tabela 1.

Toxina	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	Expressão gênica dentro da categoria
TCTP1-1	Causa edema e inflamação e aumenta a permeabilidade vascular	Ajur8701 Ajur10276	52,9086%
<i>Toxin-like protein 14</i>	Não conhecida	Ajur13814 Ajur15625 Ajur20339 Ajur23665	6,3687%
U1- <i>hexatoxin-Iw1e</i>	Não conhecida	Ajur9290	7,7908%
U24- <i>ctenitoxin-Pn1a</i>	Não conhecida	Ajur12508	0,3764%
U3- <i>aranetoxin-Ce1a-like</i>	Não conhecida	Ajur60093	0,0185%
U8- <i>agatoxin-Ao1a-like</i>	Não conhecida	Ajur13904	0,0368%
<i>Venom peptide SjAPI-2-like</i>	Provável inibidor enzimático	Ajur18753	0,5995%

*De acordo com dados disponíveis no *Uniprot* e NCBI.

Entre os resultados mais interessantes podemos observar que o transcrito Ajur1413 possui similaridade com a enzima acetilcolinesterase, que é capaz de hidrolisar rapidamente o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses neuronal e neuromuscular, interferindo na transdução de sinal.

A existência de acetilcolinesterase em venenos de serpentes já é conhecida há bastante tempo (Duhaiman et al., 1996; Frobert et al., 1997) e, em trabalho realizado com a espécie *Bungarus fasciatus*, Bourne et al. (2015) obtiveram pela primeira vez a estrutura cristalina desta enzima.

Em venenos de aranhas a presença desta molécula foi descrita uma única vez por Undheim et al. (2013) em estudo realizado com a espécie *Trittame loki*. A Figura 13 mostra o alinhamento desta acetilcolinesterase com a de *A. juruensis*, onde é possível observar que os aminoácidos localizados nos sítios ativos e as cisteínas que formam pontes dissulfeto se alinham perfeitamente.

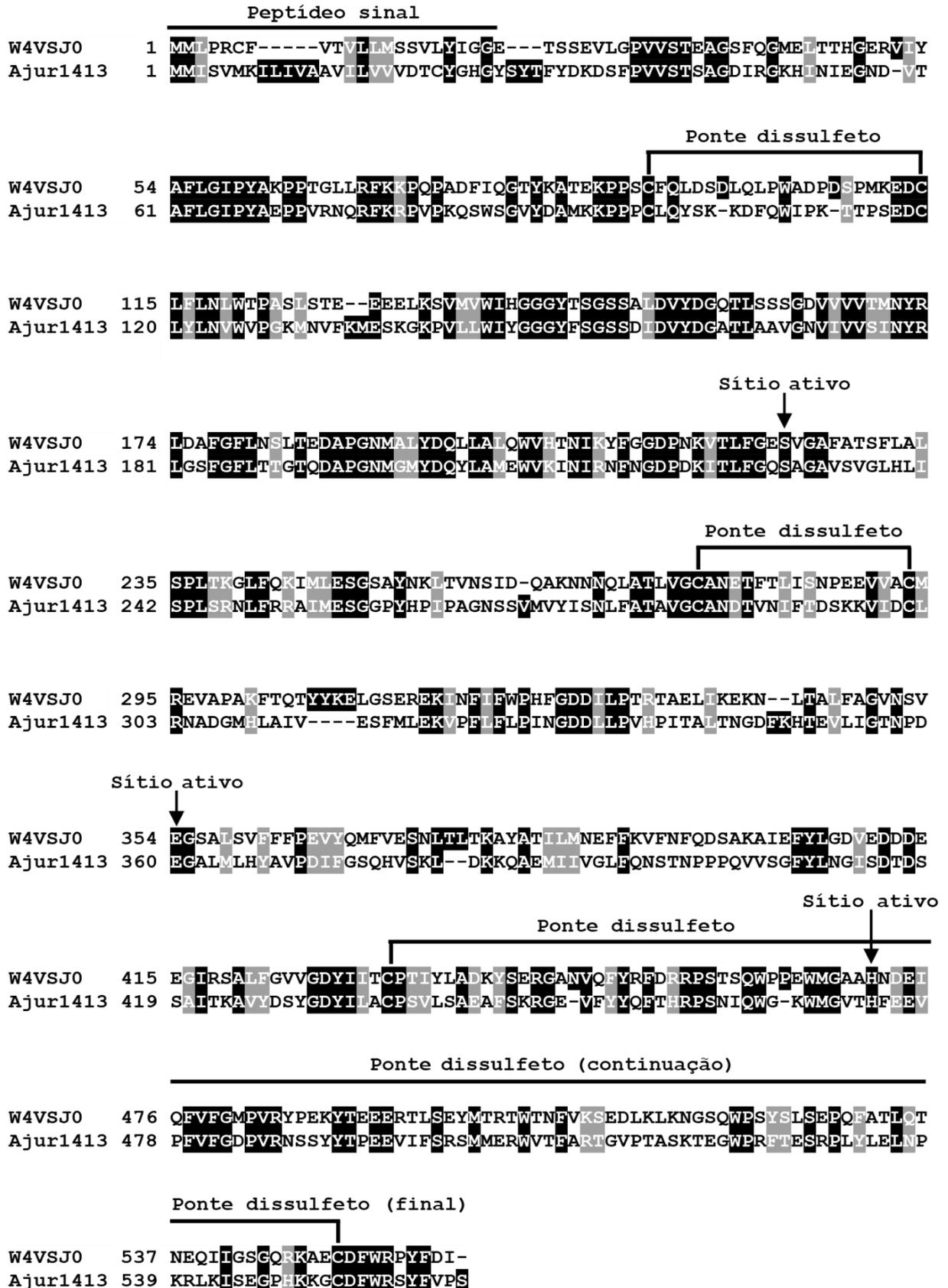


Figura 13 - Alinhamento e comparação do transcrito Ajur1413 com a acetilcolinesterase do veneno da aranha *Trittame loki* (UniProt ID: W4VSJ0). Estão indicados o peptídeo sinal, as cisteínas que formam as pontes dissulfeto e os aminoácidos localizados nos sítios ativos. Os aminoácidos conservados são 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*.

Os transcritos Ajur3310 e Ajur11434 correspondem a 19,57% da expressão gênica dentro da categoria “Componente de veneno”. Eles apresentaram similaridade com a molécula “EF-hand protein-like protein”, presente nas glândulas de veneno da aranha *Haplopelma schmidti*. A família EF-hand protein é composta por proteínas com motivos conservados de ligação ao Ca²⁺ e que possuem importantes papéis biológicos na comunicação intracelular (Junqueira-de-Azevedo et al., 2003).

A Figura 14 indica que o alinhamento dos transcritos Ajur3310 e Ajur11434 com a EF-hand protein-like protein de *H. schmidti* é praticamente total. Os autores que descreveram esta molécula propõem que ela tem papel fundamental na secreção das proteínas do veneno de *H. schmidti* (Jiang et al., 2010). Portanto, as EF-hand protein-like do transcriptoma de *A. juruensis* provavelmente não estão presentes no veneno, mas atuam na liberação das toxinas.

B5M6G5	1	MSEVLEKLRQOCRERGANGLIGLGRAFRMLDDNRDKKLNLEEMKGLQEYGADIQPSSEVESLFL
Ajur3310	1	MSEALEKLRQOCRERGANGLIGLGRAFRMLDDNRDKKLNLEEMKGLQEYGADISPSEVAALFL
Ajur11434	1	MSEALEKLRQOCRERGANGLIGLGRAFRMLDDNRDKKLNLEEMKGLQEYGADMSPEVESLFL
B5M6G5	64	KELDRDGSGLSFDEFLLRAVRPPLSQERLDMIEKAFKMDKSGDGVVNLQDLKGVYNAREHPD
Ajur3310	64	KELDRDGSGLSVSFDEFLLRAVRPPLSQERLDMIEKAFKMDKSGDGVVNLQDLKGVYNAREHPD
Ajur11434	64	KELDRDGSGLSVSFDEFLLRAVRPPLSQERLDMIEKAFKMDKSGDGVVNLQDLKGVYNAREHPD
B5M6G5	127	VIAGKKNEKQVLVEFLQNFETPNNPDGKVTQKQEFIDYYTGVSSSIDLDEYFVTMMQKAWQL
Ajur3310	127	VIAGKKNEKQVLVEFLQNFETPNNPDGKVTQKQEFIDYYTGVSSSIDLDEYFVTMMQKAWQL
Ajur11434	127	VIAGKKNEKQVLVEFLQNFETPNNPDGKVTQKQEFIDYYTGVSSSIDLDEYFVTMMQKAWQL

Figura 14 - Alinhamento e comparação dos transcritos Ajur3310 e Ajur11434 com a EF-hand protein-like protein de *Haplopelma schmidti* (UniProt ID: B5M6G5). 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 transcrito Ajur48047 apresentou similaridade com a molécula “Endothelin-converting enzyme 1” do genoma da aranha *Stegodyphus mimosarum*. Esta enzima catalisa a etapa final da biossíntese de endotelinas, que são peptídeos vasoconstritores (Brás-Silva, Leite-Moreira, 2008). No estudo realizado por de Oliveira et al. (2018) observou-se a presença de Endothelin-converting enzyme 1 no proteoma do veneno do escorpião *Tityus obscurus*, porém seu papel no envenenamento ainda não foi esclarecido.

Os transcritos Ajur8701 e Ajur10276 têm similaridade com a toxina “TCTP1-1” (Translationally-controlled tumor protein homolog) do veneno da aranha *Grammostola rosea* e correspondem a expressivos 52,9% de expressão gênica dentro da categoria “Componente de veneno”. Na Figura 15 pode-se observar que o alinhamento dos transcritos com esta toxina é completo:

M5B4R7	1	MIIFKDMITGDEMFTDSSKYKVVDDCI	LEVECRHVTRRMGDIQLEGANPSQEEADEGTDEV
Ajur8701	1	MIIFKDIITGDEMFTDSSKYKVVDDCI	FEVECRHVSRRMGDIQLEGANPSQEEADEGTDEV
Ajur10276	1	MIIFKDMITGDEMFTDSSKYKVI	DDCIFEVECRHVTRRMGDIQLEGANPSQEEADEGTDIV
M5B4R7	62	TESGLDLVLNQRLVETGFSKSDYKKNYLKTYTKALQDKWKEVGMSDSQMAEAKTKFTEAVKK	
Ajur8701	62	TESGLDLVLNQRLVETGF	TKSDYKKNYLKTYTKALQDKWKEVGMSDSQMAEAKTKFTEAVKK
Ajur10276	62	TESGLDLVLNQRLVETGFSKSDYKKNYLKTYTKALQDKWKEVGMSDSQMAEAKTKFTEAVKK	
M5B4R7	123	VLPKVGDLQFFMGESSNPDGLVALLEYRENSDGTETPVMMFFKHGLEEEKV	
Ajur8701	123	VLPKVADLQFFMGESSNPDGL	IALLEYRENSDGTETPIMMFFKHGLEEEKV
Ajur10276	123	VLPKVGDLQFFMGESSNPDGLVALLEYRENSDGTETPVMMFFKHGL	DEEKV

Figura 15 - Alinhamento e comparação dos transcritos Ajur8701 e Ajur10276 com a toxina TCTP1-1 (*Translationally-controlled tumor protein homolog*) do veneno da aranha *Grammostola rosea* (UniProt ID: M5B4R7). 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 proteínas TCTP estão envolvidas em uma ampla gama de interações moleculares com proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, carboidratos ou pequenas moléculas e já foram descritas na secreção glandular, veneno e saliva de artrópodes (Assrir et al., 2017; Gremski et al., 2014). Elas foram identificadas no transcriptoma das glândulas de veneno das aranhas *Loxosceles intermedia* (Sade et al., 2012), *Grammostola rosea* (Kimura et al., 2012) e *Scytodes thoracica* (Zobel-Thropp et al., 2014).

No veneno de *Loxosceles intermedia* as TCTP podem intensificar as cascatas inflamatórias e a resposta alérgica pela ativação de células imunes envolvidas nestes processos, contribuindo para os sinais clínicos observados após as picadas. Porém, o papel biológico das TCTP como componente do veneno de *Loxosceles* na captura de presas ainda é desconhecido (Senff-Ribeiro, 2017), assim como para as outras espécies onde estas proteínas foram identificadas.

Os transcritos Ajur23233, Ajur24070, Ajur7877, Ajur15507 e Ajur18807 possuem similaridade com inibidores enzimáticos e correspondem, juntos, a 9,78% da expressão gênica observada nas glândulas de veneno de *A. juruensis*. Acredita-se que os inibidores desempenham um importante papel na sobrevivência de animais peçonhentos através da proteção de suas toxinas proteicas da degradação por proteases de suas presas ou predadores (Ma et al., 2016).

Os demais transcritos incluídos dentro da categoria “Componente de veneno” representam, ao todo, 16,86% da expressão gênica desta categoria e apresentaram similaridades com moléculas que não têm função conhecida ou com proteínas-*like*.

4.1.2 CRISPs (Cysteine rich secretory proteins)

Três transcritos apresentaram similaridade com *cysteine rich secretory proteins* - CRISPs identificadas no transcriptoma da glândula de veneno de *G. rosea* (Tabela A. II. - Apêndice I). Apesar de não terem sido completamente montados na etapa de análise transcriptômica, os transcritos Ajur5422 e Ajur39949 se alinharam com a região de domínio da CRISP “GTx-VA1” (Figura 16). Já o transcrito Ajur5801 teve similaridade com a “GTx-CRISP1”, alinhando-se com a molécula completa (Figura 17).

		Peptídeo sinal	Domínio
M5AWW7	1	MQIRVILMLSWFWLGVSAETCPAIYLYRSREHTYCLPRKSSCTILQSGVTKSDIEIIVREH	
Ajur5422	1	-----	-----
Ajur39949	1	-----	-----
Domínio (continuação)			
M5AWW7	62	NLLRSKVAIGKETOYSMPKASNMLQMVWDDDELAAVAQKHADQCTFDHDCGDCRRVKNFGVG	
Ajur5422	1	-----VASGEEKTYSEFPKAAANMLEMVWVVELAAVAQKHSDQCVFQHDHCNECRRVKNFDVG	
Ajur39949	1	-----VWDDDELAAVAQKHASQCQFDHDCNECRRVKNFGVG	
Domínio (continuação)			
M5AWW7	123	QNLFORTSPSGQPSPTWAEAVKDWYKEIKDFQKKQIDGFIDGKGGPPQGHFTQEIWADTW	
Ajur5422	56	QNLERIV-FPDPLPPDWKAAIKAWYDEAADFDQKQIDSFQDGEPPPPTGHFTQMMWATTW	
Ajur39949	36	QNLFQROT-SVQPSOPTWAEAVVDWYSEIKDFDKAQIDGFIDGEGPPEIGHFTQEIWAETW	
Domínio (final)			
M5AWW7	184	RVGCGYSAYKKGSGFEELYTCNYGPGNLIKTRPIYEKGNPCIRCLNSCCGNNSCSGGTSYP	
Ajur5422	116	RI GCGYTHKTGKEMRGLYTCNYGPAGNVKDESIYQKGEPCSACPINSCCGKSCLNSAYP	
Ajur39949	96	RVGCGYSVYKTGSGFEELYTCNYGP-----	
M5AWW7	245	GLCRISGENAFOYKRPEGLTFYCSFNNEPDCAAT--TTGADKWEVSKTILSGSYIGIVLNGGE	
Ajur5422	177	GLCQIFDNNAPLYKTQGKPLFLCFENNEPDCARRTAGVDKWEVSRITLGSYIFGIVLNGGE	
Ajur39949		-----	
M5AWW7	282	SSTLSEFTKSEFKVPTAPLCFTSYVRTGPQVKGEKSAGIFTEIFKLPARPKSFPTVLTSSSM	
Ajur5422	215	SSTLNEFTNPFKGQ-KAMCLTSYFRKGPQKAGEEGNNAAYEILRIPDL-HFAFNSEMKSNSV	
Ajur39949		-----	
M5AWW7	343	SETKFTKKLGNMETFSSVSFSVPKGKPAQYLELTDLSARAGPC-	
Ajur5422	274	DETKLSITLNNWSPILLTIRFEVPGGACSOYLEVKNMEVREGPCS	
Ajur39949		-----	

Figura 16 - Alinhamento e comparação dos transcritos Ajur5422 e Ajur39949 com a CRISP GTx-VA1 (UniProt ID: M5AWW7) do veneno da aranha *Grammostola rosea*. Estão indicados os peptídeos sinal e o domínio da molécula. 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*.

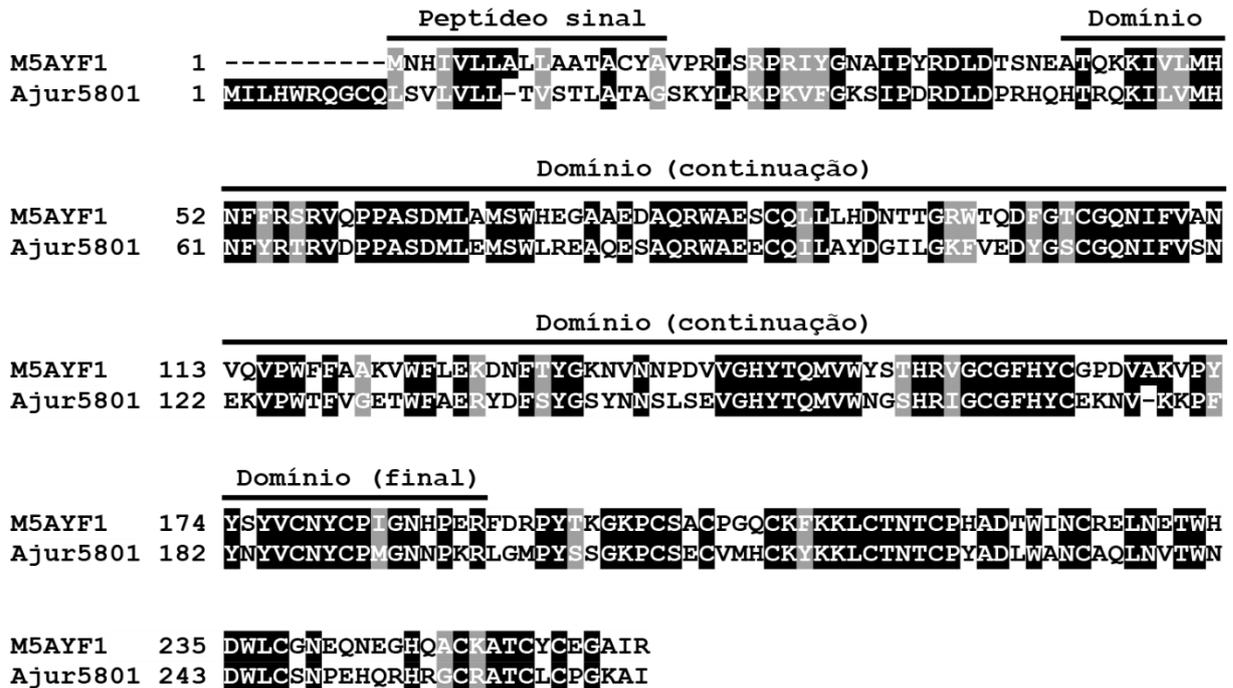


Figura 17 - Alinhamento e comparação do transcrito Ajur5801 com a CRISP GTx-CRISP1 (*UniProt* ID: M5AYF1) do veneno da aranha *Grammostola rósea*. Estão indicados o peptídeo sinal e o domínio da molécula. Os aminoácidos conservados são mostrados em preto, os que possuem o mesmo caráter químico são mostrados em cinza e os aminoácidos não conservados são mostrados em branco. O Símbolo (-) representa os *gaps*.

As CRISPs formam uma extensa família de proteínas altamente conservadas que são ricas em cisteínas. Elas compreendem três grupos principais denominados CRISP-1, CRISP-2 e CRISP-3 (Barth et al., 2018). As CRISP-1 e CRISP-2 estão envolvidas nos processos de maturação e fusão dos gametas em mamíferos e também atuam no bloqueio de canais iônicos (Cohen et al., 2011). A CRISP-3 é encontrada no plasma sanguíneo e em secreções exócrinas e acredita-se que ela possua papel na imunidade inata de humanos (Udby et al., 2002).

As CRISPs estão presentes em uma ampla variedade de organismos como mamíferos, répteis, anfíbios e até mesmo vermes, sendo que a primeira a ser descrita foi isolada do epidídimo de ratos (Kierszenbaum et al., 1981). As provenientes de venenos são encontradas principalmente em lagartos e serpentes (Kimura et al., 2012). A *Helothermine*, por exemplo, é uma CRISP isolada do veneno do lagarto *Heloderma horridum* que atua bloqueando canais de cálcio e potássio voltagem-dependentes e receptores de rianodina (Nobile et al., 1996). Já a *Ablomin* é um exemplo de CRISP encontrada no veneno da serpente *Agkistrodon blomhoffi*. No trabalho realizado por Yamazaki et al. (2002), ela se mostrou capaz de bloquear a contração do músculo liso arterial da cauda de ratos.

Com relação às CRISPs presentes em venenos de aranhas ainda há muito a ser desvendado. Em buscas realizadas no NCBI com as palavras-chave “*CRISP venom*”, por

exemplo, são obtidos 928 resultados, sendo que 281 se referem a serpentes, 82 a lagartos e 15 são provenientes de aracnídeos, sendo apenas 6 de aranhas.

A GTx-CRISP, proteína com a qual o transcrito Ajur5801 apresentou similaridade, foi uma das primeiras CRISPs identificadas no veneno de aranhas (Kimura et al., 2012). Desde então, em estudos posteriores, também observou-se a presença destas moléculas nos venenos de outras espécies como *Lycosa singoriensis* (UniProt ID: A9QQ26), *Phoneutria keyserlingi* (UniProt ID: P85860), *Trittame loki* (UniProt ID: W4VS53) (Undheim et al., 2013), *Phoneutria nigriventer* (Diniz et al., 2018) e *Lycosa tarantula* (Koua et al., 2020).

A contribuição das CRISPs para a toxicidade dos venenos, seus alvos moleculares exatos e os mecanismos de ação ainda permanecem desconhecidos em sua maioria. Porém, em estudos utilizando diferentes abordagens experimentais observou-se que as CRISPs podem causar inflamação, indução da expressão de moléculas de adesão de células endoteliais vasculares e inibição da angiogênese, indicando que essas moléculas, além de terem um papel no envenenamento, também podem ter potencial aplicação biotecnológica (Diniz et al., 2018).

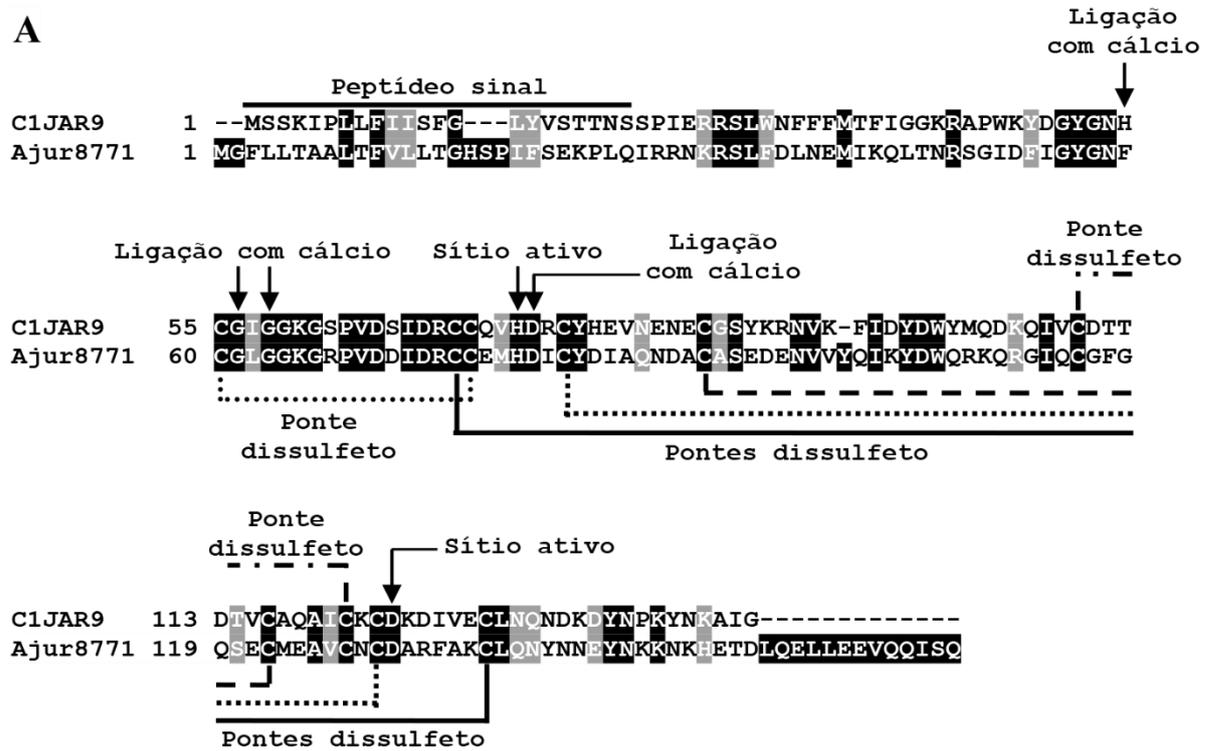
4.1.3 Fosfolipases A e D e hialuronidases

Oito dos transcritos identificados apresentaram similaridades com fosfolipases e hialuronidases (Tabela A. III. - Apêndice I), enzimas que têm a capacidade de hidrolisar diferentes substratos. Somados, eles representam 0,0408% da expressão gênica dentro das toxinas de *A. juruensis*.

Quatro transcritos (Ajur7374, Ajur7500, Ajur8771 e Ajur10234) possuem similaridade com fosfolipase A2 e dois (Ajur15997 e Ajur29642) com fosfolipase D. Dentre eles foram selecionados os mais completos e com melhor FPKM para a elaboração dos alinhamentos e, desta forma, o transcrito Ajur8771 foi alinhado com uma fosfolipase A2 do veneno da lacraia *Scolopendra viridis* (Figura 18A) e o transcrito Ajur29642 foi alinhado com uma fosfolipase D do veneno da aranha *Sicarius albospinosus* (Figura 18B).

Na Figura 18A pode-se observar que esse alinhamento é completo, ocorrendo inclusive com as cisteínas que formam pontes dissulfeto, com a maior parte dos aminoácidos que se ligam ao cálcio e com os que estão localizados nos sítios ativos. A Figura 18B indica que o alinhamento não é completo, pois provavelmente o transcrito Ajur29642 não foi totalmente montado durante a análise transcriptômica, entretanto, ele ocorre com a região de domínio da fosfolipase.

A



B

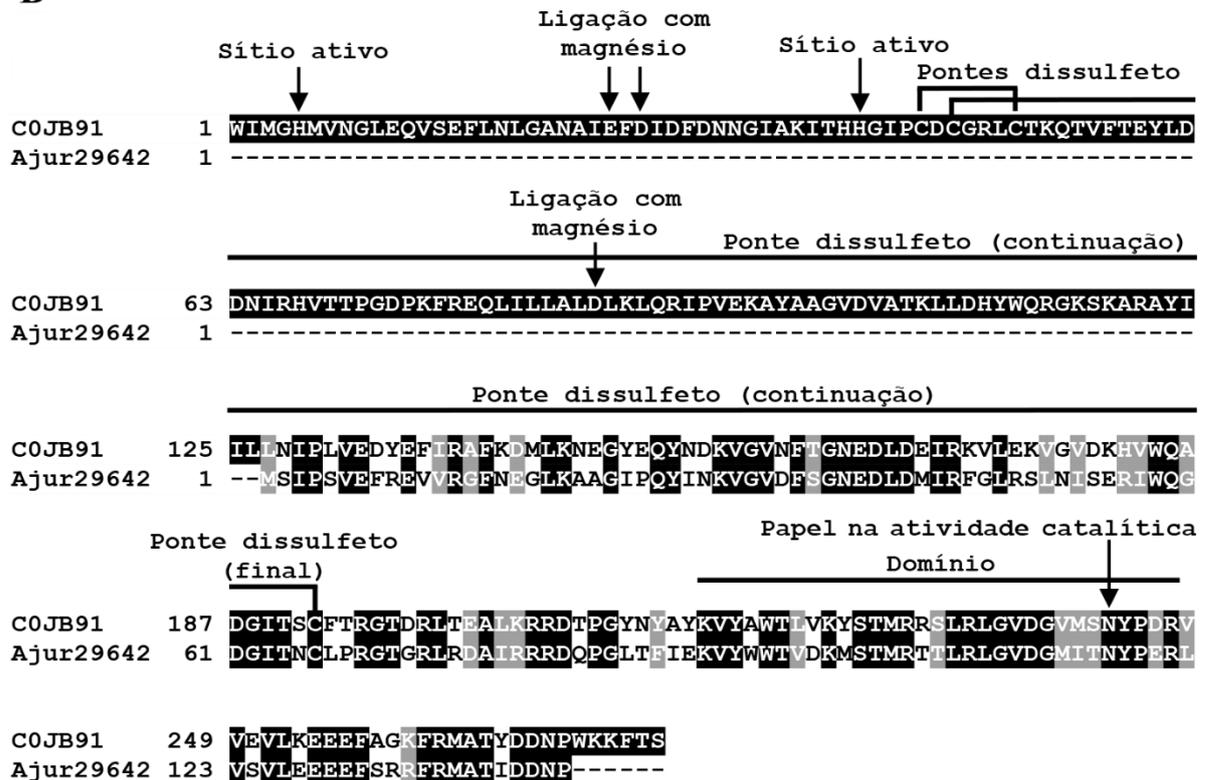


Figura 18 - Alinhamento e comparação dos transcritos Ajur8771 e Ajur29642 com fosfolipases A2 e D dos venenos da lacraia *Scolopendra viridis* e da aranha *Sicarius albospinosus*, respectivamente. Estão indicados o peptídeo sinal, a região de domínio, os aminoácidos que estão localizados nos sítios ativos e os que fazem ligação com metais, bem como as cisteínas que formam pontes dissulfeto. 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*. **A)** Alinhamento do transcrito Ajur8771 com uma fosfolipase A2 do veneno de *Scolopendra viridis* (UniProt ID: C1JAR9). **B)** Alinhamento do transcrito Ajur29642 com uma fosfolipase D do veneno de *Sicarius albospinosus* (UniProt ID: C0JB91).

Os transcritos Ajur2769 e Ajur4195 apresentaram similaridade com hialuronidases. A Figura 19 mostra o alinhamento do transcrito Ajur2769 com uma hialuronidase do veneno da aranha *Loxosceles intermedia*, nela é possível notar que todas as cisteínas que formam as pontes dissulfeto e o aminoácido localizado no sítio ativo se alinham.

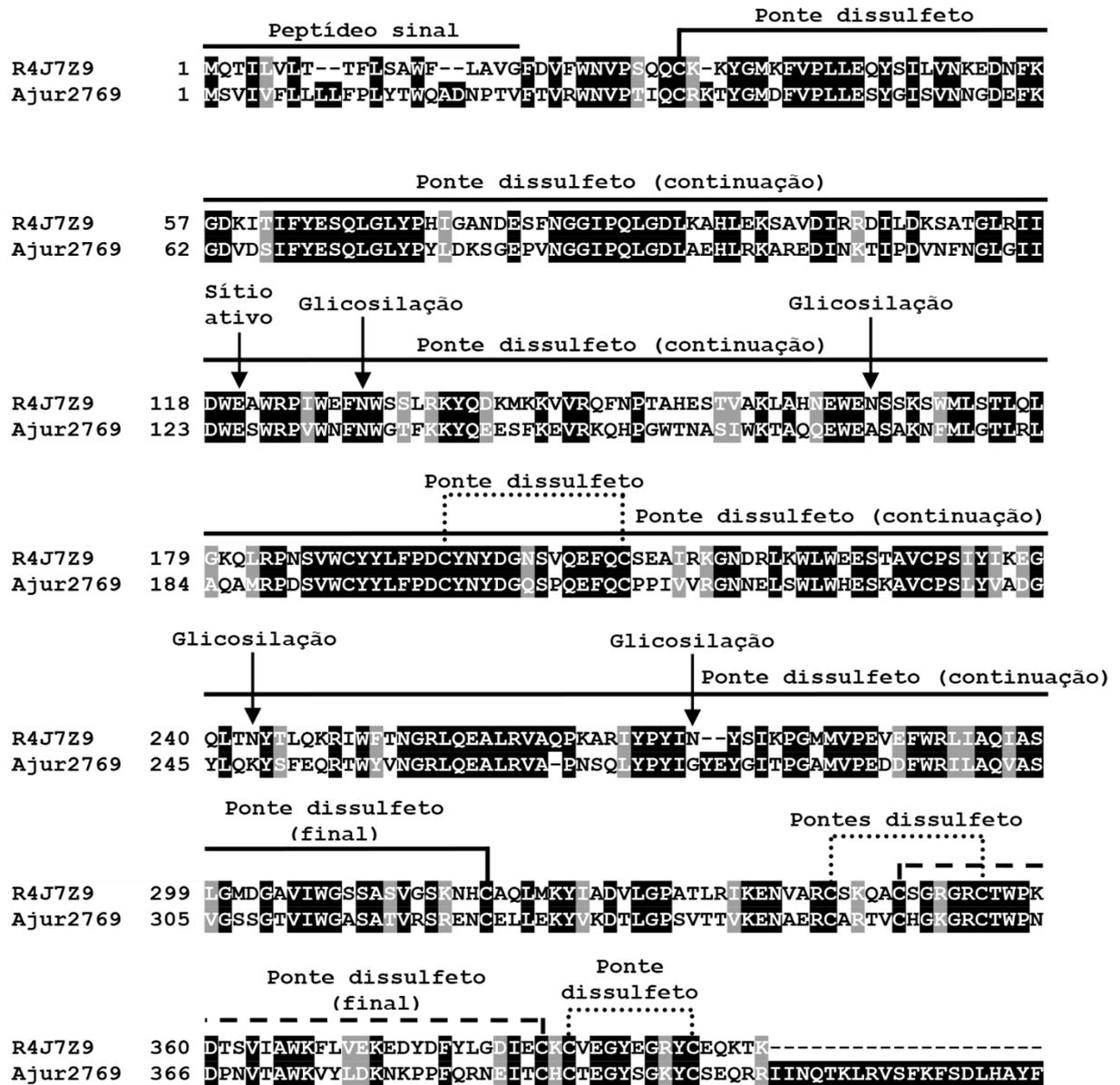


Figura 19 - Alinhamento e comparação do transcrito Ajur2769 com uma hialuronidase do veneno da aranha *Loxosceles intermedia* (UniProt ID: R4J7Z9). Estão indicados o peptídeo sinal, as asparaginas que sofrem glicosilação e o aminoácido localizado no sítio ativo, bem como as cisteínas que formam pontes dissulfeto. 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*.

As fosfolipases são enzimas lipolíticas que hidrolisam substratos fosfolipídicos em ligações éster específicas. Elas são comuns na natureza e desempenham papéis muito diversos, desde ação tóxica em venenos até a transdução de sinal, produção de mediadores lipídicos e digestão de metabólitos em humanos. As fosfolipases variam consideravelmente em estrutura, função, regulação e modo de ação e são separadas em duas categorias: as acilhidrolases, as quais agem sobre ligações éster carboxílicas, e as fosfodiesterases, que hidrolisam ligações fosfodiéster. No primeiro grupo estão as fosfolipases A2, enquanto que o segundo contém as fosfolipases D (Aloulou et al., 2018; Magalhães, 2017).

As fosfolipases A2 apresentam várias funções celulares como, por exemplo, a manutenção de fosfolipídeos, geração de prostaglandinas, tradução de sinais e contração muscular (Santos-Filho, 2009). Elas ocorrem no veneno de animais vertebrados e invertebrados e podem estar entre os componentes mais abundantes, especialmente em venenos de serpentes (González-Morales et al., 2009). No estudo realizado com a serpente *Bungarus sindanus*, por exemplo, observou-se que as fosfolipases A2 são o segundo componente mais abundante em seu veneno, correspondendo a 32,59% do total de proteínas (Oh et al., 2019).

As fosfolipases A2 de venenos podem ter efeitos mionecrótico, neurotóxico, cardiotoxico, anticoagulante e também podem induzir a formação de edema (Santos-Filho, 2009). No trabalho realizado por Magalhães (2017) foram isoladas duas fosfolipases A2 no veneno do escorpião *Hadrurus gerstchi*, ambas demonstraram importante atividade edematogênica e hemolítica sobre eritrócitos humanos.

Com relação às fosfolipases D, historicamente elas foram descobertas em plantas cujos extratos possuíam uma importante atividade catalítica. Em humanos e na maioria dos mamíferos elas parecem ter um importante papel na sinalização celular (Aloulou et al., 2018). Elas são as enzimas mais estudadas em venenos de aranhas e são consideradas as toxinas dermonecroticas mais potentes destes venenos. Além da dermonecrose, elas exibem várias outras atividades patológicas como agregação plaquetária, hemólise, imunogenicidade, nefrotoxicidade, edema, atividades neurotóxicas e inseticidas (Masood et al., 2018).

Com base em sua estrutura primária e terciária, as fosfolipases D de venenos de aranhas foram agrupados em duas classes. As de classe I contêm três resíduos de cisteína que formam uma ponte de dissulfeto, também têm uma extensão com os cinco aminoácidos YLPSL organizados em um loop flexível. As de classe II apresentam quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto, uma das quais conecta a alça catalítica à alça flexível, diminuindo o volume da cavidade do sítio ativo. Estas, por sua vez, foram subdivididas nas

classes IIa e IIb, baseando-se na afinidade em relação à esfingomielina como substrato. A primeira classe é capaz de hidrolisar a esfingomielina, enquanto a segunda é desprovida dessa propriedade (Masood et al., 2018). Os transcritos obtidos do transcriptoma de *A. juruensis* apresentaram similaridade com uma fosfolipase D IIb e, provavelmente, também são desprovidos da capacidade de hidrolisar a esfingomielina.

As hialuronidases são outro tipo bem conservado de enzimas hidrolíticas, sendo sintetizadas por vários organismos, desde unicelulares até vertebrados. Elas catalisam preferencialmente a hidrólise do ácido hialurônico, um dos principais constituintes da matriz extracelular presente nos tecidos conjuntivos. Esta ação aumenta a permeabilidade, reduz a viscosidade e torna os tecidos mais facilmente permeáveis às toxinas presentes no veneno e são, portanto, conhecidas como um fator de espalhamento (Barth et al., 2018; Pessini et al., 2001).

Embora as hialuronidases tenham sido descritas em vários venenos incluindo serpentes, escorpiões, aranhas, abelhas, lagartas, vespas, moluscos e peixes, a caracterização bioquímica e biológica dessas enzimas é restrita a algumas espécies como *Naja naja* (Girish, Kemparaju, 2005), *Apis mellifera* (Marković-Housley et al., 2000) e *Tityus serrulatus* (Horta et al., 2014).

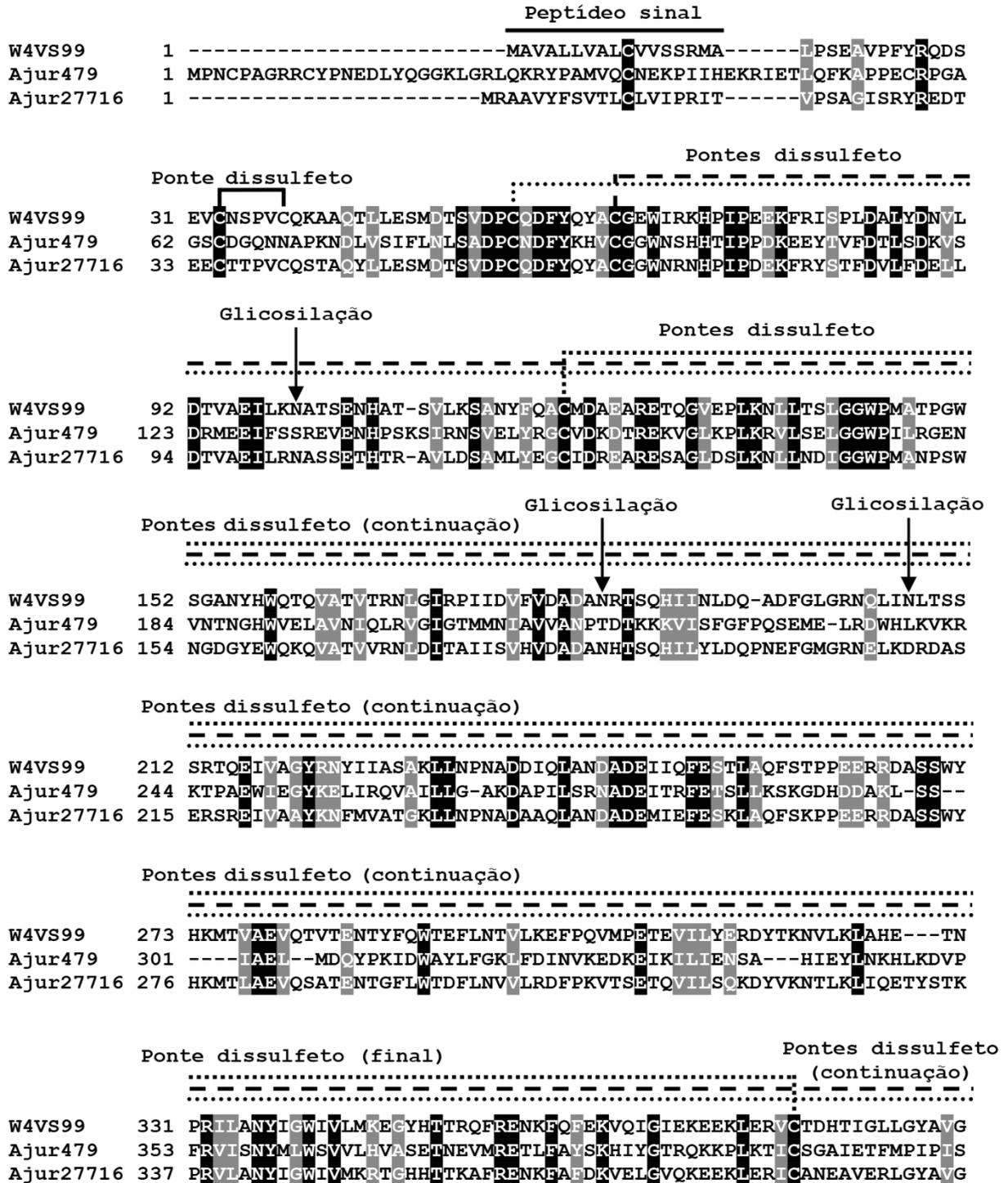
As hialuronidases foram a primeira classe de enzimas encontradas no veneno de aranhas (Kaiser, 1953). Desde então, elas foram descritas em espécies de diversas famílias como Lycosidae, Ctenidae, Scicariidae, Theridiidae e Theraphosidae (Barth et al., 2018). Em estudo realizado por Sutti et al. (2014), por exemplo, foi caracterizada uma hialuronidase no veneno da espécie *Vitalius dubius*. Barth et al. (2018) isolaram do veneno da aranha *Acanthoscurria natalensis* um complexo de proteínas formado por hialuronidase e CRISP. Rodríguez-Rios et al. (2017) forneceram evidências da presença de hialuronidases nos venenos de 13 aranhas terafosídeas e, segundo os autores, estas evidências apoiam a ideia de que a hialuronidase é um componente necessário para um processo de envenenamento eficaz.

Sendo assim, o presente estudo realizado com a espécie *A. juruensis* vem a contribuir para o entendimento da importância das hialuronidases no veneno de aranhas terafosídeas.

4.1.4 Neprilisinase

Os transcritos Ajur479, Ajur2049 e Ajur27716 têm similaridade com “*Neprilysin-1*” do veneno da aranha *Trittame loki* (Tabela A. IV. - Apêndice I). Ajur479 e Ajur27716 foram completamente sequenciados e se alinham à toda neprilisinase, tal alinhamento ocorre com

todos os resíduos localizados nos sítios ativos e com a maioria das cisteínas que formam pontes dissulfeto e dos aminoácidos que se ligam ao zinco (Figura 20).



Continua na página 69.

Continuação da Figura 20.

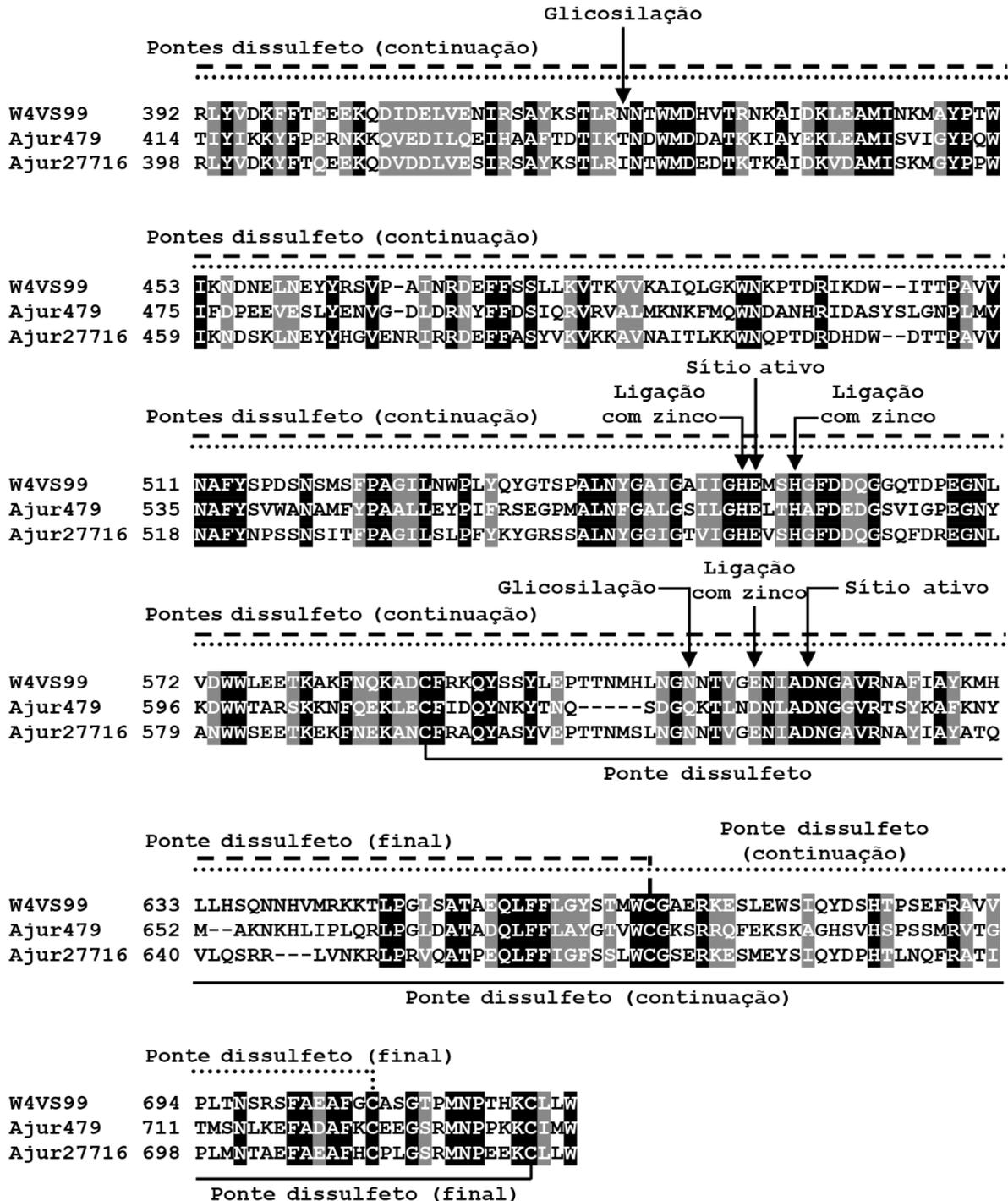


Figura 20 - Alinhamento e comparação dos transcritos Ajur479 e Ajur27716 com uma neprilisina do veneno da aranha *Trittame loki* (UniProt ID: W4VS99). Estão indicados o peptídeo sinal, as asparaginas que sofrem glicosilação, as cisteínas que formam pontes dissulfeto, os aminoácidos localizados nos sítios ativos e os que se ligam ao zinco. 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.

As neprilisinases são metaloenzimas de membrana do tipo II compostas por, aproximadamente, 750 resíduos de aminoácidos (~110 kDa), possuem um sítio ativo contendo um motivo de ligação ao zinco (HEXXH) e apresentam especificidade dirigida à clivagem no lado amino dos resíduos hidrofóbicos (El-Amouri et al., 2008; Quay et al., 1994).

Nos mamíferos, as neprilisinases são abundantes nos rins, intestino, placenta e plexo coroide, sendo também encontrada nas células reticulares do sistema imune e no sistema reprodutivo (Nalivaeva et al., 2013). Estas enzimas apresentam papel importante na inativação de peptídeos de sinalização envolvidos na atividade neuronal moduladora, pressão arterial e sistema imunológico (Bland et al., 2008).

Undheim et al. (2013) foram os primeiros a identificar a presença de neprilisinases em veneno de aranha. Em estudo elaborado com a espécie *Trittame loki*, os autores sugerem que estas enzimas podem estar envolvidas na degradação da matriz extracelular ao redor das sinapses, facilitando o acesso das demais toxinas do veneno. No trabalho realizado por nosso grupo foi observado que a neprilisinase de *A. juruensis* possui atividade proteolítica sobre a caseína, comprovando que esta enzima tem a capacidade de degradar substratos, facilitando, assim, o espalhamento do veneno (Nascimento et al., 2021) (ANEXO A - Artigo publicado na revista *Toxin Reviews*). A neprilisinase caracterizada neste trabalho corresponde ao transcrito Ajur27716, o qual foi nomeado *Ajur_Nepriysin*, e foi observado que o mesmo possui 6 isoformas.

Visto estes fatos, a presença de fosfolipases, hialuronidases e neprilisinases no veneno de *A. juruensis* pode indicar que as toxinas nele presentes provavelmente atingem seus alvos com rapidez, considerando que estas enzimas são capazes de hidrolisar tecidos.

4.1.5 Terafotoxinas

Após as análises feitas utilizando-se a ferramenta BLASTp observou-se que as terafotoxinas são o tipo de toxina mais abundantemente identificado no transcriptoma de *A. juruensis*, com um total de 155, possuindo também a maior porcentagem de expressão gênica. A Tabela 2, a seguir, mostra os dados obtidos e a Tabela A. V. (Apêndice I) indica os resultados com mais detalhes.

Tabela 2 - Toxinas com as quais os transcritos da categoria “Terafotoxina” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp. A Tabela mostra a quantidade de transcritos que apresentaram similaridade com uma mesma terafotoxina e as porcentagens de expressão gênica se referem ao conjunto dos transcritos que possuem similaridade com uma mesma classe de toxina.

Classe de terafotoxina	Terafotoxina	Transcritos com similaridade	Expressão gênica dentro da categoria
δ -theraphotoxin	δ -theraphotoxin-Hm1a	7	0,0048%
κ -theraphotoxin	HW11c117 toxin	1	2,3207%
	HW11c57 toxin	1	
	κ -theraphotoxin-Cg1a	4	
	κ -theraphotoxin-Cg1b	1	
	κ -theraphotoxin-Gr1c	4	
	κ -theraphotoxin-Gr1d	2	
	ω -theraphotoxin	ω -theraphotoxin-Bs2a	
ω -theraphotoxin-Hhn1c		1	
ω -theraphotoxin-Hhn1d		1	
ω -theraphotoxin-Hhn1f 2		2	
ω -theraphotoxin-Hhn1f 3		3	
π -theraphotoxin	Asic1a Blocker Pctx1	1	0,0528%
τ -theraphotoxin	τ -theraphotoxin-Gr1b	1	0,2146%
U-theraphotoxin	U1-theraphotoxin-Ap1a	1	96,4228%
	U1-theraphotoxin-Ct1a	6	
	U1-theraphotoxin-Gr1a	6	
	U1-theraphotoxin-Gr1b	29	
	U1-theraphotoxin-Pc1a	7	
	U2-theraphotoxin-Cg1b 1	2	
	U2-theraphotoxin-Cg1b 2	2	
	U2-theraphotoxin-Pc1a	1	
	U3-theraphotoxin-Cg1b	8	
	U3-theraphotoxin-Gr1b	2	
	U3-theraphotoxin-Gr1d	1	
	U3-theraphotoxin-Pm1a	6	
	U4-theraphotoxin-Pf15	1	
	U5-theraphotoxin-Cg1a	2	
	U5-theraphotoxin-Gr1d	2	
	U5-theraphotoxin-Gr1e	1	
	U5-theraphotoxin-Hhn1a	2	
	U6-theraphotoxin-Hhn1a 1	1	
	U7-theraphotoxin-Gr1a	2	

δ : Delta; κ : Kappa; ω : Ômega; π : Pi; τ : Tau; U: *unknown*

Continua na página 72.

Continuação da Tabela 2.

Classe de terafotoxina	Terafotoxina	Transcritos com similaridade	Expressão gênica dentro da categoria
U- <i>theraphotoxin</i>	U7- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b	1	
	U7- <i>theraphotoxin</i> -Hs3a L8	2	
	U10- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a	1	
	U10- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1a	1	
	U10- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1a.2	1	
	U10- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1c	1	
	U11- <i>theraphotoxin</i> -Hs2a	5	
	U12- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1a	5	
	U13- <i>theraphotoxin</i> -Hs1a	3	
	U14- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1a	2	
	U14- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1f	2	
	U14- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1g	9	
	U20- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a	3	
	U22- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a	3	
	U26- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a	1	
	U29- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a	1	
	U35- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a	1	
	U36- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a	1	

δ: Delta; κ: Kappa; ω: Ômega; π: Pi; τ: Tau; U: *unknown*

Como o próprio nome sugere, as terafotoxinas são toxinas encontradas no veneno de aranhas da família Theraphosidae. Elas podem atuar em uma grande variedade de alvos moleculares sendo que a maioria possui modo de ação neurotóxico (Herzig, King, 2013).

De acordo com a nomenclatura proposta por King et al. (2008), as toxinas de aranhas e de outros animais venenosos podem ser nomeadas de acordo com sua atividade biológica. Sendo assim, as toxinas Delta (δ) atrasam a inativação de canais de sódio voltagem-dependentes - Nav; as toxinas Kappa (κ) inibem canais de potássio ativados por voltagem - Kv; toxinas Ômega (ω) inibem canais de cálcio dependentes de voltagem - Cav; toxinas Pi (π) têm como alvo os canais iônicos sensíveis à ácidos - ASICs; toxinas Tau (τ) têm como alvo os canais receptores de potencial transitório; e, por fim, U toxinas, em sua maioria, têm atividade desconhecida (*Unknown-theraphotoxin*).

Assim, das 155 terafotoxinas identificadas no transcriptoma de *A. juruensis* 30 delas apresentaram similaridade com toxinas que tiveram sua atividade biológica elucidada. Os

outros 125 transcritos correspondem à maior parte da expressão gênica dentro das terafotoxinas (96,42%), porém, não é possível presumir suas prováveis funções, já que eles têm similaridade com U-terafotoxinas.

Rokyta e Ward (2017) estudaram o escorpião *Hadrurus spadix* e também observaram uma grande quantidade de proteínas que não possuem sua função caracterizada. Elas representam 20,6% do total de componentes do veneno das fêmeas e 28,1% do veneno dos machos. No trabalho realizado com o escorpião da espécie *Megacormus gertschi* os resultados mostraram que mais de 50% de seu veneno é constituído por moléculas de função desconhecida (Santibáñez-López et al., 2017). Oldrati et al. (2017) investigaram quatro espécies de aranhas e concluíram que as toxinas não caracterizadas representam 34%, 41%, 45% e 36% do conteúdo dos venenos de *Heteropoda davidbowie*, *Poecilotheria formosa*, *Viridasius fasciatus* e *Latrodectus mactans*, respectivamente. Esses dados mostram que o crescente aumento das pesquisas que identificam os componentes de veneno animais não foi acompanhado por estudos que determinam a função destas toxinas.

No trabalho realizado por nosso grupo foram descritos 3 peptídeos antimicrobianos no veneno de *A. juruensis*, os quais correspondem aos transcritos Ajur18923, Ajur17940 e Ajur41161 (Nascimento et al., 2022) (ANEXO A - Artigo no preprint *bioRxiv*). Estes apresentaram similaridade com U-terafotoxinas U5-*theraphotoxin*-Cg1a, U1-*theraphotoxin*-Gr1a e U3-*theraphotoxin*-Cg1b, respectivamente. A primeira delas não possui função conhecida, enquanto que as outras duas são prováveis inibidoras de canal iônico. Considerando que elas têm similaridade com os peptídeos de *A. juruensis*, estas toxinas podem também possuir atividade antimicrobiana.

Tendo em vista que as U-terafotoxinas foram os componentes identificados em maior quantidade no veneno da espécie estudada elas foram melhor analisadas e os resultados obtidos serão discutidos mais adiante.

4.2 Análise proteômica do veneno de *Avicularia juruensis*

De acordo com Sabatier et al. (2013), análises proteômicas combinadas a estudos transcriptômicos fornecem informações mais precisas sobre a identidade dos componentes de peçonhas. Sendo assim, com o objetivo de confirmar a presença das toxinas identificadas através da análise transcriptômica das glândulas, o veneno bruto de *A. juruensis* foi submetido à análise por espectrometria de massas. Como citado anteriormente na metodologia (item 3.3.3.1), três bancos de dados diferentes foram montados com os transcritos e estes foram

usados como referência na análise bioinformática. Os resultados adquiridos podem ser consultados na Tabela 3, a seguir:

Tabela 3 - Resultados obtidos na análise por espectrometria de massas do veneno da espécie *Avicularia juruensis*. Estão indicadas as quantidades de proteínas identificadas para cada categoria, dentro de cada banco de dados empregado.

Banco de dados	Categoria identificada	Quantidade de proteínas identificadas
<i>Best candidates</i>	CRISP	1
	Hialuronidase	1
	Molécula de função celular	4
	Não significativo	9
	Neprilisina	1
	Terafotoxina	53
	Total: 69	
<i>Uniprot toxins</i>	CRISP	1
	Hialuronidase	1
	Molécula de função celular	16
	Não significativo	13
	Neprilisina	2
	Terafotoxina	52
	<i>Unknown</i>	3
Total: 88		
Transcriptoma anotado	CRISP	1
	Hialuronidase	1
	Neprilisina	2
	Terafotoxina	77
Total: 81		

Assim como foi observado para o transcriptoma, a maior parte das toxinas identificadas na análise por espectrometria de massas são terafotoxinas. Esse resultado sugere que o veneno de *A. juruensis* tem forte atividade neurotóxica, visto que grande parte das terafotoxinas possui esse modo de ação (Herzig, King, 2013).

Os resultados confirmam que os transcritos que possuem similaridade com CRISP, hialuronidase e neprilisinase estão realmente presentes no veneno. Também é possível observar algumas proteínas classificadas como “Não significativo”, elas se referem a transcritos que não foram completamente montados na análise transcriptômica e que não se alinham com regiões ativas de toxinas.

Dentro dos bancos de dados “*Best candidates*” e “*UniProt toxins*” foram identificadas proteínas que possuem funções celulares. Isto pode ser resultado de alguma injúria sofrida pelo animal durante a extração do veneno e, desta forma, o mesmo pode ter sido contaminado por componentes celulares. Outra hipótese está relacionada ao modo como o veneno de aranhas é produzido e liberado, que pode ocorrer por secreção apócrina, com destruição parcial das células epiteliais secretoras, ou holócrina, com destruição total destas células, sendo, portanto, possível encontrar compostos intracelulares no veneno (Silva et al., 2008).

Apenas no banco de dados “*Transcriptoma anotado*” não foram identificadas proteínas das categorias “Não significativo” e “Molécula de função celular”, isso porque durante a montagem desse banco os transcritos foram minuciosamente analisados e apenas as toxinas foram consideradas.

Com os resultados adquiridos para cada banco de dados foi gerado o diagrama de Venn, que está representado na Figura 21, a seguir:

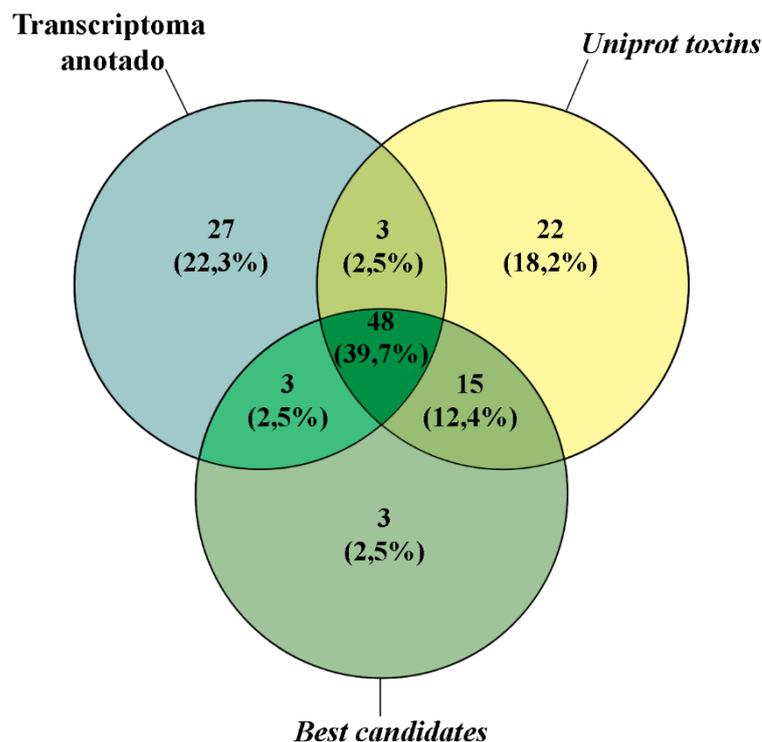


Figura 21 - Diagrama de Venn representando a sobreposição das toxinas em comum identificadas utilizando-se os bancos de dados *Transcriptoma anotado*, *UniProt toxins* e *Best candidates*. Tais toxinas foram detectadas através da análise por espectrometria de massas do veneno da aranha *Avicularia juruensis*.

Considerando os resultados obtidos com os três bancos de dados, ao todo, foram identificadas 121 toxinas. Em trabalho realizado com o veneno do escorpião *Hadrurus spadix*, Rokyta e Ward (2017) identificaram 79 proteínas no proteoma e 69 transcritos com

homologia com outras toxinas. Santibáñez-López et al. (2017) estudaram o escorpião *Megacormus gertschi* e obtiveram 30 toxinas por espectrometria de massas e 182 transcritos anotados. Esses resultados são diferentes dos observados para *A. juruensis*, porém, comparando-se com estudos feitos com venenos de aranhas os números são mais parecidos: combinando as técnicas de transcriptoma e espectrometria de massas, Diniz et al. (2018) observaram 176 proteínas para *Phoneutria nigriventer*. Utilizando as mesmas metodologias, Abreu (2015) identificou 188 toxinas no veneno de *Acanthoscurria gomesiana*.

Tendo em vista que a espectrometria de massas foi feita com amostras de veneno obtidas de animais que foram mantidos em biotério sob condições controladas, o número de toxinas identificadas para *A. juruensis* pode vir a aumentar caso sejam realizadas novas análises com venenos extraídos de aranhas submetidas à diferentes condições ambientais e à diferentes dietas.

Levando em consideração apenas as toxinas identificadas em comum utilizando-se os três bancos de dados temos um total de 48 (Figura 21, acima). A Tabela 4 mostra quais são os transcritos referentes a estas toxinas e indica que, mais uma vez, as terafotoxinas foram as moléculas em maior número.

Tabela 4 - Transcritos referentes a toxinas identificadas em comum nos bancos de dados Transcriptoma anotado, *UniProt toxins* e *Best candidates* através da análise por espectrometria de massas do veneno da aranha *Avicularia juruensis*. São mostradas a cobertura de identificação em porcentagem, a quantidade de peptídeos detectados que se encaixam na sequência do transcrito, a quantidade de peptídeos únicos que se encaixam exclusivamente na sequência do transcrito e a toxina com a qual o transcrito possui homologia.

Transcrito	Cobertura	Peptídeos identificados	Peptídeos únicos	Toxina
Ajur436	47%	8	0	U1-theraphotoxin-Gr1b
Ajur2402	68%	9	0	U1-theraphotoxin-Gr1b
Ajur2769	5%	1	1	Hialuronidase
Ajur3183	17%	1	1	U12-theraphotoxin-Hhn1a
Ajur3532	17%	1	1	U12-theraphotoxin-Hhn1a
Ajur4373	52%	6	5	U14-theraphotoxin-Hhn1a
Ajur4639	16%	1	1	U12-theraphotoxin-Hhn1a
Ajur5230	19%	1	1	U12-theraphotoxin-Hhn1a
Ajur5563	14%	1	1	U12-theraphotoxin-Hhn1a
Ajur7184	19%	2	2	δ -theraphotoxin-Hm1a
Ajur7876	15%	8	4	U1-theraphotoxin-Ct1a
Ajur8804	19%	1	1	U20-theraphotoxin-Cg1a

δ : Delta; κ : Kappa; ω : Ômega; τ : Tau; U: *unknown*

Continua na página 77.

Continuação da Tabela 4.

Transcrito	Cobertura	Peptídeos identificados	Peptídeos únicos	Toxina
Ajur9199	26%	5	1	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur9780	14%	2	2	δ - <i>theraphotoxin</i> -Hm1a
Ajur10070	15%	1	1	κ - <i>theraphotoxin</i> -Gr1c
Ajur10186	29%	1	1	U1- <i>theraphotoxin</i> -Pc1a
Ajur10187	67%	4	4	U36- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a
Ajur11007	16%	2	2	κ - <i>theraphotoxin</i> -Gr1d
Ajur11058	19%	1	1	U20- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a
Ajur11407	20%	1	1	U10- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1a
Ajur11781	30%	3	3	U29- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a
Ajur12145	11%	1	1	U22- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a
Ajur12146	24%	1	1	U14- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1g
Ajur12176	38%	4	4	U7- <i>theraphotoxin</i> -Hs3a L8
Ajur12373	48%	10	0	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur12428	73%	9	1	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur12532	33%	5	5	τ - <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur12559	29%	1	1	U1- <i>theraphotoxin</i> -Pc1a
Ajur12670	15%	9	4	U1- <i>theraphotoxin</i> -Ct1a
Ajur14901	13%	1	1	Chain A, Asic1a Blocker Pctx1
Ajur16243	41%	3	3	U5- <i>theraphotoxin</i> -Gr1d
Ajur17429	11%	1	1	κ - <i>theraphotoxin</i> -Cg1a
Ajur17662	70%	18	0	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur18214	54%	10	0	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur19486	10%	1	1	U14- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1a
Ajur20541	68%	11	4	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur23484	50%	4	0	U14- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1g
Ajur33665	45%	12	0	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1a
Ajur33666	45%	11	0	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur35757	36%	6	0	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur36128	36%	10	1	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur39949	55%	4	4	CRISP
Ajur40422	12%	1	1	ω - <i>theraphotoxin</i> -Hhn1f 2
Ajur41160	19%	2	1	U3- <i>theraphotoxin</i> -Cg1b
Ajur42786	49%	9	0	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur43330	73%	15	0	U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b
Ajur54299	67%	13	0	U5- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1a
Ajur56021	62%	16	0	U6- <i>theraphotoxin</i> -Hhn1a 1

δ : Delta; κ : Kappa; ω : Ômega; τ : Tau; U: *unknown*

Entre os transcritos que foram identificados em todos os bancos de dados destaca-se o Ajur56021, ele possui o maior FPKM, ou seja, é a toxina mais expressa pelas células da glândula, e os resultados do proteoma confirmaram a sua presença no veneno. A Figura 22 mostra a análise realizada no *software* PEAKS 8.5, indicando que foram detectados vários fragmentos peptídicos correspondentes a este transcrito.

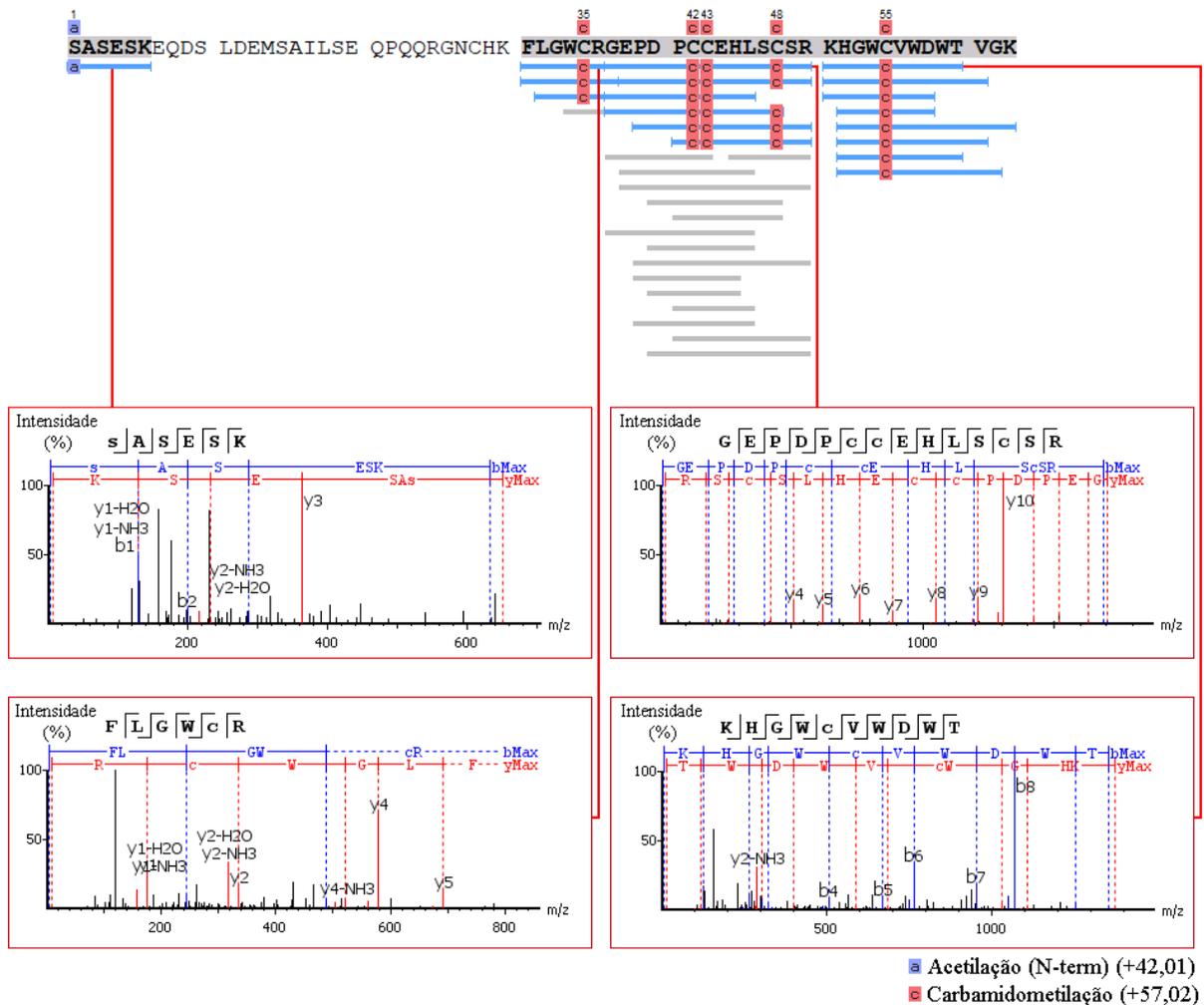


Figura 22 - Resultado obtido na análise por espectrometria de massas do transcrito Ajur56021, identificado no transcriptoma das glândulas de veneno e no proteoma do veneno da aranha *Avicularia juruensis*. Os dados foram processados no *software* PEAKS 8.5 (*Bioinformatics Solutions*). Este transcrito é o mais expresso pelas células da glândula de veneno e, através da espectrometria de massas, sua presença foi confirmada no veneno. Os fragmentos peptídicos identificados estão destacados pelo sombreado em cinza e pelas barras azuis, os espectros indicando a deconvolução dos íons destes fragmentos são mostrados dentro dos retângulos A carbamidometilação das cisteínas (modificação pós-traducional fixa) está indicada com quadrados cor-de-rosa e a acetilação dos N-terminais (modificação pós-traducional variável) está indicada com quadrados roxos.

O transcrito Ajur56021 apresentou homologia com a toxina “U6-*theraphotoxin*-Hhn1a 1” (*UniProt* ID: D2Y2C1), do veneno de *Haplopelma hainanum*. A Figura 23 mostra o alinhamento do transcrito com esta toxina, bem como com outras toxinas de aranhas do gênero *Avicularia* com as quais o transcrito também possui similaridade. Nesta Figura pode-se observar que a região do peptídeo ativo e as cisteínas que formam pontes dissulfeto se alinham perfeitamente.

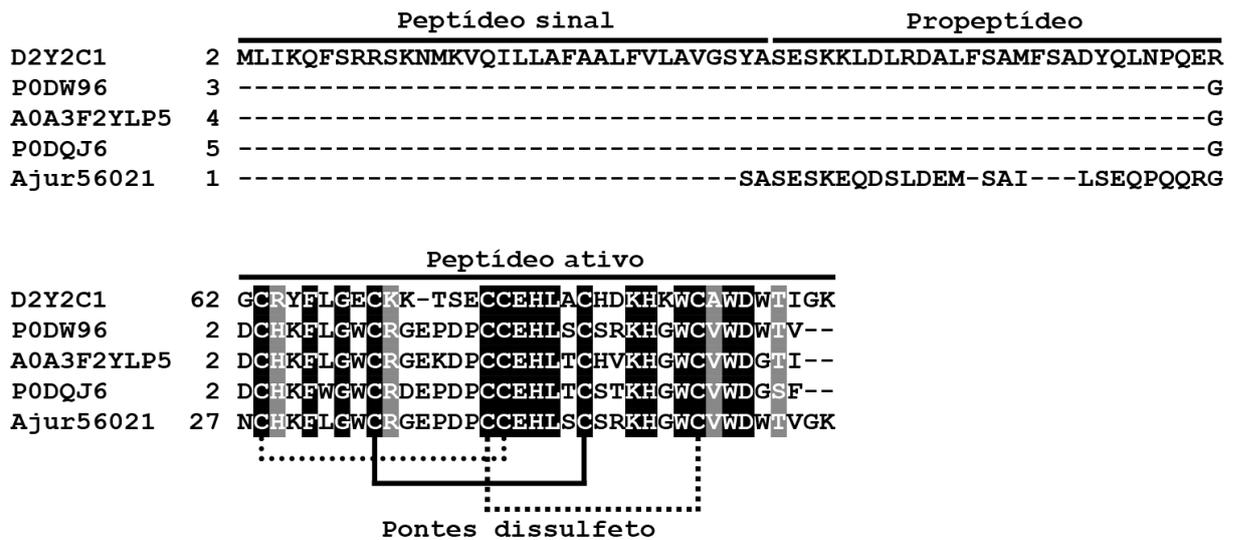


Figura 23 - Alinhamento e comparação do transcrito Ajur56021 com a U6-*theraphotoxin*-Hhn1a 1 do veneno da aranha *Haplopelma hainanum* (*UniProt* ID: D2Y2C1), Ômega-*theraphotoxin*-Avsp1a de *Avicularia* sp. (*UniProt* ID: P0DW96), Kappa-*theraphotoxin*-Aa1a de *Avicularia aurantiaca* (*UniProt* ID: A0A3F2YLP5) e Mu/kappa-*theraphotoxin*-Ap1a de *Avicularia purpurea* (*UniProt* ID: P0DQJ6). Estão indicados o peptídeo sinal, o propeptídeo e o peptídeo ativo, bem como as cisteínas que formam as pontes dissulfeto. 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*.

A função descrita para a U6-*theraphotoxin*-Hhn1a 1 é a de inibidora de canais iônicos (Tang et al., 2010), Ômega-*theraphotoxin*-Avsp1a atua como modulador alostérico de Cav (Herzig et al., 2022), Kappa-*theraphotoxin*-Aa1a é inibidora seletiva de K_v e Mu/kappa-*theraphotoxin*-Ap1a inibe K_v e Nav (Ma et al., 2018). Assim, tendo em vista a similaridade com estas toxinas, é possível inferir que o transcrito Ajur56021 provavelmente também atue sobre canais iônicos. Novos estudos devem ser feitos para confirmar esta hipótese.

4.3 Árvore filogenética ilustrativa

Considerando os resultados descritos até aqui foi observado que as U-terafotoxinas são as toxinas mais abundantes do veneno de *A. juruensis*. Sendo assim, para melhor caracterizá-las, foi construída uma árvore filogenética ilustrativa seguindo a metodologia descrita no item 3.7, a mesma está representada na Figura 24, a seguir. As Figuras subsequentes (25 a 33) mostram os alinhamentos realizados com as toxinas que foram agrupadas num mesmo ramo desta árvore.

Os ramos que possuem U-terafotoxinas de *A. juruensis* foram separados em subgrupos e os mesmos serão discutidos mais detalhadamente adiante.

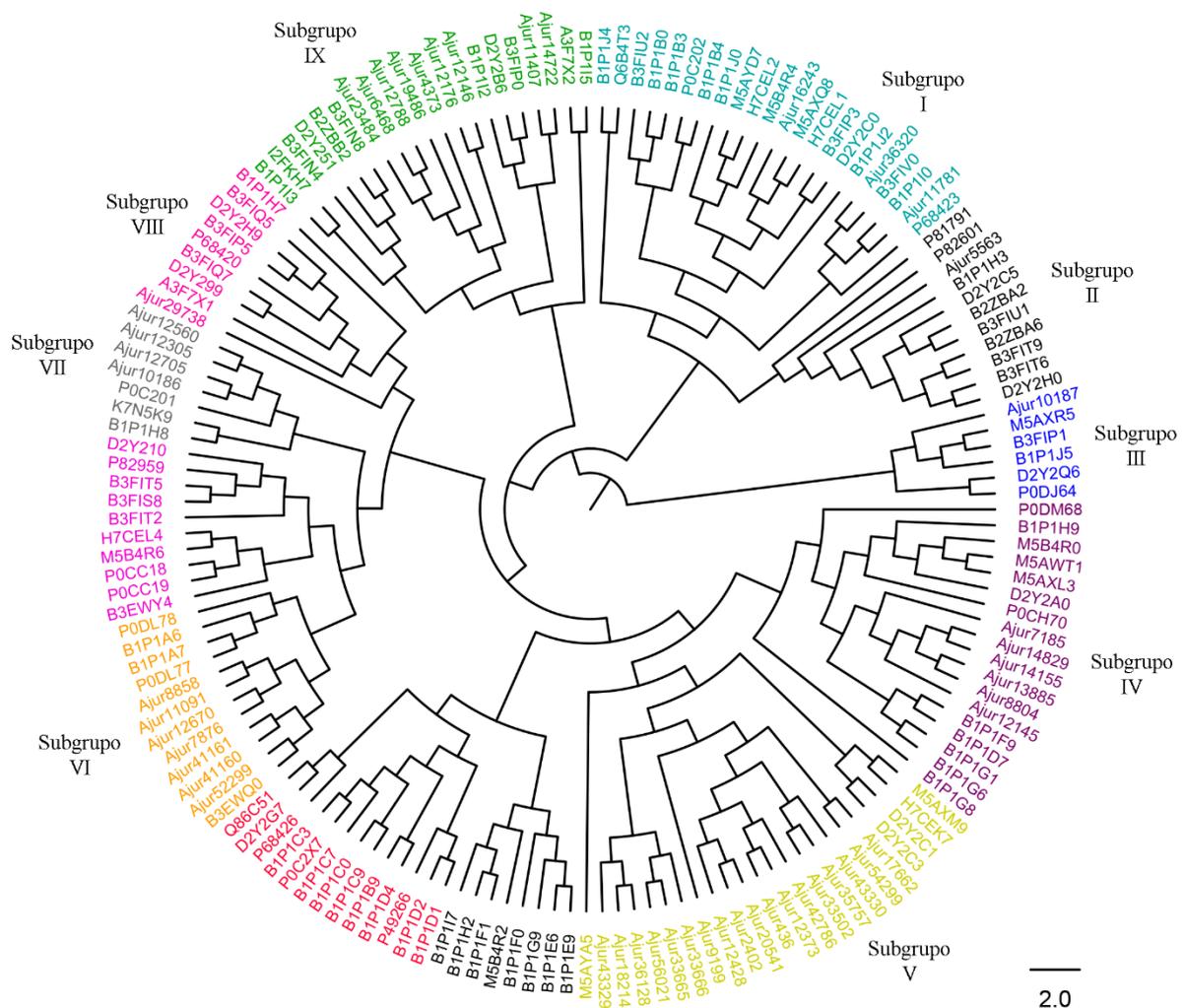


Figura 24 - Árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis* e toxinas depositadas nos bancos de dados *UniProt* e *GenBank*. Foram selecionadas as toxinas classificadas como *Reviewed* e as que possuíam mais detalhes sobre sua estrutura e função. Já para as U-terafotoxinas de *A. juruensis* foram escolhidas aquelas que foram identificadas em comum tanto na análise transcriptômica quanto proteômica, sendo 50 ao total. A árvore foi gerada com a ferramenta *TreeAnnotator* (versão 1.7.5), a visualização e edição foi feita utilizando-se o *software FigTree* (versão 1.4.0).

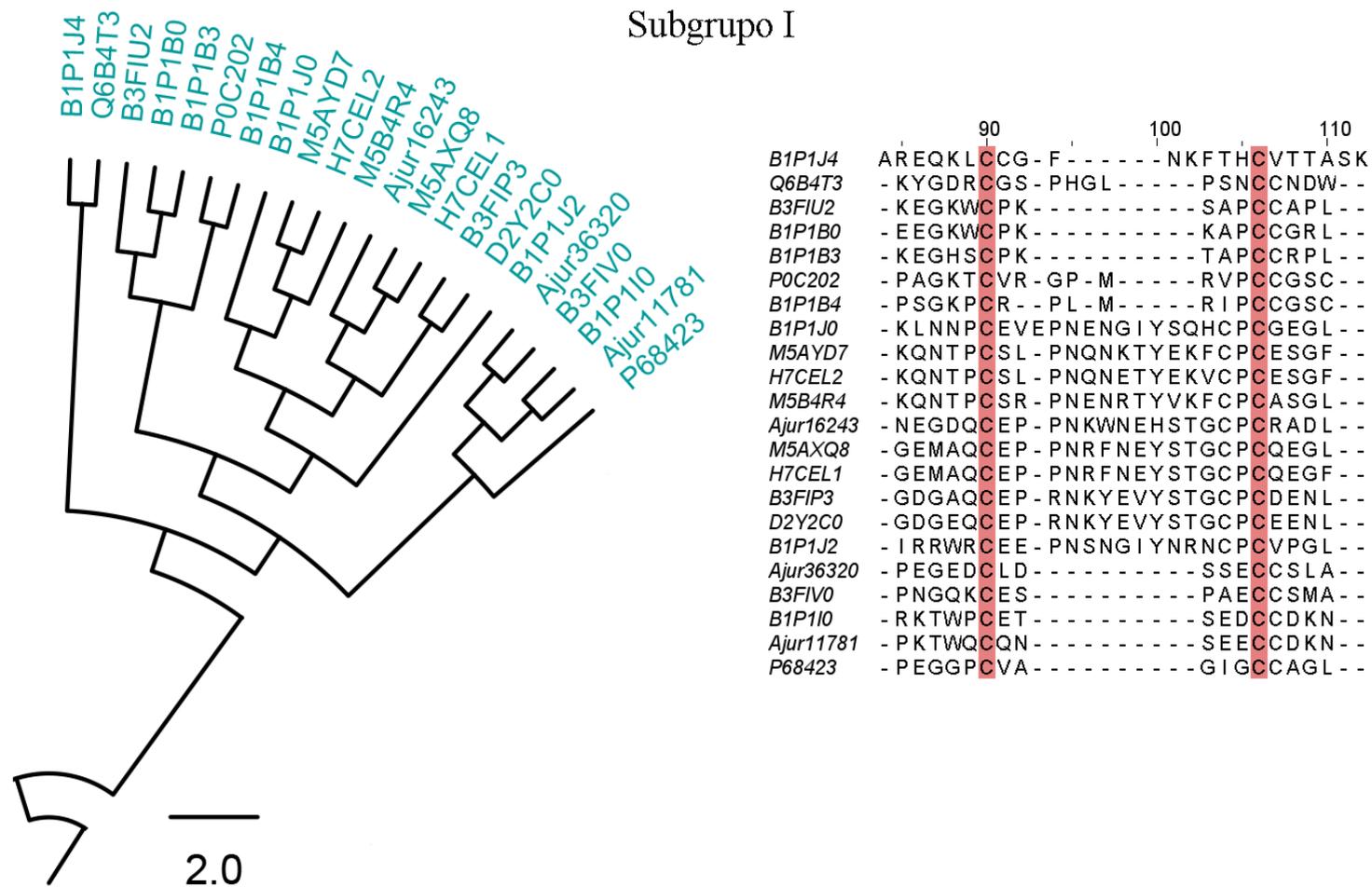


Figura 25 - Subgrupo I da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis* e toxinas depositadas nos bancos de dados *UniProt* e *GenBank*. Uma parte do alinhamento das toxinas correspondentes a este subgrupo também é exibido, o sombreado colorido indica os aminoácidos conservados. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. Os IDs correspondem às toxinas: B1P1J4 - U35-*theraphotoxin*-Cg1a, Q6B4T3 - U2-*sicaritoxin*-Lila, B3FIU2 - U12-*theraphotoxin*-Hs1a, B1P1B0 - U4-*theraphotoxin*-Cg1a, B1P1B3 - U5-*theraphotoxin*-Cg1a, P0C202 - U2-*theraphotoxin*-Pc1a, B1P1B4 - U6-*theraphotoxin*-Cg1a, B1P1J0 - U33-*theraphotoxin*-Cg1b, M5AYD7 - U4-*theraphotoxin*-Gr1b, H7CEL2 - U4-*theraphotoxin*-Gr1e, M5B4R4 - U4-*theraphotoxin*-Gr1a, M5AXQ8 - U5-*theraphotoxin*-Gr1d, H7CEL1 - U5-*theraphotoxin*-Gr1e, B3FIP3 - U9-*theraphotoxin*-Hs1a, D2Y2C0 - U8-*theraphotoxin*-Hhn1a, B1P1J2 - U34-*theraphotoxin*-Cg1a, B3FIV0 - U13-*theraphotoxin*-Hs1a, B1P1I0 - U29-*theraphotoxin*-Cg1a e P68423 - U4-*theraphotoxin*-Hs1a.

Tabela 5 - Toxinas obtidas dos bancos de dados *UniProt* e *GenBank* que foram reunidas no subgrupo I da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis*.

Toxina	Uniprot ou GenBank ID	Espécie na qual foi identificada
U35-theraphotoxin-Cg1a	B1P1J4	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U2-sicaritoxin-Li1a	Q6B4T3	<i>Loxosceles intermedia</i>
U12-theraphotoxin-Hs1a	B3FIU2	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U4-theraphotoxin-Cg1a	B1P1B0	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U5-theraphotoxin-Cg1a	B1P1B3	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U2-theraphotoxin-Pc1a	P0C202	<i>Psalmopoeus cambridgei</i>
U6-theraphotoxin-Cg1a	B1P1B4	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U33-theraphotoxin-Cg1b	B1P1J0	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U4-theraphotoxin-Gr1b	M5AYD7	<i>Grammostola rosea</i>
U4-theraphotoxin-Gr1e	H7CEL2	<i>Grammostola rosea</i>
U4-theraphotoxin-Gr1a	M5B4R4	<i>Grammostola rosea</i>
U5-theraphotoxin-Gr1d	M5AXQ8	<i>Grammostola rosea</i>
U5-theraphotoxin-Gr1e	H7CEL1	<i>Grammostola rosea</i>
U9-theraphotoxin-Hs1a	B3FIP3	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U8-theraphotoxin-Hhn1a	D2Y2C0	<i>Cyriopagopus hainanus</i>
U34-theraphotoxin-Cg1a	B1P1J2	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U13-theraphotoxin-Hs1a	B3FIV0	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U29-theraphotoxin-Cg1a	B1P1I0	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U4-theraphotoxin-Hs1a	P68423	<i>Cyriopagopus schmidti</i>

O subgrupo I reúne 22 toxinas que compartilham em comum 2 resíduos de cisteína conservados (Figura 25). Entre elas B1P1B0, B1P1B3, B1P1B4, B1P1I0 e B3FIU2 são descritas como prováveis inibidoras de canais iônicos (Chen et al., 2008; Jiang et al., 2008; Liao et al., 2007). P0C202 possui forte atividade contra o estágio intra-eritrócito de *P. falciparum in vitro* (Choi et al., 2004) e P68423 causa a paralisia de camundongos quando injetada via intracisternal (Liang, 2004). A toxina Q6B4T3 é uma das que foi empregada como grupo externo, ela é proveniente do veneno de *L. intermedia* e é ativa contra larvas de *Spodoptera frugiperda*, podendo também atuar sobre canais Nav (de Castro et al., 2004). Todas as demais não possuem função conhecida, porém, tendo em vista que a maior parte das que já foram caracterizadas são prováveis inibidoras de canais iônicos, este também pode ser o modo de ação de tais toxinas.

Subgrupo II

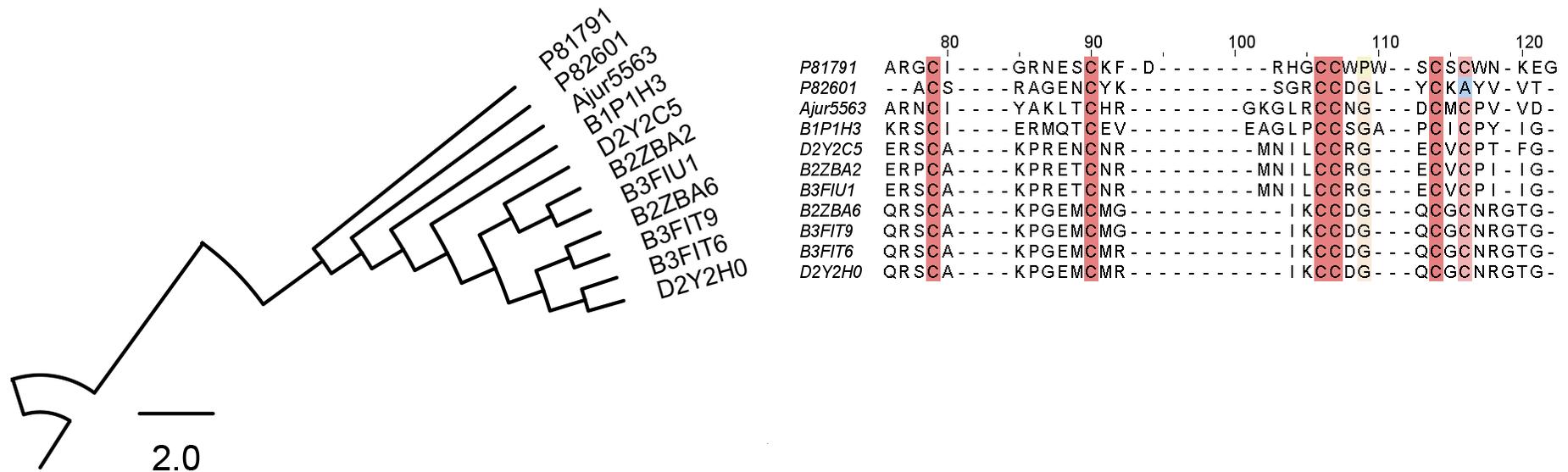


Figura 26 - Subgrupo II da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis* e toxinas depositadas nos bancos de dados *UniProt* e *GenBank*. Uma parte do alinhamento das toxinas correspondentes a este subgrupo também é exibido, o sombreado colorido indica os aminoácidos conservados. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. Os IDs correspondem às toxinas: P81791 - U7-*ctenitoxin*-Pn1a, P82601 - U1-*theraphotoxin*-Cv1a, B1P1H3 - U25-*theraphotoxin*-Cg1a, D2Y2C5 - U12-*theraphotoxin*-Hhn1a, B2ZBA2 - U11-*theraphotoxin*-Hs2b, B3FIU1 - U11-*theraphotoxin*-Hs2a, B2ZBA6 - U11-*theraphotoxin*-Hs1b, B3FIT9 - U11-*theraphotoxin*-Hs1b, B3FIT6 - U11-*theraphotoxin*-Hs1a e D2Y2H0 - U13-*theraphotoxin*-Hhn1a.

Tabela 6 - Toxinas obtidas dos bancos de dados *UniProt* e *GenBank* que foram reunidas no subgrupo II da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis*.

Toxina	Uniprot ou GenBank ID	Espécie na qual foi identificada
U7-ctenitoxin-Pn1a	P81791	<i>Phoneutria nigriventer</i>
U1-theraphotoxin-Cv1a	P82601	<i>Coremiocnemis valida</i>
U25-theraphotoxin-Cg1a	B1P1H3	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U12-theraphotoxin-Hhn1a	D2Y2C5	<i>Cyriopagopus hainanus</i>
U11-theraphotoxin-Hs2b	B2ZBA2	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U11-theraphotoxin-Hs2a	B3FIU1	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U11-theraphotoxin-Hs1b	B2ZBA6	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U11-theraphotoxin-Hs1b	B3FIT9	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U11-theraphotoxin-Hs1a	B3FIT6	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U13-theraphotoxin-Hhn1a	D2Y2H0	<i>Cyriopagopus hainanus</i>

O subgrupo II possui 11 toxinas que têm 5 cisteínas conservadas (Figura 26), entre elas a P81791, a segunda empregada como grupo externo. Ela é proveniente do veneno de *P. nigriventer* e, entre outras funções, atua como antagonista de canais de cálcio do tipo L (Cardoso et al., 2003; Cordeiro et al., 1993; Richardson et al., 2006). A toxina B1P1H3 é capaz de inibir canais de sódio sensíveis a tetrodotoxina em neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos (Chen et al., 2008; Liao et al., 2007). D2Y2C5 é provável inibidora de canais iônicos, D2Y2H0 inibe canais K_v e P82601 induz paralisia reversível em grilos, porém seu alvo molecular é desconhecido (Balaji et al., 2000; Correnti et al., 2018; Tang et al., 2010). Todas as demais ainda não têm a função caracterizada.

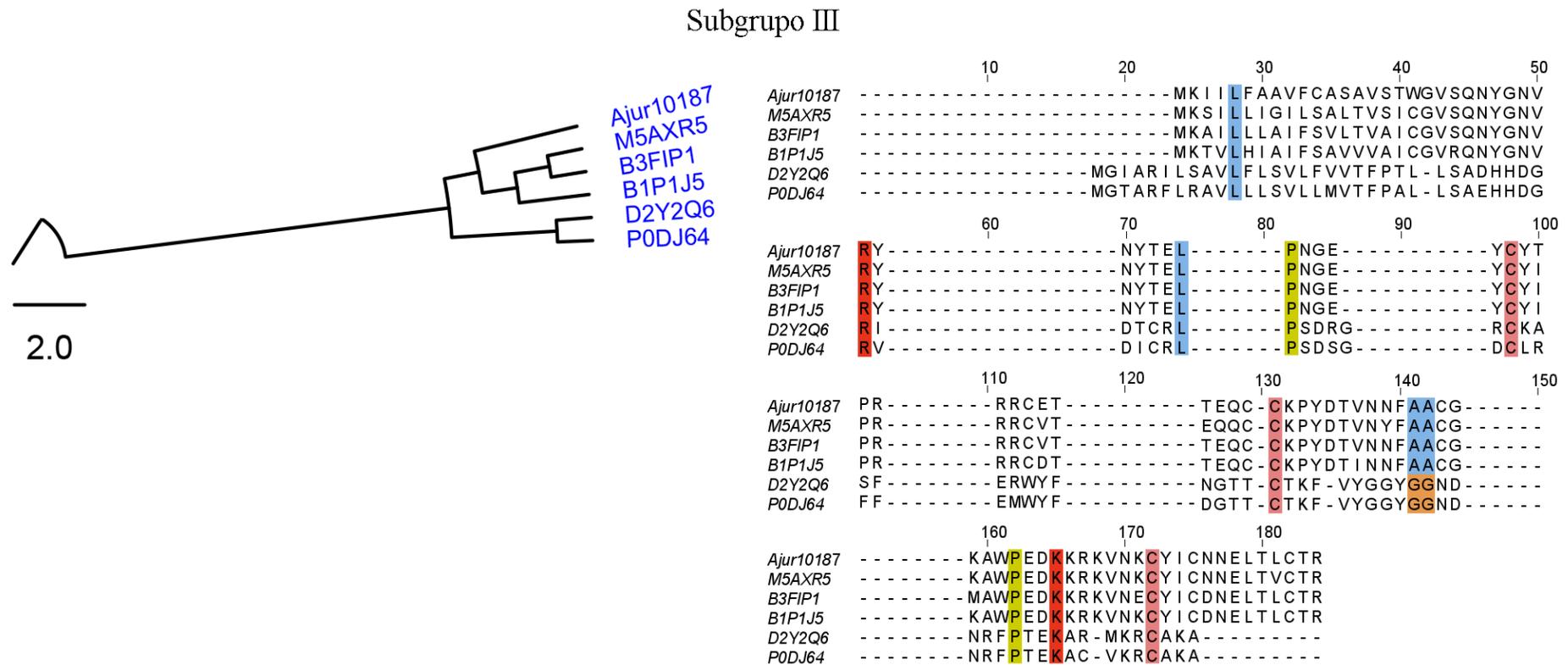


Figura 27 - Subgrupo III da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis* e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados *UniProt* e *GenBank*. O alinhamento das toxinas correspondentes a este subgrupo também é exibido, o sombreamento colorido indica os aminoácidos conservados. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. Os IDs correspondem às toxinas: M5AXR5 - U8-*theraphotoxin*-Gr1a, B3FIP1 - U8-*theraphotoxin*-Hs1a, B1P1J5 - U36-*theraphotoxin*-Cg1a, D2Y2Q6 - U15-*theraphotoxin*-Hhn1o e P0DJ64 - U15-*theraphotoxin*-Hhn1b.

Tabela 7 - Toxinas obtidas dos bancos de dados *UniProt* e *GenBank* que foram reunidas no subgrupo III da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis*.

Toxina	<i>Uniprot</i> ou <i>GenBank</i> ID	Espécie na qual foi identificada
U8- <i>theraphotoxin-Gr1a</i>	M5AXR5	<i>Grammostola rosea</i>
U8- <i>theraphotoxin-Hs1a</i>	B3FIP1	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U36- <i>theraphotoxin-Cg1a</i>	B1P1J5	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U15- <i>theraphotoxin-Hhn1o</i>	D2Y2Q6	<i>Cyriopagopus hainanus</i>
U15- <i>theraphotoxin-Hhn1b</i>	P0DJ64	<i>Cyriopagopus hainanus</i>

O subgrupo III agrupa 6 toxinas que possuem em comum 9 resíduos de aminoácido conservados (Figura 27). Além disso, este é o grupo menos derivado, visto que possui menos ramificações (Figura 24, página 80). B1P1J5 e B3FIP1 são prováveis neurotoxinas com atividade sobre canais iônicos (Chen et al., 2008; Jiang et al., 2008). D2Y2Q6 e P0DJ64 têm dupla função, sendo inibidoras de serino proteases e de canais K_V (Tang et al., 2010; Yuan et al., 2008). M5AXR5 e Ajur10187 não têm função conhecida, mas, considerando que foram agrupadas com toxinas que atuam sobre canais iônicos, provavelmente também têm esse papel.

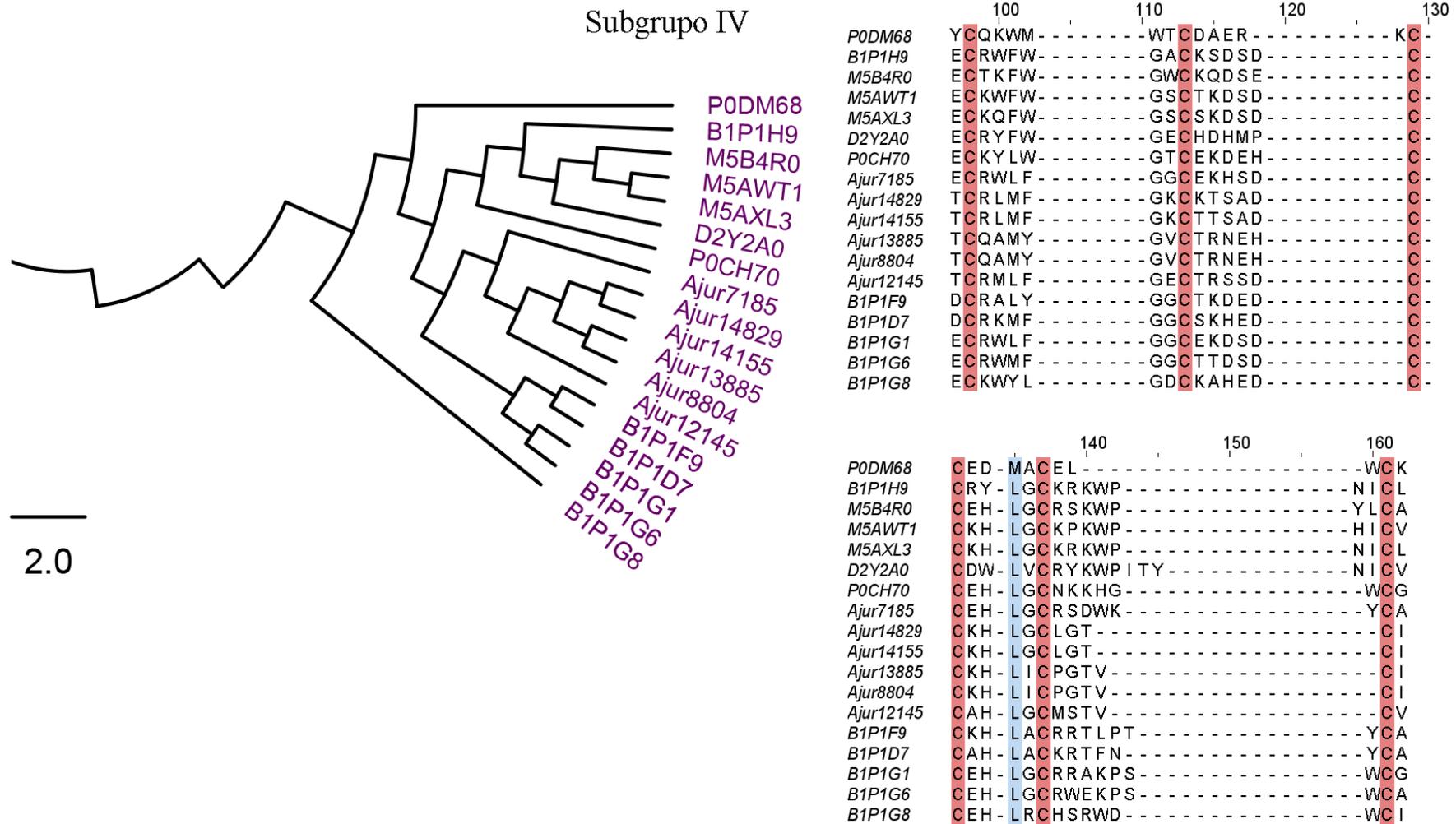


Figura 28 - Subgrupo IV da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis* e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados *UniProt* e *GenBank*. Uma parte do alinhamento das toxinas correspondentes a este subgrupo também é exibido, o sombreamento colorido indica os aminoácidos conservados. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. Os IDs correspondem às toxinas: P0DM68 - U4-*theraphotoxin*-Sp11a, B1P1H9 - U28-*theraphotoxin*-Cg1a, M5B4R0 - U3-*theraphotoxin*-Gr1d, M5AWT1 - U3-*theraphotoxin*-Gr1e, M5AXL3 - U3-*theraphotoxin*-Gr1b, D2Y2A0 - U7-*theraphotoxin*-Hhn1a 1, P0CH70 - U1-*theraphotoxin*-Hhn1a, B1P1F9 - U20-*theraphotoxin*-Cg1a 1, B1P1D7 - U13-*theraphotoxin*-Cg1a, B1P1G1 - U21-*theraphotoxin*-Cg1a 4, B1P1G6 - U2-*theraphotoxin*-Cg1b 1 e B1P1G8 - U22-*theraphotoxin*-Cg1a.

Tabela 8 - Toxinas obtidas dos bancos de dados *UniProt* e *GenBank* que foram reunidas no subgrupo IV da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis*.

Toxina	Uniprot ou GenBank ID	Espécie na qual foi identificada
U4-theraphotoxin-Spl1a	P0DM68	<i>Selenotypus plumipes</i>
U28-theraphotoxin-Cg1a	B1P1H9	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U3-theraphotoxin-Gr1d	M5B4R0	<i>Grammostola rosea</i>
U3-theraphotoxin-Gr1e	M5AWT1	<i>Grammostola rosea</i>
U3-theraphotoxin-Gr1b	M5AXL3	<i>Grammostola rosea</i>
U7-theraphotoxin-Hhn1a 1	D2Y2A0	<i>Cyriopagopus hainanus</i>
U1-theraphotoxin-Hhn1a	P0CH70	<i>Cyriopagopus hainanus</i>
U20-theraphotoxin-Cg1a 1	B1P1F9	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U13-theraphotoxin-Cg1a	B1P1D7	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U21-theraphotoxin-Cg1a 4	B1P1G1	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U2-theraphotoxin-Cg1b 1	B1P1G6	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U22-theraphotoxin-Cg1a	B1P1G8	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>

Para o subgrupo IV observa-se que as 18 toxinas nele agrupados compartilham 6 cisteínas conservadas e, excluindo-se P0DM68, também têm uma leucina conservada (Figura 28). Com exceção dos transcritos de *A. juruensis*, M5AWT1, M5AXL3 e M5B4R0 todas as toxinas são prováveis inibidoras de canais iônicos (Chen et al., 2008; Liao et al., 2007; Tang et al., 2010; Wang et al., 2010; Wong et al., 2013).

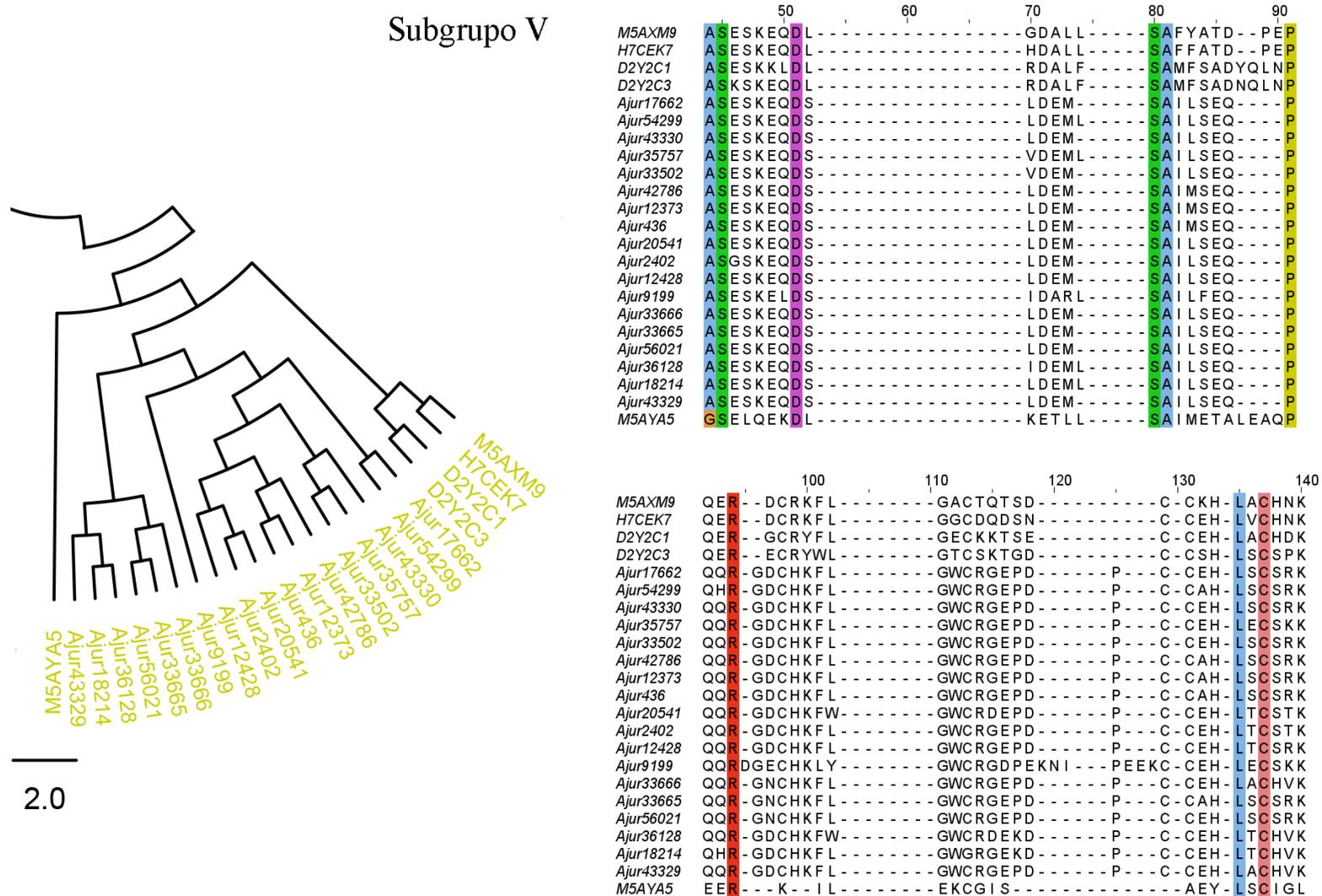


Figura 29 - Subgrupo V da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis* e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados *UniProt* e *GenBank*. Uma parte do alinhamento das toxinas correspondentes a este subgrupo também é exibido, o sombreamento colorido indica os aminoácidos conservados. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. Os IDs correspondem às toxinas: M5AXM9 - U1-*theraphotoxin*-Gr1a, H7CEK7 - U1-*theraphotoxin*-Gr1b, D2Y2C1 - U6-*theraphotoxin*-Hhn1a 1, D2Y2C3 - U5-*theraphotoxin*-Hhn1a e M5AYA5 - U9-*theraphotoxin*-Gr1a.

Tabela 9 - Toxinas obtidas dos bancos de dados *UniProt* e *GenBank* que foram reunidas no subgrupo V da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis*.

Toxina	<i>Uniprot</i> ou <i>GenBank</i> ID	Espécie na qual foi identificada
U1- <i>theraphotoxin-Gr1a</i>	M5AXM9	<i>Grammostola rosea</i>
U1- <i>theraphotoxin-Gr1b</i>	H7CEK7	<i>Grammostola rosea</i>
U6- <i>theraphotoxin-Hhn1a 1</i>	D2Y2C1	<i>Cyriopagopus hainanus</i>
U5- <i>theraphotoxin-Hhn1a</i>	D2Y2C3	<i>Cyriopagopus hainanus</i>
U9- <i>theraphotoxin-Gr1a</i>	M5AYA5	<i>Grammostola rosea</i>

O subgrupo V é o que possui a maior quantidade de transcritos de *A. juruensis*, eles representam 18 das 23 toxinas nele presentes. Estas têm em comum um resíduo conservado de ácido aspártico, prolina, arginina, leucina e cisteína, e dois de serina e alanina (com exceção de M5AYA5) (Figura 29). Apenas D2Y2C1 e D2Y2C3 têm função conhecida, sendo inibidoras de canais iônicos (Tang et al., 2010).

Subgrupo VI

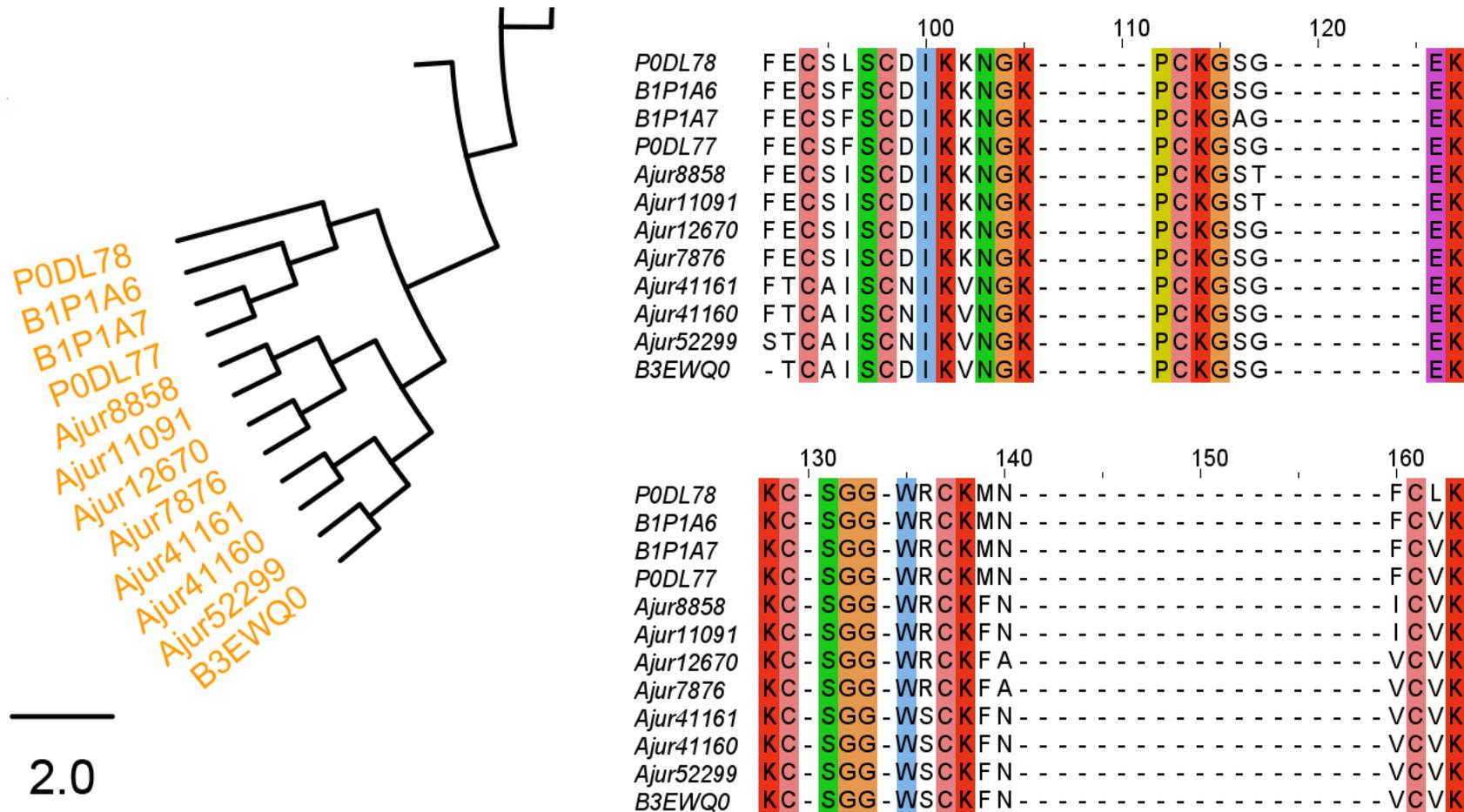


Figura 30 - Subgrupo VI da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis* e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados *UniProt* e *GenBank*. Uma parte do alinhamento das toxinas correspondentes a este subgrupo também é exibido, o sombreamento colorido indica os aminoácidos conservados. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. Os IDs correspondem às toxinas: P0DL78 - U1-*theraphotoxin*-Ct1b, B1P1A6 - U3-*theraphotoxin*-Cg1a, B1P1A7 - U3-*theraphotoxin*-Cg1b, P0DL77 - U1-*theraphotoxin*-Ct1a e B3EWQ0 - U-*theraphotoxin*-Aju1a.

Tabela 10 - Toxinas obtidas dos bancos de dados *UniProt* e *GenBank* que foram reunidas no subgrupo VI da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis*.

Toxina	<i>Uniprot</i> ou <i>GenBank</i> ID	Espécie na qual foi identificada
U1- <i>theraphotoxin</i> -Ct1b	P0DL78	<i>Coremiocnemis tropix</i>
U3- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a	B1P1A6	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U3- <i>theraphotoxin</i> -Cg1b	B1P1A7	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U1- <i>theraphotoxin</i> -Ct1a	P0DL77	<i>Coremiocnemis tropix</i>
U- <i>theraphotoxin</i> -Aju1a	B3EWQ0	<i>Avicularia juruensis</i>

No subgrupo VI observa-se que as 12 toxinas nele reunidas possuem diversos aminoácidos conservados (Figura 30). B1P1A6, B1P1A7, P0DL77 e P0DL78 são descritas como inibidoras de canais iônicas putativas (Chen et al., 2008; Ikonomopoulou et al., 2016; Liao et al., 2007). B3EWQ0 corresponde ao peptídeo antimicrobiano Juruína, que possui forte atividade antifúngica e foi isolada anteriormente do veneno de *A. juruensis* por Ayroza et al. (2012). Como esperado, neste ramo da árvore também está localizado o transcrito Aju41161, que corresponde à isoforma da Juruína, a Juruína_2 (Nascimento et al., 2022) (ANEXO A - Artigo no preprint *bioRxiv*).

Subgrupo VII

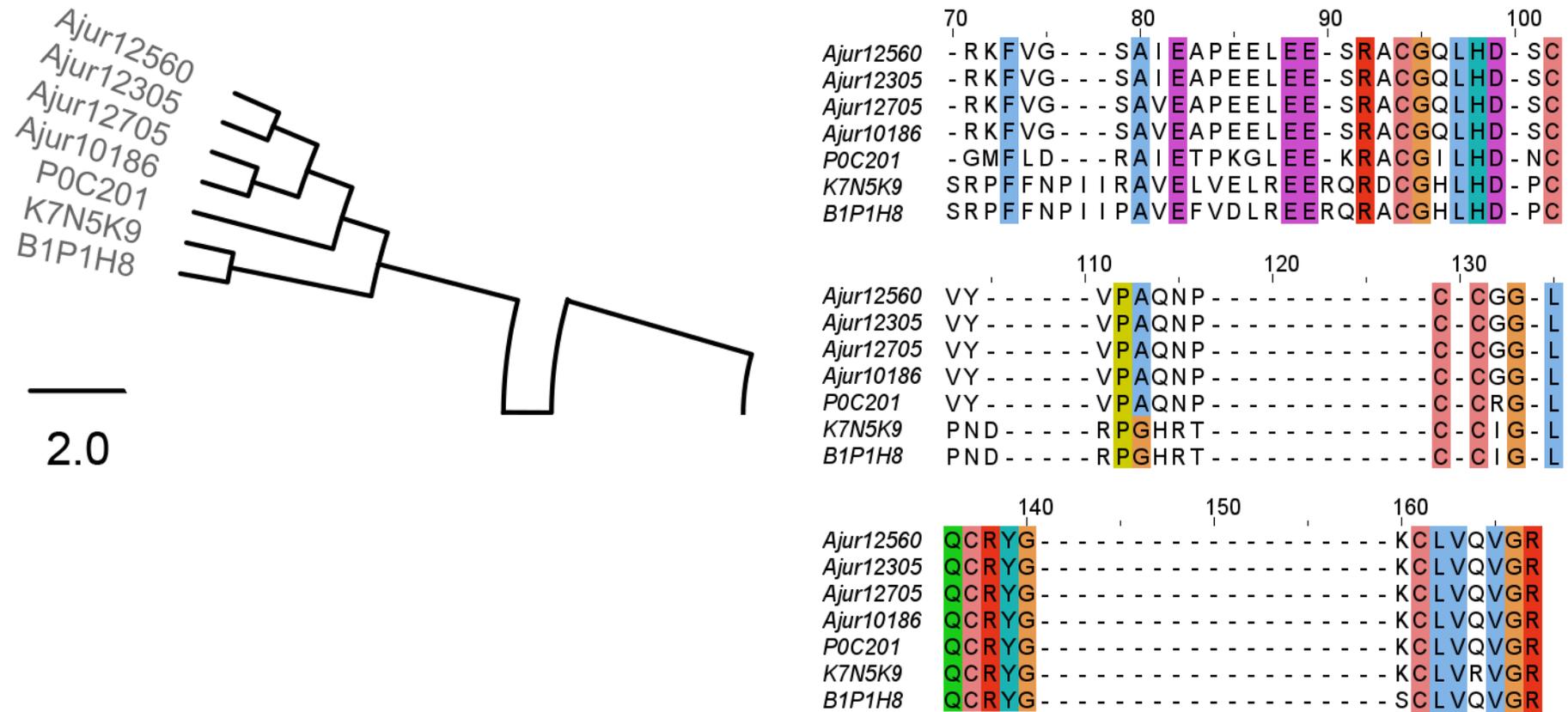
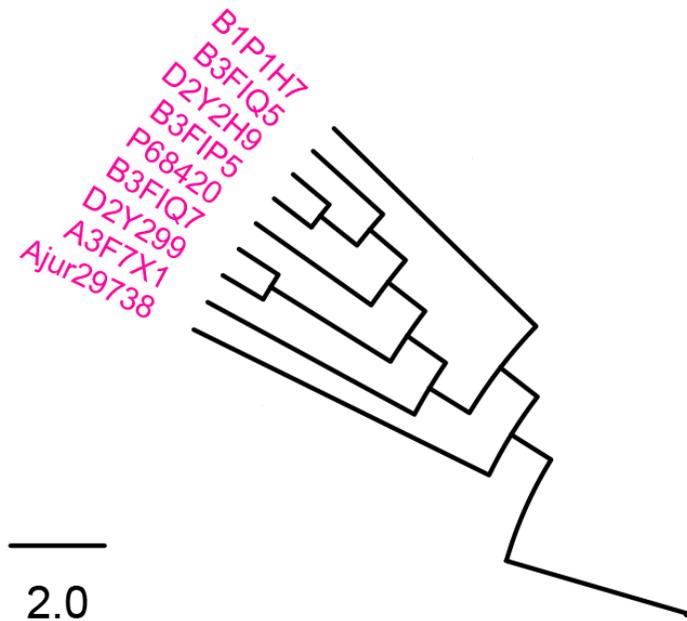


Figura 31 - Subgrupo VII da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis* e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados *UniProt* e *GenBank*. Uma parte do alinhamento das toxinas correspondentes a este subgrupo também é exibido, o sombreamento colorido indica os aminoácidos conservados. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. Os IDs correspondem às toxinas: P0C201 - U1-*theraphotoxin*-Pc1a, K7N5K9 - U1-*theraphotoxin*-Sp1a e B1P1H8 - U27-*theraphotoxin*-Cg1a.

Tabela 11 - Toxinas obtidas dos bancos de dados *UniProt* e *GenBank* que foram reunidas no subgrupo VII da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis*.

Toxina	<i>Uniprot</i> ou <i>GenBank</i> ID	Espécie na qual foi identificada
U1- <i>theraphotoxin</i> -Pc1a	P0C201	<i>Psalmopoeus cambridgei</i>
U1- <i>theraphotoxin</i> -Sp1a	K7N5K9	<i>Selenotypus plumipes</i>
U27- <i>theraphotoxin</i> -Cg1a	B1P1H8	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>

No subgrupo VII foram agrupadas 7 toxinas que compartilham diversos aminoácidos conservados (Figura 31). B1P1H8 é provável inibidora de canais iônicos (Chen et al., 2008), P0C201 possui forte atividade contra o estágio intra-eritrócito de *P. falciparum in vitro* (Choi et al., 2004; Pimentel et al., 2006) e K7N5K9, além de provável inibidora de canais iônicos, também possui ação inseticida (Hardy et al., 2013; Wong et al., 2013). Tendo em vista as diferentes funções citadas, não é possível inferir o modo de ação dos transcritos de *A. juruensis* também presentes neste ramo.



Subgrupo VIII

	110		120		130		140		150		160	
B1P1H7	-VPC	EDE	-----	NSPC	-CPP	-LKCEKTFGYGW	-----	-----	-----	-----	-WYGS	PFCV
B3FIQ5	-VPC	DEN	-----	DPRC	-CSG	-LVCLKPTLHGI	-----	-----	-----	-----	-WYKS	YYCY
D2Y2H9	-VPC	DEN	-----	DPRC	-CFG	-LVCLKPTLHGI	-----	-----	-----	-----	-WYKS	YYCY
B3FIP5	-VPC	DEN	-----	DPRC	-CSG	-LVCLKPTLHGI	-----	-----	-----	-----	-WYKS	YYCY
P68420	-VPC	DEN	-----	DPRC	-CSG	-LVVLLKKTTLHGI	-----	-----	-----	-----	-WI	KSSYCY
B3FIQ7	-VPC	DNDP	-----	AKNRR	-CSG	-LECLKPYLHGI	-----	-----	-----	-----	-WYQD	YYCY
D2Y299	-IPC	DPNP	-----	VKDL	PCSG	-LACLKPTLHGI	-----	-----	-----	-----	-WYKH	HHYCY
A3F7X1	-APC	DKD	-----	RPDC	-CSY	-AECLRPSGYGW	-----	-----	-----	-----	-WHGT	YYCY
Ajur29738	-VNC	KTLETVE	-----	QKQQ	CKME	KLMAARSKVQPS	-----	-----	-----	-----	-----	EECL

Figura 32 - Subgrupo VIII da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis* e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados *UniProt* e *GenBank*. Uma parte do alinhamento das toxinas correspondentes a este subgrupo também é exibido, o sombreamento colorido indica os aminoácidos conservados. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. Os IDs correspondem às toxinas: B1P1H7 - U26-*theraphotoxin*-Cg1b, B3FIQ5 - U10-*theraphotoxin*-Hs1a, D2Y2H9 - U11-*theraphotoxin*-Hhn1v, B3FIP5 - U10-*theraphotoxin*-Hs1a, P68420 - U3-*theraphotoxin*-Hs1a, B3FIQ7 - U10-*theraphotoxin*-Hs2a, D2Y299 - U9-*theraphotoxin*-Hhn1a e A3F7X1 - U2-*theraphotoxin*-Lsp1a.

Tabela 12 - Toxinas obtidas dos bancos de dados *UniProt* e *GenBank* que foram reunidas no subgrupo VIII da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis*.

Toxina	Uniprot ou GenBank ID	Espécie na qual foi identificada
U26-theraphotoxin-Cg1b	B1P1H7	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U10-theraphotoxin-Hs1a	B3FIQ5	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U11-theraphotoxin-Hhn1v	D2Y2H9	<i>Cyriopagopus hainanus</i>
U10-theraphotoxin-Hs1a	B3FIP5	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U3-theraphotoxin-Hs1a	P68420	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U10-theraphotoxin-Hs2a	B3FIQ7	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U9-theraphotoxin-Hhn1a	D2Y299	<i>Cyriopagopus hainanus</i>
U2-theraphotoxin-Lspl1a	A3F7X1	<i>Lasiadora sp.</i>

O subgrupo VIII possui 9 toxinas e apenas uma delas é um transcrito de *A. juruensis*. Com exceção dele, elas têm em comum 5 cisteínas, 1 prolina e 1 glicina conservados (Figura 32). A3F7X1 é uma neurotoxina inseticida. B1P1H7, B3FIQ7 e D2Y299 são prováveis inibidoras de canal iônico (Chen et al., 2008; Jiang et al., 2008; Tang et al., 2010). Considerando-se os resultados do *Gene Ontology*, B3FIP5 e B3FIQ5 têm atividade inibidora sobre canal de sódio (Jiang et al. 2008). D2Y2H9 inibe fracamente canais K_V e Nav (Correnti et al., 2018; Tang et al., 2010) e P68420 é capaz de paralisar camundongos quando injetada via intracerebroventricular (Liang, 2004). Sendo assim, tendo em vista as funções das toxinas deste subgrupo, provavelmente o transcrito Ajur29738, o único presente neste ramo, também atue em canais iônicos.

Subgrupo IX

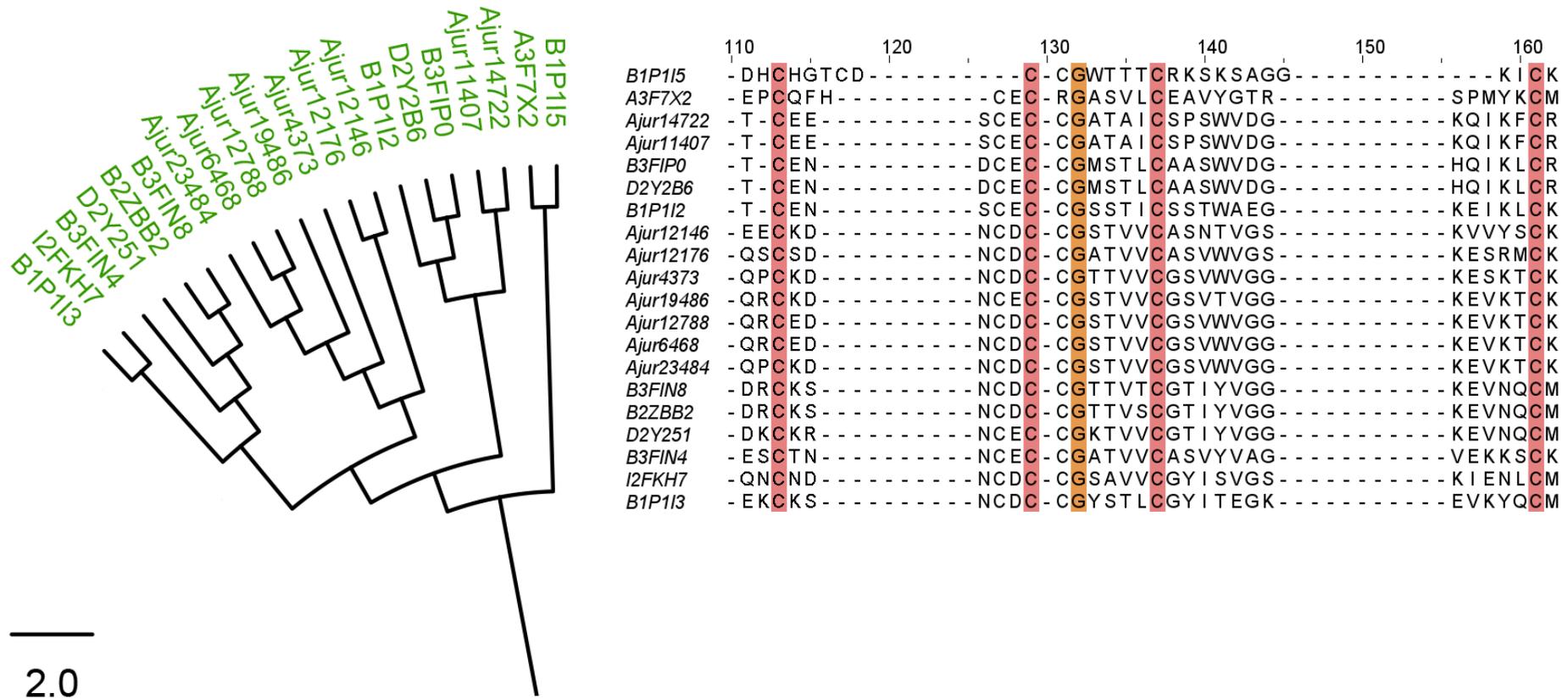


Figura 33 - Subgrupo IX da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis* e as U-terafotoxinas depositadas nos bancos de dados *UniProt* e *GenBank*. Uma parte do alinhamento das toxinas correspondentes a este subgrupo também é exibido, o sombreado colorido indica os aminoácidos conservados. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. Os IDs correspondem às toxinas: B1P115 - U32-*theraphotoxin*-Cg1a, A3F7X2 - U3-*theraphotoxin*-Lsp1a, B3FIP0 - U16-*theraphotoxin*-Hs1a, D2Y2B6 - U10-*theraphotoxin*-Hhn1a, B1P112 - U30-*theraphotoxin*-Cg1b, B3FIN8 - U7-*theraphotoxin*-Hs3c, B2ZBB2 - U7-*theraphotoxin*-Hs3a, D2Y251 - U14-*theraphotoxin*-Hhn1a, B3FIN4 - U7-*theraphotoxin*-Hs1a, I2FKH7 - U7-*theraphotoxin*-Gr1b e B1P113 - U31-*theraphotoxin*-Cg1a.

Tabela 13 - Toxinas obtidas dos bancos de dados *UniProt* e *GenBank* que foram reunidas no subgrupo IX da árvore filogenética ilustrativa construída com as U-terafotoxinas do veneno de *Avicularia juruensis*.

Toxina	Uniprot ou GenBank ID	Espécie na qual foi identificada
U32-theraphotoxin-Cg1a	B1P1I5	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U3-theraphotoxin-Lsp1a	A3F7X2	<i>Lasiadora sp.</i>
U16-theraphotoxin-Hs1a	B3FIP0	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U10-theraphotoxin-Hhn1a	D2Y2B6	<i>Cyriopagopus hainanus</i>
U30-theraphotoxin-Cg1b	B1P1I2	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>
U7-theraphotoxin-Hs3c	B3FIN8	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U7-theraphotoxin-Hs3a	B2ZBB2	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U14-theraphotoxin-Hhn1a	D2Y251	<i>Cyriopagopus hainanus</i>
U7-theraphotoxin-Hs1a	B3FIN4	<i>Cyriopagopus schmidti</i>
U7-theraphotoxin-Gr1b	I2FKH7	<i>Grammostola rosea</i>
U31-theraphotoxin-Cg1a	B1P1I3	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>

O último subgrupo analisado, IX, reúne 20 toxinas que possuem 4 resíduos conservados de cisteína e 1 de glicina (Figura 33). B1P1I2, B1P1I3, B1P1I5, D2Y251 e D2Y2B6 são prováveis inibidoras de canais iônicos (Chen et al., 2008; Liao et al., 2007; Tang et al., 2010). As demais toxinas não foram completamente caracterizadas e suas funções não são conhecidas. Desta forma, não é possível inferir se os transcritos de *A. juruensis* reunidos nesse ramo atuam sobre canais iônicos.

Esta árvore filogenética ilustrativa fornece uma ideia inicial de como as U-terafotoxinas evoluíram e se distribuem entre os indivíduos da família Theraphosidae. O estudo de aranhas desta família é muito importante, considerando a grande variedade de espécies e o diminuto número de dados disponíveis comparando-se com os de outros animais venenosos.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo principal fazer a caracterização inicial do veneno da espécie *Avicularia juruensis*, a qual foi escolhida para o estudo devido ao fato de geralmente consumir pequenas aves.

Com o transcriptoma foram observadas as possíveis toxinas que são sintetizadas pelas glândulas de veneno. Elas apresentaram similaridades com CRISPs, hialuronidase, fosfolipases, neprilisinases e, principalmente, terafotoxinas. Também foram obtidos transcritos que não apresentaram similaridade com moléculas já depositadas em bancos de dados, estes podem representar toxinas exclusivas do veneno de *A. juruensis*.

Com a espectrometria de massas pôde-se confirmar que o veneno possui CRISPs, hialuronidase e neprilisinases. Assim como observado no transcriptoma, o proteoma mostrou que o veneno de *A. juruensis* é rico em terafotoxinas, em especial U-terafotoxinas. A presença de grande quantidade de terafotoxinas sugere que a espécie *A. juruensis* possui veneno bastante neurotóxico e a presença das enzimas é um indicativo de que o veneno age com rapidez.

Estudos mais aprofundados podem ser realizados para entender a ação do veneno em vertebrados e invertebrados, bem como para identificar e caracterizar mais detalhadamente seus componentes. Outros transcriptomas em diferentes fases da vida das aranhas podem ser realizados para que sejam feitas comparações com os dados obtidos no presente trabalho. Além disso, novos proteomas do veneno bruto utilizando-se outros tipos de enzimas para a digestão das amostras e o uso diferentes metodologias de análise por espectrometria de massas podem ser úteis para a identificação de mais toxinas.

O presente trabalho é importante do ponto de vista biotecnológico, já que esta riqueza de toxinas pode representar uma importante fonte de moléculas que podem vir a ser empregadas para a criação de bioinseticidas ou medicamentos. Além disso, também contribui para o estudo sobre venenos de aranhas terafosídeas, grupo menos estudado em relação a famílias que causam acidentes graves com humanos.

REFERÊNCIAS*

Abascal F, Zardoya R, Posada D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*. 2005;21(9):2104-5.

Abreu TF. Caracterização proteômica, peptidômica e transcriptômica dos venenos de aranhas do gênero *Acanthoscurria*. [dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 2015.

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

Akef HM. Anticancer, antimicrobial, and analgesic activities of spider venoms. *Toxicol Res (Camb)*. 2018;7(3):381-95.

Aloulou A, Rahier R, Arhab Y, Noiriel A, Abousalham A. Phospholipases: An overview. In: Sandoval G., editor. *Lipases and phospholipases: Methods and protocols*. New York: Humana Press; 2018. p. 69-105.

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

Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, et al. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(Database issue):D115-9.

Arbuckle K, Rodríguez de la Vega RC, Casewell NR. Coevolution takes the sting out of it: Evolutionary biology and mechanisms of toxin resistance in animals. *Toxicon*. 2017;140:118-31.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000;25(1):25-9.

Assrir N, Malard F, Lescop E. Structural insights into TCTP and its interactions with ligands and proteins. *TCTP/tpt1 - Remodeling signaling from stem cell to disease*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 9-46.

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.

Aung KPP, Xu X, Lwin WW, Sang MZ, Yu L, Liu H, et al. Two new species of the primitively segmented spider genus *Liphistius* Schiödte, 1849 (Mesothelae, Liphistiidae) from Myanmar. *Zookeys*. 2019;882:29-39.

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.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Cited 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Balaji RA, Sasaki T, Gopalakrishnakone P, Sato K, Kini RM, Bay BH. Purification, structure determination and synthesis of covalitoxin-II, a short insect-specific neurotoxic peptide from the venom of the *Coremiocnemis validus* (Singapore tarantula). FEBS Lett. 2000;474(2-3):208-12.

Barreto dos Santos N, Bonfanti AP, Rocha-e-Silva TAA, Silva Junior PI, da Cruz-Höfling MA, Verinaud L, et al. Venom of the *Phoneutria nigriventer* spider alters the cell cycle, viability, and migration of cancer cells. J Cell Physiol. 2019; 234(2):1398-415.

Barth T, Mandacaru SC, Charneau S, Souza MVd, Ricart CAO, Noronha EF, et al. Biochemical and structural characterization of a protein complex containing a hyaluronidase and a CRISP-like protein isolated from the venom of the spider *Acanthoscurria natalensis*. J Proteomics. 2018;192:102-13.

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.

Benoit J. A review of the “venomous theropcephalian” hypothesis and how multiple reportrayals of *Euchambersia* have influenced its success and vice versa. Bull Soc Geol Fr. 2016;187(4-5):217-24.

Benoit J, Norton LA, Manger PR, Rubidge BS. Reappraisal of the envenoming capacity of *Euchambersia mirabilis* (Therapsida, Therocephalia) using μ CT-scanning techniques. PLoS One. 2017;12(2):e0172047.

Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. Nucleic Acids Res. 2017;45(D1):D37-42.

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.

Bland ND, Pinney JW, Thomas JE, Turner AJ, Isaac RE. Bioinformatic analysis of the neprilysin (M13) family of peptidases reveals complex evolutionary and functional relationships. BMC Evol Biol. 2008;8:16.

Brás-Silva C, Leite-Moreira AF. Efeitos miocárdicos da endotelina-1. Rev Port Cardiol. 2008;27(7-8):925-51.

Bourne Y, Renault L, Marchot P. Crystal structure of snake venom acetylcholinesterase in complex with inhibitory antibody fragment Fab410 bound at the peripheral site: evidence for open and closed states of a back door channel. J Biol Chem. 2015;290(3):1522-35.

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

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

Bushmanova E, Antipov D, Lapidus A, Prjibelski AD. rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *GigaScience.* 2019; 8(9):giz100.

Cardoso FC, Pacífico LG, Carvalho DC, Victória JM, Neves AL, Chávez-Olórtegui C, et al. Molecular cloning and characterization of *Phoneutria nigriventer* toxins active on calcium channels. *Toxicon.* 2003;41(7):755-63.

Chen J, Deng M, He Q, Meng E, Jiang L, Liao Z, et al. Molecular diversity and evolution of cystine knot toxins of the tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(15):2431-44.

Choi SJ, Parent R, Guillaume C, Deregnacourt C, Delarbre C, Ojcius DM, 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.

Cohen DJ, Maldera JA, Weigel Muñoz M, Ernesto JI, Vasen G, Cuasnicu PS. Cysteine-rich secretory proteins (CRISP) and their role in mammalian fertilization. *Biol Res.* 2011;44(2):135-8.

Cordeiro Mdo N, de Figueiredo SG, Valentim Ado C, Diniz CR, von Eickstedt VR, Gilroy J, et al. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon.* 1993;31(1):35-42.

Correnti CE, Gewe MM, Mehlin C, Bandaranayake AD, Johnsen WA, Rupert PB, et al. Screening, large-scale production and structure-based classification of cystine-dense peptides. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25(3):270-8.

Corzo G, Villegas E, Gómez-Lagunas F, Possani LD, Belokoneva OS, Nakajima T. Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *J Biol Chem.* 2002;277(26):23627-37.

da Silveira RB, Chaim OM, Mangili OC, Gremski W, Dietrich CP, Nader HB, et al. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon.* 2007;49(6):758-68.

Daffre S, Miranda A, Miranda MTM, Bulet P, Silva Junior PI, Machado A, et al. Peptídeos antibióticos: peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento.* 2001;23:48-55.

de Almeida ESNC. Análise do dimorfismo sexual em venenos da aranha *Acanthoscurria juruenicola* por peptidômica quantitativa. [dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 2018.

de Castro CS, Silvestre FG, Araújo SC, Gabriel de MY, Mangili OC, Cruz I, et al. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon.* 2004;44(3):273-80.

de Oliveira Domingos M, Neves IV, Vigerelli H, Pimenta DC, de Carvalho Lins Fernandes Távora B, Lemos TJ, et al. The potential of *Loxosceles gaucho* spider venom to regulate *Pseudomonas aeruginosa* mechanisms of virulence. *Toxicon*. 2018;152:78-83.

de Oliveira UC, Nishiyama MY Jr, dos Santos MBV, Santos-da-Silva AdP, Chalkidis HdM, Souza-Imberg A, et al. Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193739.

Dias SC. Color pattern changes in *Pachistopelma rufonigrum* Pocock (Araneae, Theraphosidae). *Rev Bras Zool*. 2004;21(1):153-4.

Diego-García E, Cologna CT, Cassoli JS, Corzo G. Spider transcriptomes from venom glands: molecular diversity of ion channel toxins and antimicrobial peptide transcripts. In: Gopalakrishnakone P, Corzo G, Diego-Garcia E, de Lima M, editors. *Spider venoms*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2016. p. 223-49.

Diniz MRV, Paiva ALB, Guerra-Duarte C, Nishiyama MY Jr, Mudadu MA, de Oliveira UC, et al. An overview of *Phoneutria nigriventer* spider venom using combined transcriptomic and proteomic approaches. *PLoS One*. 2018;13(8):e0200628.

Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*. 2007;7(1):214.

Duhaiman AS, Alhomida AS, Rabbani N, Kamal MA, Al-Jafari AA. Purification and characterization of acetylcholinesterase from desert cobra (*Walterinnesia aegyptia*) venom. *Biochimie*. 1996;78(1):46-50.

El-Amouri SS, Zhu H, Yu J, Marr R, Verma IM, Kindy MS. Neprilysin: an enzyme candidate to slow the progression of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2008;172(5):1342-54.

El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, et al. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D427-32.

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.

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

Frobert Y, Créminon C, Cousin X, Rémy M-H, Chatel J-M, Bon S, et al. Acetylcholinesterases from Elapidae snake venoms: biochemical, immunological and enzymatic characterization. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1339(2):253-67.

Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2012;28(23):3150-2.

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.

Fukushima CS, Bertani R. Taxonomic revision and cladistic analysis of *Avicularia* Lamarck, 1818 (Araneae, Theraphosidae, Aviculariinae) with description of three new aviculariine genera. *Zookeys*. 2017;(659):1-185.

Fuzita FJ, Pinkse MWH, Patane JSL, Juliano MA, Verhaert PDEM, Lopes AR. Biochemical, transcriptomic and proteomic analyses of digestion in the scorpion *Tityus serrulatus*: insights into function and evolution of digestion in an ancient arthropod. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123841.

Garb JE, Sharma PP, Ayoub NA. Recent progress and prospects for advancing arachnid genomics. *Curr Opin Insect Sci*. 2018;25:51-7.

Garwood RJ, Dunlop JA, Selden PA, Spencer AR, Atwood RC, Vo NT, et al. Almost a spider: a 305-million-year-old fossil arachnid and spider origins. *Proc Biol Sci*. 2016;283(1827):20160125.

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.

Girish KS, Kemparaju K. A low molecular weight isoform of hyaluronidase: purification from Indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70(6):708-12.

González-Morales L, Diego-García E, Segovia L, Carmen Gutiérrez Md, Possani LD. Venom from the centipede *Scolopendra viridis* Say: purification, gene cloning and phylogenetic analysis of a phospholipase A2. *Toxicon*. 2009;54(1):8-15.

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.

Graf B, Nentwig W. Ontogenetic change in coloration and web-building behavior in the tropical spider *Eriophora fuliginea* (Araneae, Araneidae). *J Arachnol*. 2001;29(1):104-10.

Gremski LH, Trevisan-Silva D, Ferrer VP, Matsubara FH, Meissner GO, Wille ACM, 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.

Hardy MC, Daly NL, Mobli M, Morales RA, King GF. Isolation of an orally active insecticidal toxin from the venom of an Australian tarantula. *PLoS One*. 2013;8(9):e73136.

He Q-Y, He Q-Z, Deng X-C, Yao L, Meng E, Liu Z-H, et al. ATDB: a uni-database platform for animal toxins. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Database issue):D293-7.

Helfrich P, Rieb E, Abrami G, Lücking A, Mehler A. TreeAnnotator: versatile visual annotation of hierarchical text relations. In: *Proceedings of the Eleventh International Conference on Language Resources and Evaluation*; 2018; Miyazaki. Japan: European Language Resources Association; 2018. p. 1958-63.

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.

Herzig V, Chen YC, Chin YK, Dekan Z, Chang YW, Yu HM, et al. The tarantula toxin ω -Avsp1a specifically inhibits human Cav3.1 and Cav3.3 via the extracellular S3-S4 loop of the domain 1 voltage-sensor. *Biomedicines.* 2022;10(5):1066.

Holford M, Daly M, King GF, Norton RS. Venoms to the rescue. *Science.* 2018;361(6405):842-4.

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

Horta CCR, Magalhães BdF, Oliveira-Mendes BBR, do Carmo AO, Duarte CG, Felicori LF, et al. Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(2):e2693.

Ikonomopoulou MP, Smith JJ, Herzig V, Pineda SS, Dziemborowicz S, Er SY, et al. Isolation of two insecticidal toxins from venom of the Australian theraphosid spider *Coremiocnemis tropix*. *Toxicon.* 2016;123:62-70.

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.

Jiang L, Zhang D, Zhang Y, Peng L, Chen J, Liang S. Venomics of the spider *Ornithoctonus huwena* based on transcriptomic versus proteomic analysis. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2010;5(2):81-8.

Jin L, Fang M, Chen M, Zhou C, Ombati R, Hakim MA, et al. An insecticidal toxin from *Nephila clavata* spider venom. *Amino Acids.* 2017;49(7):1237-45.

Jung HJ, Kim PI, Lee SK, Lee CW, Eu YJ, Lee DG, 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.

Junqueira-de-Azevedo IdLM, Pertinhez T, Spisni A, Carreño FR, Farah CS, Ho PL. Cloning and expression of calglandulin, a new EF-hand protein from the venom glands of *Bothrops insularis* snake in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1648(1-2):90-8.

Kaiser E. The enzymatic activity of spider venom on the influence of sulfonated polysaccharides on the proteolytic and hyaluronic acid splitting activity of spider venom. *Mem Inst Butantan*. 1953;25(1):35-9.

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.

Khusro A, Aarti C, Barbabosa-Pliego A, Rivas-Cáceres RR, Cipriano-Salazar M. Venom as therapeutic weapon to combat dreadful diseases of 21st century: a systematic review on cancer, TB, and HIV/AIDS. *Microb Pathog*. 2018;125:96-107.

Kierszenbaum AL, Lea O, Petrusz P, French FS, Tres LL. Isolation, culture, and immunocytochemical characterization of epididymal epithelial cells from pubertal and adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78(3):1675-9.

Kimura T, Ono S, Kubo T. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the cDNAs Encoding Toxin-Like Peptides from the Venom Glands of *Tarantula Grammostola rosea*. *Int J Pept*. 2012;2012:731293.

King GF, Gentz MC, Escoubas P, Nicholson GM. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon*. 2008;52(2):264-76.

King GF. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11(11):1469-84.

King GF, Hardy MC. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. *Annu Rev Entomol*. 2013;58(1):475-96.

Kiyatkin NI, Dulubova IE, Chekhovskaya IA, Grishin EV. Cloning and structure of cDNA encoding α -latrotoxin from black widow spider venom. *FEBS Lett*. 1990;270(1-2):127-31.

Koua D, Mary R, Ebou A, Barrachina C, El Koulali K, Cazals G, et al. Proteotranscriptomic insights into the venom composition of the wolf spider *Lycosa tarantula*. *Toxins (Basel)*. 2020;12(8):501.

Kozlov SA, Vassilevski AA, Feofanov AV, Surovoy AY, Karpunin DV, Grishin EV. Latareins, antimicrobial and cytolytic 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, 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. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(12):2651-68.

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, Langenegger N, Heller M, Koua D, Nentwig W. The dual prey-inactivation strategy of spiders-in-depth venom analysis of *Cupiennius salei*. *Toxins (Basel)*. 2019;11(3):167.
- Langenegger N, Nentwig W, Kuhn-Nentwig L. Spider venom: components, modes of action, and novel strategies in transcriptomic and proteomic analyses. *Toxins (Basel)*. 2019;11(10):611.
- 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.
- Li W, Godzik A. CD-HIT: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2006;22(13):1658-9.
- Lian W, Lian H, Li Q, Hu A, Liu S. The venom of spider *Haplopelma hainanum* suppresses proliferation and induces apoptosis in hepatic cancer cells by caspase activation in vitro. *J Ethnopharmacol*. 2018;225:169-77.
- Liang S. An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)]. *Toxicon*. 2004;43(5):575-85.
- Liao Z, Cao J, Li S, Yan X, Hu W, He Q, et al. Proteomic and peptidomic analysis of the venom from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Proteomics*. 2007;7(11):1892-907.
- Ma H, Xiao-Peng T, Yang SL, Lu QM, Lai R. Protease inhibitor in scorpion (*Mesobuthus eupeus*) venom prolongs the biological activities of the crude venom. *Chin J Nat Med*. 2016;14(8):607-14.
- Ma L, Chin YKY, Dekan Z, Herzig V, Chow CY, Heighway J, et al. Novel venom-derived inhibitors of the human EAG channel, a putative antiepileptic drug target. *Biochem Pharmacol*. 2018;158:60-72.
- Magalhães, MR. Caracterização de enzimas em peçonhas animais: identificação de fosfolipases do escorpião *Hadrurus gerstchi* e atividades enzimáticas da arraia *Potamotrygon falkneri*. [tese (Doutorado em Biologia Animal)]. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília; 2017.
- Marković-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Müller U, Schirmer T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure*. 2000;8(10):1025-35.
- Martinez PA, Gutiérrez JM, Olalla-Tárraga M, Amado TF. Venomous animals in a changing world. *Global Change Biol*. 2022;28(12):3750-3.
- Masood R, Ullah K, Ali H, Ali I, Betzel C, Ullah A. Spider's venom phospholipases D: A structural review. *Int J Biol Macromol*. 2018; 107(Pt A):1054-65.
- McCormick J, Li Y, McCormick K, Duynstee HI, van Engen AK, van der Marel GA, et al. Structure and total synthesis of HF-7, a neuroactive glyconucleoside disulfate from the funnel-web spider *Hololena curta*. *J Am Chem Soc*. 1999;121(24):5661-5.

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

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

Nalivaeva NN, Turner AJ. Neprilysin. In: Rawlings ND, Salvesen G, editors. *Handbook of proteolytic enzymes*. 2nd ed. London: Academic Press; 2013. vol. 1, p. 612-9.

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.

Nascimento SM, de Oliveira UC, Nishiyama-Jr MY, Tashima AK, Silva Junior PI. Presence of a neprilysin on *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae: Theraphosidae) venom. *Toxin Rev*. 2021;41(2):370-9.

Nascimento SM, Roa AD, Mendonça RZ, Silva Junior PI. How a tarantula can help treat infections: *Avicularia juruensis*'s theraphotoxins that also act as antimicrobials. 2022. bioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>.

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

Nentwig W, Ansorg J, Bolzern A, Frick H, Ganske A-S, Hänggi A, et al. All you need to know about spiders. Cham: Springer Nature Switzerland; 2022. 245 p.

Nicholson GM. Spider peptides. In: Kastin AJ, editor. *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed. Boston: Academic Press; 2013. p. 461-72.

Nobile M, Noceti F, Prestipino G, Possani LD. Helothermine, a lizard venom toxin, inhibits calcium current in cerebellar granules. *Exp Brain Res*. 1996;110(1):15-20.

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

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

Oh AMF, Tan CH, Tan KY, Quraishi NH, Tan NH. Venom proteome of *Bungarus sindanus* (Sind krait) from Pakistan and in vivo cross-neutralization of toxicity using an Indian polyvalent antivenom. *J Proteomics*. 2019;193:243-54.

Oldrati V, Koua D, Allard P-M, Hulo N, Arrell M, Nentwig W, et al. Peptidomic and transcriptomic profiling of four distinct spider venoms. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172966.

- Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol*. 2012;32(2):143-71.
- Pérez-Miles F, Perafán C. Behavior and biology of Mygalomorphae. In: Viera C, Gonzaga MO, editors. *Behaviour and ecology of spiders: Contributions from the neotropical region*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 29-54.
- Perumal Samy R, Stiles BG, Franco OL, Sethi G, Lim LHK. Animal venoms as antimicrobial agents. *Biochem Pharmacol*. 2017;134:127-38.
- Pessini AC, Takao TT, Cavaleiro EC, Vichnewski W, Sampaio SV, Giglio JR, et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*. 2001;39(10):1495-504.
- 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.
- Pimentel C, Choi SJ, Chagot B, Guette C, Camadro JM, Darbon H. Solution structure of PcFK1, a spider peptide active against *Plasmodium falciparum*. *Protein Sci*. 2006;15(3):628-34.
- 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.
- Pineda SS, Undheim EAB, Rupasinghe DB, Ikonopoulou MP, King GF. Spider venomics: implications for drug discovery. *Future Med Chem*. 2014;6(15):1699-714.
- Pineda SS, Chaumeil P-A, Kunert A, Kaas Q, Thang MWC, Le L, et al. ArachnoServer 3.0: an online resource for automated discovery, analysis and annotation of spider toxins. *Bioinformatics*. 2018;34(6):1074-6.
- Quay T, Slaughter C, Davis TP, Merrill BJ, Hersh LB. Positional effects in the neprilysin (neutral endopeptidase) reaction. *Arch Biochem Biophys*. 1994;308(1):133-6.
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior summarization in bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol*. 2018;67(5):901-4.
- Reis PVM, Boff D, Verly RM, Melo-Braga MN, Cortés ME, Santos DM, et al. LyeTxI-b, a synthetic peptide derived from *Lycosa erythrognatha* spider venom, shows potent antibiotic activity in vitro and in vivo. *Front Microbiol*. 2018;9:667.
- Richardson M, Pimenta AMC, Bemquerer MP, Santoro MM, Beirao PSL, Lima ME, et al. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006;142(3-4):173-87.
- 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.

Rodríguez-Rios L, Díaz-Peña LF, Lazcano-Pérez F, Arreguín-Espinosa R, Rojas-Molina A, García-Arredondo A. Hyaluronidase-like enzymes are a frequent component of venoms from theraphosid spiders. *Toxicon*. 2017;136:34-43.

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

Rokyta DR, Ward MJ. Venom-gland transcriptomics and venom proteomics of the black-back scorpion (*Hadrurus spadix*) reveal detectability challenges and an unexplored realm of animal toxin diversity. *Toxicon*. 2017;128:23-37.

Romano J, Nwankwo V, Tatonetti N. VenomKB v2.0: A knowledge repository for computational toxinology. 2018. bioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/295204>.

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

Sabatier J-M, De Waard M, Kastin AJ. Animal toxins. In: Kastin AJ, editor. Handbook of biologically active peptides. 2nd ed. Boston: Academic Press; 2013. p. 407-15.

Sade YB, Bóia-Ferreira M, Gremski LH, da Silveira RB, Gremski W, Senff-Ribeiro A, et al. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(1):170-7.

Santibáñez-López CE, Cid-Urbe IJ, Batista VC, Ortiz E, Possani DL. Venom gland transcriptomic and proteomic analyses of the enigmatic scorpion *Superstitionia donensis* (Scorpiones: Superstitioniidae), with insights on the evolution of its venom components. *Toxins (Basel)*. 2016; 8(12):367.

Santibáñez-López CE, Cid-Urbe JI, Zamudio FZ, Batista CVF, Ortiz E, Possani LD. Venom gland transcriptomic and venom proteomic analyses of the scorpion *Megacormus gertschi* Díaz-Najera, 1966 (Scorpiones: Euscorpidae: Megacorminae). *Toxicon*. 2017;133:95-109.

Santos AJ, Brescovit AD, de Oliveira-Tomasi M, Russo P, Oliveira U. Curves, maps and hotspots: the diversity and distribution of Araneomorph spiders in the neotropics. In: Viera C, Gonzaga MO, editors. Behaviour and ecology of spiders: Contributions from the neotropical region. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 1-28.

Santos-Filho NA. Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A2 ácida tóxica isolada de peçonha de *Bothrops moojeni*. [dissertação (Mestrado em Toxicologia)]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2009.

Schroeder FC, Taggi AE, Gronquist M, Malik RU, Grant JB, Eisner T, et al. NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(38):14283-7.

Senff-Ribeiro A. Translationally controlled tumor protein (TCTP/HRF) in animal venoms. TCTP/tpt1 - Remodeling signaling from stem cell to disease. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 193-200.

Shen HW, Xie Y, Ye SL, He KC, Yi L, Cui RR. Spider peptide toxin Lycosin-I induces apoptosis and inhibits migration of prostate cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(8):725-35.

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 LM, Carvalho Botelho AC, Nacif-Pimenta R, Martins GF, Alves LC, Brayner FA, et al. Structural analysis of the venom glands of the armed spider *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891): microanatomy, fine structure and confocal observations. *Toxicon*. 2008;51(4):693-706.

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.

Stothard P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*. 2000;28(6):1102-4.

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

Taggi AE, Meinwald J, Schroeder FC. A new approach to natural products discovery exemplified by the identification of sulfated nucleosides in spider venom. *J Am Chem Soc*. 2004;126(33):10364-9.

Tan L, Bai L, Wang L, He L, Li G, Du W, et al. Antifungal activity of spider venom-derived peptide Lycosin-I against *Candida tropicalis*. *Microbiol Res*. 2018;216:120-8.

Tang X, Zhang Y, Hu W, Xu D, Tao H, Yang X, et al. Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses. *J Proteome Res*. 2010;9(5):2550-64.

The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D204-12.

Thorp JH, Rogers DC. Introduction to the Phylum Arthropoda. In: Thorp JH, Rogers DC, editors. Thorp and Covich's freshwater invertebrates. 4th ed. Boston: Academic Press; 2015. vol.1, p. 591-7.

Udby L, Calafat J, Sørensen OE, Borregaard N, Kjeldsen L. Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils. *J Leukoc Biol*. 2002;72(3):462-9.

Undheim EAB, Sunagar K, Herzig V, Kely L, Low DHW, Jackson TNW, et al. A proteomics and transcriptomics investigation of the venom from the barychelid spider *Trittame loki* (brush-foot trapdoor). *Toxins* (Basel). 2013;5(12):2488-503.

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

Wang RL, Yi S, Liang SP. Mechanism of action of two insect toxins huwentoxin-III and hainantoxin-VI on voltage-gated sodium channels. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010;11(6):451-7.

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 2009;25(9):1189-91.

Wheeler TJ, Eddy SR. nhmmer: DNA homology search with profile HMMs. *Bioinformatics*. 2013;29(19):2487-9.

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

Wong ES, Hardy MC, Wood D, Bailey T, King GF. SVM-based prediction of propeptide cleavage sites in spider toxins identifies toxin innovation in an Australian tarantula. *PLoS One*. 2013;8(7):e66279.

World Spider Catalog. [Internet]. Natural History Museum Bern. [2022 Oct 02]. Available from: <https://wsc.nmbe.ch/>.

Wulschleger B, Kuhn-Nentwig L, Tromp J, Kämpfer U, Schaller J, Schürch S, et al. CSTX-13, a highly synergistically acting two-chain neurotoxic enhancer in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(31):11251-6.

Wulschleger 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 Z, Zhang Y, Zeng J, Liang S, Tang C, Liu Z. Purification and characterization of a novel insecticidal toxin, μ -sparatoxin-Hv2, from the venom of the spider *Heteropoda venatoria*. *Toxins*. 2018;10(6):233.

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, Su YC, Ho SYW, Kuntner M, Ono H, Liu F, et al. Phylogenomic analysis of ultraconserved elements resolves the evolutionary and biogeographic history of segmented trapdoor spiders. *Syst Biol*. 2021;70(6):1110-22.

Yamazaki Y, Koike H, Sugiyama Y, Motoyoshi K, Wada T, Hishinuma S, et al. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. *Eur J Biochem.* 2002;269(11):2708-15.

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

Yang X, Wang Y, Wu C, Ling EA. Animal venom peptides as a treasure trove for new therapeutics against neurodegenerative disorders. *Curr Med Chem.* 2019;26(25):4749-74.

Yuan CH, He QY, Peng K, Diao JB, Jiang LP, Tang X, et al. Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. *PLoS One.* 2008;3(10):e3414.

Zobel-Thropp PA, Kerins AE, Binford GJ. Sphingomyelinase D in sicariid spider venom is a potent insecticidal toxin. *Toxicon.* 2012;60(3):265-71.

Zobel-Thropp PA, Correa SM, Garb JE, Binford GJ. Spit and venom from *Scytodes* spiders: a diverse and distinct cocktail. *Journal of Proteome Research.* 2014;13(2):817-35.

APÊNDICE A - Tabela

Apêndice I - Tabela: Toxinas com as quais os transcritos da categoria “Componente de veneno” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp.

Apêndice II - Tabela: CRISPs com as quais os transcritos da categoria “CRISP” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp.

Apêndice III - Tabela: Enzimas com as quais os transcritos das categorias “Fosfolipase A”, “Fosfolipase D” e “Hialuronidase” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp.

Apêndice IV - Tabela: Neprilisina com a qual os transcritos das categorias “Neprilisina” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp.

Apêndice V - Tabela: Toxinas com as quais os transcritos das categorias “Teráfotoxina” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp.

A. I - Toxinas com as quais os transcritos da categoria “Componente de veneno” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	e-value	Expressão gênica dentro da categoria
BLTX228	A0A076KZ59	<i>Nephila pilipes</i>	Não conhecida	Ajur8384 Ajur21511 Ajur25684	2,00E-18 5,00E-14 1,00E-11	0,2310%
BLTX669	A0A076L0S4	<i>Nephila pilipes</i>	Não conhecida	Ajur17621 Ajur48290	5,00E-18 1,00E-15	0,8675%
<i>Carboxylic ester hydrolase</i>	A0A087SW65	<i>Stegodyphus mimosarum</i>	Acetilcolinesterase	Ajur1413	1,00E-165	0,8521%
<i>Chymotrypsin inhibitor-like</i>	XP_018362656.1	<i>Trachymyrmex cornetzi</i>	Inibidor enzimático	Ajur23233 Ajur24070	2,00E-13 4,00E-14	5,7016%
<i>Cystatin-1</i>	B1P1J3	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Inibidor enzimático	Ajur7877 Ajur15507	5,00E-57 4,00E-46	3,6776%
<i>EF-hand protein-like protein</i>	B5M6G5	<i>Haplopelma schmidti</i>	Papel na secreção de toxinas	Ajur3310 Ajur11434	1,00E-128 6,00E-123	19,5719%
<i>Endothelin-converting enzyme 1</i>	A0A087TKV4	<i>Stegodyphus mimosarum</i>	Metaloendopeptidase	Ajur48047	1,00E-54	0,0212%
<i>Kunitz-type serine protease inhibitor spermatin</i>	C11C52	<i>Walterinnesia aegyptia</i>	Inibidor de serino protease	Ajur18807	7,00E-14	0,4029%
<i>Peptidase-like protein</i>	D5J6Y4	<i>Pelinobius muticus</i>	Metaloendopeptidase	Ajur5037 Ajur5674 Ajur19434	1,00E-71 1,00E-56 2,00E-48	0,4677%

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Continua na página 116.

Continuação da Tabela A. I.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	e-value	Expressão gênica dentro da categoria
<i>Spider venom protein NPTX_C771</i>	A0A1X9PY11	<i>Nephila pilipes</i>	Não conhecida	Ajur29594	1,00E-39	0,1073%
TCTP1-1	M5B4R7	<i>Grammostola rosea</i>	Causa edema e inflamação e aumenta a permeabilidade vascular	Ajur8701 Ajur10276	2,00E-121 1,00E-122	52,9086%
<i>Toxin-like protein 14</i>	XP_015924724.1	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	Não conhecida	Ajur13814 Ajur15625 Ajur20339 Ajur23665	2,00E-18 2,00E-14 2,00E-11 1,00E-13	6,3687%
U1-hexatoxin-Iw1e	Q5D232	<i>Illawarra wisharti</i>	Não conhecida	Ajur9290	6,00E-07	7,7908%
U24-ctenitoxin-Pn1a	XP_015916297.1	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	Não conhecida	Ajur12508	2,00E-59	0,3764%
U3-aranetoxin-Ce1a-like	XP_015928445.1	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	Não conhecida	Ajur60093	3,00E-08	0,0185%
U8-agatoxin-Ao1a-like	XP_015909154.1	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	Não conhecida	Ajur13904	6,00E-45	0,0368%
<i>Venom peptide SjAPI-2-like</i>	XP_023229070.1	<i>Centruroides sculpturatus</i>	Provável inibidor enzimático	Ajur18753	1,00E-07	0,5995%

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Legenda: A Tabela também mostra as espécies nas quais as toxinas foram identificadas, seu ID e sua função. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. O e-value é respectivo aos resultados das buscas realizadas utilizando-se BLASTp e as porcentagens de expressão gênica se referem ao conjunto dos transcritos que possuem similaridade com uma mesma toxina.

A. II - CRISPs com as quais os transcritos da categoria “CRISP” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp.

Toxina	NCBI ou <i>Uniprot</i> ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	<i>e-value</i>	Expressão gênica dentro da categoria
GTx-VA1	M5AWW7	<i>Grammostola rosea</i>	Não conhecida	Ajur5422 Ajur39949	2,00E-139 2,00E-69	99,9874%
GTx-CRISP1	M5AYF1	<i>Grammostola rosea</i>	Não conhecida	Ajur5801	2,00E-104	0,0127%

*De acordo com dados disponíveis no *Uniprot* e NCBI.

Legenda: A Tabela também mostra a espécie na qual as CRISPs foram identificadas, seu ID e sua função. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. O *e-value* é respectivo aos resultados das buscas realizadas utilizando-se BLASTp e as porcentagens de expressão gênica se referem ao conjunto dos transcritos que possuem similaridade com uma mesma CRISP.

A. III - Enzimas com as quais os transcritos das categorias “Fosfolipase A”, “Fosfolipase D” e “Hialuronidase” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	e-value	Expressão gênica dentro da categoria
Fosfolipases A						
<i>Phospholipase A2</i>	A0A087TLC5	<i>Stegodyphus mimosarum</i>	Hidrólise de lipídeos	Ajur7374 Ajur8771	7,00E-09 2,00E-29	97,6054%
<i>Phospholipase A2</i>	A0A087UYN9	<i>Stegodyphus mimosarum</i>	Hidrólise de lipídeos	Ajur7500	6,00E-73	1,1997%
<i>Phospholipase A2</i>	A0A087UYP4	<i>Stegodyphus mimosarum</i>	Hidrólise de lipídeos	Ajur10234	5,00E-69	1,1948%
Fosfolipases D						
<i>Phospholipase D</i>	XP_021003386.1	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	Clivagem da ligação fosfodiéster	Ajur15997	4,00E-53	41,7857%
<i>Phospholipase D</i>	C0JB91	<i>Sicarius albospinosus</i>	Clivagem da ligação fosfodiéster	Ajur29642	2,00E-49	58,2143%
Hialuronidases						
<i>Hyaluronidase</i>	R4J7Z9	<i>Loxosceles intermedia</i>	Degradação de ácido hialurônico puro e de sulfato de condroitina	Ajur2769	2,00E-157	90,9204%
<i>Hyaluronidase</i>	J9XYC6	<i>Brachypelma vagans</i>	Hidrólise aleatória de hialuronato	Ajur4195	8,00E-155	9,0796%

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Legenda: A Tabela também mostra as espécies nas quais as enzimas foram identificadas, seu ID e sua função. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. O e-value é respectivo aos resultados das buscas realizadas utilizando-se BLASTp e as porcentagens de expressão gênica se referem ao conjunto dos transcritos que possuem similaridade com uma mesma enzima.

A. IV - Neprilisina com a qual os transcritos das categorias “Neprilisina” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp.

Toxina	NCBI ou <i>Uniprot</i> ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	<i>e-value</i>	Expressão gênica dentro da categoria
<i>Neprilysin-1</i>	W4VS99	<i>Trittame loki</i>	Metaloprotease	Ajur479	4,00E-126	0,0014%
				Ajur2049	2,00E-162	0,0020%
				Ajur27716	4,00E-73	99,9965%

*De acordo com dados disponíveis no *Uniprot* e NCBI.

Legenda: A Tabela também mostra a espécie na qual a neprilisina foi identificada, seu ID e sua função. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. O *e-value* é respectivo aos resultados das buscas realizadas utilizando-se BLASTp e as porcentagens de expressão gênica se referem a cada um dos transcritos em relação ao total de expressão gênica da categoria “Neprilisina”.

A. V - Toxinas com as quais os transcritos das categorias “Terafotoxina” apresentaram similaridade, de acordo com as buscas realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	e-value	Expressão gênica dentro da categoria
Delta (δ) terafotoxina						
<i>δ-theraphotoxin-Hm1a</i>	P60992	<i>Heteroscodra maculata</i>	Inibe a inativação de canais de sódio	Ajur801	7,00E-09	0,0048%
				Ajur7184	2,00E-12	
				Ajur7426	1,00E-09	
				Ajur9780	4,00E-12	
				Ajur15581	1,00E-12	
				Ajur15583	2,00E-12	
				Ajur50755	1,00E-11	
Kappa (κ) terafotoxina						
<i>HW11c117 toxin</i>	A0A023WB47	<i>Haplopelma schmidti</i>	Regula a atividade de canais de potássio	Ajur15194	1,00E-22	2,3207%
<i>HW11c57 toxin</i>	A0A023WAD7	<i>Haplopelma schmidti</i>	Regula a atividade de canais de potássio	Ajur46234	1,00E-31	0,0001%
<i>κ-theraphotoxin-Cg1a</i>	B1P1E1	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Ação sobre canais iônicos de sódio e de potássio	Ajur16334	1,00E-10	0,0868%
				Ajur16846	1,00E-10	
				Ajur17429	1,00E-10	
				Ajur34297	2,00E-16	
<i>κ-theraphotoxin-Cg1b</i>	B1P1A0	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur27651	5,00E-08	0,0016%

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Continua na página 121.

Continuação da Tabela A. V.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	e-value	Expressão gênica dentro da categoria
Kappa (κ) terafotoxina						
κ -theraphotoxin-Gr1c	M5AYA8	<i>Grammostola rosea</i>	Inibidora de canal iônico	Ajur9953 Ajur10070 Ajur11406 Ajur12081	7,00E-08 9,00E-08 7,00E-08 2,00E-07	1,8412%
κ -theraphotoxin-Gr1d	M5AWS0	<i>Grammostola rosea</i>	Inibidora de canal iônico	Ajur8589 Ajur11007	1,00E-07 5,00E-13	0,3882%
Ômega (ω) terafotoxina						
ω -theraphotoxin-Bs2a	B3FIV1	<i>Brachypelma smithi</i>	Inibidora de canal iônico	Ajur13600	1,00E-47	0,0006%
ω -theraphotoxin-Hhn1c	D2Y2F1	<i>Haplopelma hainanum</i>	Inibidora de canal iônico	Ajur7906	2,00E-17	0,0016%
ω -theraphotoxin-Hhn1d	D2Y2L5	<i>Haplopelma hainanum</i>	Inibidora de canal iônico	Ajur12147	2,00E-08	0,0408%
ω -theraphotoxin-Hhn1f2	D2Y2E8	<i>Haplopelma hainanum</i>	Inibidora de canal iônico	Ajur26957 Ajur40422	1,00E-06 1,00E-06	0,4498%
ω -theraphotoxin-Hhn1f3	D2Y2E9	<i>Haplopelma hainanum</i>	Inibidora de canal iônico	Ajur10185 Ajur15302 Ajur18745	7,00E-21 1,00E-17 2,00E-21	0,0152%
Pi (π) terafotoxina						
Asic1a Blocker Pctx1	P60514	<i>Psalmopoeus cambridgei</i>	Inibidora de canal ASIC1a e potencializadora de ASIC1b	Ajur14901	8,00E-20	0,0528%

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Continua na página 122.

Continuação da Tabela A. V.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	e-value	Expressão gênica dentro da categoria
Tau (τ) terafotoxina						
τ -theraphotoxin-Gr1b	H7CEK6	<i>Grammostola rosea</i>	Inibidora de canal iônico	Ajur12532	5,00E-09	0,2146%
Unknown terafotoxina						
U1-theraphotoxin-Ap1a	B3EWY4	<i>Acanthoscurria paulensis</i>	Neurotoxina. Causa paralisia em larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	Ajur18925	1,00E-62	0,0100%
U1-theraphotoxin-Ct1a	P0DL77	<i>Coremiocnemis tropix</i>	Provável inibidora de canais de cálcio dependentes de voltagem	Ajur31698 Ajur7876 Ajur9513 Ajur12670 Ajur15488 Ajur23663	1,00E-13 1,00E-36 6,00E-34 6,00E-34 4,00E-34 5,00E-23	2,3874%
U1-theraphotoxin-Gr1a	M5AXM9	<i>Grammostola rosea</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur17940 Ajur22142 Ajur22413 Ajur33665 Ajur36931 Ajur39950	1,00E-18 2,00E-19 1,00E-15 3,00E-18 1,00E-14 2,00E-20	10,2107%
U1-theraphotoxin-Gr1b	H7CEK7	<i>Grammostola rosea</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur436 Ajur2402 Ajur2592	1,00E-17 1,00E-21 8,00E-23	46,9233%

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Continua na página 123.

Continuação da Tabela A. V.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	e-value	Expressão gênica dentro da categoria
U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b	H7CEK7	<i>Grammostola rosea</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur8088	9,00E-22	46,9233%
				Ajur9199	8,00E-21	
				Ajur12373	2,00E-18	
				Ajur12428	1,00E-19	
				Ajur16710	1,00E-12	
				Ajur17239	3,00E-21	
				Ajur17662	4,00E-20	
				Ajur18214	2,00E-24	
				Ajur20541	7,00E-22	
				Ajur20614	8,00E-13	
				Ajur27404	6,00E-17	
				Ajur27519	6,00E-25	
				Ajur33502	2,00E-19	
				Ajur33666	7,00E-21	
				Ajur35757	2,00E-22	
				Ajur36128	6,00E-24	
				Ajur38746	2,00E-23	
				Ajur39230	9,00E-22	
				Ajur40186	2,00E-20	
				Ajur42786	3,00E-18	
Ajur43329	1,00E-19					
Ajur43330	1,00E-18					

*De acordo com dados disponíveis no *Uniprot* e NCBI.

Continua na página 124.

Continuação da Tabela A. V.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	e-value	Expressão gênica dentro da categoria
U1- <i>theraphotoxin</i> -Gr1b	H7CEK7	<i>Grammostola rosea</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur50393	1,00E-13	46,9233%
				Ajur62390	5,00E-11	
				Ajur62391	1,00E-09	
				Ajur62940	6,00E-07	
U1- <i>theraphotoxin</i> -Pc1a	P0C201	<i>Psalmopoeus cambridgei</i>	Atividade antiplasmodial	Ajur10186	3,00E-35	0,1928%
				Ajur11474	1,00E-17	
				Ajur12305	5,00E-36	
				Ajur12559	5,00E-36	
				Ajur12560	6,00E-35	
				Ajur12705	6,00E-22	
				Ajur23412	2,00E-15	
U2- <i>theraphotoxin</i> -Cg1b 1	B1P1G6	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur14155	7,00E-08	0,8090%
				Ajur14829	3,00E-08	
U2- <i>theraphotoxin</i> -Cg1b 2	B1P1G7	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur1257	6,00E-13	0,2188%
				Ajur7185	1,00E-12	
U2- <i>theraphotoxin</i> -Pc1a	P0C202	<i>Psalmopoeus cambridgei</i>	Atividade antiplasmodial	Ajur13593	2,00E-22	1,0002%
U3- <i>theraphotoxin</i> -Cg1b	B1P1A7	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur8858	3,00E-35	1,5272%
				Ajur8956	4,00E-37	
				Ajur11091	8,00E-35	
				Ajur15487	8,00E-35	
				Ajur19542	1,00E-35	

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Continua na página 125.

Continuação da Tabela A. V.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	e-value	Expressão gênica dentro da categoria
U3-theraphotoxin-Cg1b	B1P1A7	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur33342 Ajur41160 Ajur41161	3,00E-24 1,00E-28 5,00E-29	1,5272%
U3-theraphotoxin-Gr1b	M5AXL3	<i>Grammostola rosea</i>	Não conhecida	Ajur36538 Ajur54304	3,00E-19 1,00E-22	0,0032%
U3-theraphotoxin-Gr1d	M5B4R0	<i>Grammostola rosea</i>	Não conhecida	Ajur63098	5,00E-08	0,0002%
U3-theraphotoxin-Pm1a	D5J6Y1	<i>Pelinobius muticus</i>	Não conhecida	Ajur10149 Ajur14161 Ajur15352 Ajur15586 Ajur20182 Ajur29738	3,00E-39 2,00E-17 6,00E-38 3,00E-38 7,00E-35 4,00E-23	0,0432%
U4-theraphotoxin-Pf15	A0A1V0FWG8	<i>Poecilotheria formosa</i>	Não conhecida	Ajur22964	4,00E-09	0,0545%
U5-theraphotoxin-Cg1a	B1P1B3	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Não conhecida	Ajur10845 Ajur18923	3,00E-12 3,00E-12	0,1261%
U5-theraphotoxin-Gr1d	M5AXQ8	<i>Grammostola rosea</i>	Não conhecida	Ajur11808 Ajur16243	5,00E-32 5,00E-32	1,3750%
U5-theraphotoxin-Gr1e	H7CEL1	<i>Grammostola rosea</i>	Não conhecida	Ajur34030	5,00E-20	0,0013%
U5-theraphotoxin-Hhn1a	D2Y2C3	<i>Haplopelma hainanum</i>	Inibidora de canais de sódio dependente de voltagem	Ajur43070 Ajur54299	2,00E-17 2,00E-21	0,8863%

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Continua na página 126.

Continuação da Tabela A. V.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	e-value	Expressão gênica dentro da categoria
U6- <i>theraphotoxin-Hhn1a 1</i>	D2Y2C1	<i>Haplopelma hainanum</i>	Inibidora de canal iônico	Ajur56021	5,00E-11	18,2110%
U7- <i>theraphotoxin-Gr1a</i>	M5AWW2	<i>Grammostola rosea</i>	Não conhecida	Ajur21980 Ajur26638	4,00E-22 1,00E-22	0,0012%
U7- <i>theraphotoxin-Gr1b</i>	I2FKH7	<i>Grammostola rosea</i>	Não conhecida	Ajur20695	5,00E-43	0,0005%
U7- <i>theraphotoxin-Hs3a L8</i>	B2ZBA9	<i>Haplopelma schmidtii</i>	Não conhecida	Ajur4805 Ajur12176	1,00E-29 3,00E-28	0,8234%
U10- <i>theraphotoxin-Cg1a</i>	B1P1D0	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur24452	9,00E-15	0,0004%
U10- <i>theraphotoxin-Hhn1a</i>	D2Y2B6	<i>Haplopelma hainanum</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur11407	1,00E-42	0,4076%
U10- <i>theraphotoxin-Hhn1a.2</i>	D2Y2B7	<i>Haplopelma hainanum</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur14722	3,00E-27	0,0033%
U10- <i>theraphotoxin-Hhn1c</i>	D2Y2B9	<i>Haplopelma hainanum</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur13612	1,00E-42	0,0003%
U11- <i>theraphotoxin-Hs2a</i>	B3FIU1	<i>Haplopelma schmidtii</i>	Não conhecida	Ajur3026 Ajur3464 Ajur4324 Ajur5537 Ajur30108	1,00E-11 1,00E-11 1,00E-11 1,00E-11 2,00E-26	0,0041%
U12- <i>theraphotoxin-Hhn1a</i>	D2Y2C5	<i>Haplopelma hainanum</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur3183 Ajur3532	7,00E-12 7,00E-13	1,4704%

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Continua na página 127.

Continuação da Tabela A. V.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	e-value	Expressão gênica dentro da categoria
U12- <i>theraphotoxin-Hhn1a</i>	D2Y2C5	<i>Haplopelma hainanum</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur4639 Ajur5230 Ajur5563	1,00E-11 6,00E-12 9,00E-12	1,4704%
U13- <i>theraphotoxin-Hs1a</i>	B3FIV0	<i>Haplopelma schmidtii</i>	Não conhecida	Ajur6277 Ajur14477 Ajur36320	1,00E-12 1,00E-15 2,00E-08	0,3341%
U14- <i>theraphotoxin-Hhn1a</i>	D2Y2P2	<i>Haplopelma hainanum</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur19486 Ajur4373	2,00E-28 3,00E-31	0,1500%
U14- <i>theraphotoxin-Hhn1f</i>	D2Y2P0	<i>Haplopelma hainanum</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur26638 Ajur2948	1,00E-24 1,00E-24	0,0029%
U14- <i>theraphotoxin-Hhn1g</i>	D2Y2P1	<i>Haplopelma hainanum</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur5012 Ajur5020 Ajur6468 Ajur6469 Ajur11405 Ajur12146 Ajur12784 Ajur12788 Ajur23484	1,00E-18 1,00E-20 1,00E-28 1,00E-28 2,00E-30 6,00E-25 4,00E-28 3,00E-28 8,00E-24	7,3531%
U20- <i>theraphotoxin-Cg1a</i>	B1P1F9	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur8804 Ajur11058 Ajur13885	1,00E-06 2,00E-06 2,00E-06	0,0415%

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Continua na página 128.

Continuação da Tabela A. V.

Toxina	NCBI ou Uniprot ID	Espécie na qual foi identificada	Função descrita para a toxina*	Transcritos com similaridade	<i>e-value</i>	Expressão gênica dentro da categoria
U22- <i>theraphotoxin-Cg1a</i>	B1P1G8	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur8200 Ajur11545 Ajur12145	5,00E-08 9,00E-11 9,00E-11	0,7516%
U26- <i>theraphotoxin-Cg1a</i>	B1P1H6	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur11093	3,00E-30	0,0325%
U29- <i>theraphotoxin-Cg1a</i>	B1P1I0	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Provável inibidora de canal iônico	Ajur11781	5,00E-24	0,9959%
U35- <i>theraphotoxin-Cg1a</i>	B1P1J4	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Não conhecida	Ajur2819	3,00E-19	0,0023%
U36- <i>theraphotoxin-Cg1a</i>	B1P1J5	<i>Chilobrachys guangxiensis</i>	Provável neurotoxina com atividade inibitória sobre canais iônicos	Ajur10187	9,00E-52	0,0676%

*De acordo com dados disponíveis no Uniprot e NCBI.

Legenda: A Tabela também mostra as espécies nas quais as terafotoxinas foram identificadas, seu ID e sua função. Os transcritos foram nomeados com o prefixo “Ajur” e sua identificação numérica. O *e-value* é respectivo aos resultados das buscas realizadas utilizando-se BLASTp e as porcentagens de expressão gênica se referem ao conjunto dos transcritos que possuem similaridade com uma mesma toxina.

ANEXO A - Artigos científicos de primeira autoria publicados durante o doutorado

Artigo publicado na revista *Toxin Reviews* - Indexada ao *Web of Science* com fator de impacto 3.166



Toxin Reviews



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/itxr20>

Presence of a neprilysin on *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae: Theraphosidae) venom

Soraia Maria do Nascimento , Ursula Castro de Oliveira , Milton Yutaka Nishiyama-Jr , Alexandre Keiji Tashima & Pedro Ismael da Silva Junior

To cite this article: Soraia Maria do Nascimento , Ursula Castro de Oliveira , Milton Yutaka Nishiyama-Jr , Alexandre Keiji Tashima & Pedro Ismael da Silva Junior (2021): Presence of a neprilysin on *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae: Theraphosidae) venom, *Toxin Reviews*

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1878226>

 [View supplementary material](#) 

 Published online: 04 Feb 2021.

 [Submit your article to this journal](#) 

 [View related articles](#) 

 [View Crossmark data](#) 

RESEARCH ARTICLE



Presence of a neprilysin on *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae: Theraphosidae) venom

Soraia Maria do Nascimento^{a,b} , Ursula Castro de Oliveira^a , Milton Yutaka Nishiyama-Jr^a , Alexandre Keiji Tashima^c  and Pedro Ismael da Silva Junior^{a,b} 

^aLaboratory of Applied Toxinology – Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS/CEPID), Butantan Institute, São Paulo, Brazil; ^bPostgraduate Program Interunits in Biotechnology, USP/IBu/IPT, São Paulo, Brazil; ^cDepartment of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Spiders are the most successful and diversified group of venomous animals. Currently, there are more than 49,000 species distributed almost all over the world. This broad distribution suggests that they have efficient strategies to improve their survival; one of them is the production of highly elaborate venoms, which are a heterogeneous mixture of molecules like inorganic salts, peptides, proteins, and enzymes. Considering this, this study aimed to analyze the venom of the spider *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae: Theraphosidae) searching for proteolytic enzymes. Using zymography, electrophoresis, transcriptomics and proteomics approaches we identified one neprilysin able to degrade casein, that we named “Ajur_Neprilysin”. Neprilysins are metalloendopeptidases whose presence has already been described in animal venoms, however, its function has not yet been elucidated. Our results showed for the first time one non-bacterial neprilysin which can cleave casein and suggest that its role in envenomation is to degrade the extracellular matrix, facilitating the access of other toxins to their targets, as well as digestive fluids. Moreover, this discovery contributes to increasing the knowledge about little-studied species, since the Ajur_Neprilysin is the second neprilysin found in the venom from a mygalomorph spider.

ARTICLE HISTORY

Received 8 October 2020
Revised 14 January 2021
Accepted 15 January 2021

KEYWORDS

Avicularia juruensis; spider; venom; neprilysin; casein; metalloendopeptidase

Introduction

Venomous animals are ubiquitous, as they are present in all known animal phyla and inhabit a wide variety of habitats (Holford *et al.* 2018). Their venoms are secretions produced by specialized glands, associated or not with stingers, teeth, or spines (Khusro *et al.* 2018), employed to hunt prey, in intraspecific disputes, and as defense against predators (Fry *et al.* 2009). Their composition consists of a heterogeneous mixture of organic and inorganic molecules that bind to their molecular targets with excellent power, affinity, and selectivity (King 2011, Arbuckle 2017).

Spiders are the most successful venomous animals (Luddecke *et al.* 2019). Their first fossil record dates from 300 million years ago, in the Carboniferous period (Pennisi 2017). Currently, there are more than 49,000 species described (World Spider Catalog 2021), but it is estimated that there exist more than 100,000 species (Pineda *et al.* 2020), which are distributed

across almost all ecological environments, except the open sea and the air (Foelix 2011). Because they depend totally on predation as a trophic tactic for survival, spiders have developed quite complex venoms throughout their evolution (Nicholson 2013). They contain acylpolyamines, low-molecular-mass organic components, peptides, proteins, nucleic acids, amino acids, inorganic salts, monoamines, and enzymes, such as proteases, hyaluronidases, sphingomyelinases, isomerases, and phospholipases (Nicholson 2013, Ferreira *et al.* 2016, Gomes and Palma 2016, Akef 2018).

The neprilysins (NEPs) are metalloendopeptidase-type enzymes composed of approximately 750 amino acid residues (~110 kDa) with an active site that has a zinc binding motif (El-Amouri *et al.* 2008). They have a high preference to cleave the N-terminal bond of hydrophobic amino acids and, in mammals, play a significant role in different biological processes like metabolism of bioactive peptides, modulation of blood pressure, control of neurotransmitter levels,

CONTACT Soraia Maria do Nascimento ✉ soraia.nascimento@usp.br, soraia.mn@gmail.com 📧 Laboratory of Applied Toxinology – Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS/CEPID), Butantan Institute, São Paulo, Brazil

📄 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2021 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

cancer progression, and reproduction (Bland *et al.* 2008). Their presence has been observed in the venoms of the snakes *Ophiophagus hannah*, *Echis pyramidum leakeyi*, *Naja kaouthia*, and *Crotalus horridus* (this last annotated as Snake Venom Metalloproteinase) (Casewell *et al.* 2009, Rokyta *et al.* 2013, Rokyta *et al.* 2015, Tan *et al.* 2015, Tan *et al.* 2017, Kunalan *et al.* 2018); the scorpion *Didymocentrus krausi* (Rojas-Azofeifa *et al.* 2019); the jellyfish *Cyanea capillata* (Liu *et al.* 2015); and the hunting wasps *Eumenes decoratus*, *Anterhynchium flavomarginatum*, and *Sphecidae* sp. (Yoon *et al.* 2020). In spiders, the first identification of a NEP was made in the venom of *Trittame loki* (Undheim *et al.* 2013), and recently, it was also observed in the species *Physocyclus mexicanus*, being the most abundant component (Zobel-Thropp *et al.* 2019).

The role of NEPs in envenomation has not yet been elucidated (Tan *et al.* 2017, Kunalan *et al.* 2018). Some authors believe that they degrade the extracellular matrix around synapses, facilitating the access of toxins to their targets (Undheim *et al.* 2013, Zobel-Thropp *et al.* 2019), while other authors suggest that NEPs are involved with venom neurotoxicity and prey paralysis, due to their activity in the regulation of peptide transmitters and their modulators in nervous systems (Casewell *et al.* 2009, Liu *et al.* 2015, Yoon *et al.* 2020). Thus, the study of venoms is very important to discover their components, as well as to elucidate their functions. However, within spiders, the majority of studies about toxins have been limited to the most dangerous or larger species, especially from the genera *Atrax* and *Hadronyche* (family Atracidae), *Missulena* (Antrodiaetidae), *Sicarius* and *Hexophthalma* (Sicariidae), *Latrodectus* (Theridiidae), and *Phoneutria* (Ctenidae). Concerning family Theraphosidae, the subfamilies Ornithoctoninae, Selenocosmiinae, and Theraphosinae provided the majority of toxins available in databases, which means that the remaining are underrepresented, including Aviculariinae. This subfamily is one that should be prioritized in bioprospecting studies, given the clear bias in the characterization of its toxin sequences, in addition to its evolutionary distance from the other subfamilies (Luddecke *et al.* 2019).

Therefore, in this work, we analyzed the venom of the spider *Avicularia juruensis* (Mello Leitão 1923). This species lives in the Amazon region, being found in Colombia, Ecuador, Peru, and Brazil (Fukushima and Bertani 2017). It has arboreal habits and builds its retreats on tree trunks, the leaves of palm trees, and bromeliads (Bertani 2012). According to P.I.d. Silva

Junior, these retreats are usually close to bird nests, which may serve as food for this spider (personal communication, 19 Dec 2013). Because of these alimentary habits, we believe that its venom has components with proteolytic function. Thus, using zymography, electrophoresis, and transcriptomics and proteomics approaches, we identified a neprilysin able to degrade casein.

Materials and methods

Animals and venom milking

Spiders from the species *A. juruensis* were collected in the cities of Porto Velho and Monte Negro, Rondônia, Brazil, under the Permanent Zoological Material license n°11024-3-IBAMA and Special Authorization for Access to Genetic Patrimony n°010345/2014-0.

They were kept in the bioterium of the Laboratory of Applied Toxinology at Butantan Institute (São Paulo, Brazil) and were fed with cockroaches every 15 days, with water as desired. The room temperature was controlled between 24 °C and 26 °C.

Venom was extracted by electrical stimulation as described by Rocha-e-Silva *et al.* (2009). Firstly, the spiders were anesthetized with CO₂ and immobilized on a special support. The shocks (35 V, 10 Hz for 0.5 ms) were delivered in the chelicera base, and venom was collected directly into a microcentrifuge tube, where the fangs were positioned. In this way, contamination by digestive juice was avoided (Figure 1). After milking, the venom obtained was centrifuged at 2450× g for 10 min at 4 °C; the supernatant was collected, lyophilized, and stored at −80 °C.

This research follows the Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Butantan Institute and was approved on September 21, 2016 (protocol n°CEUAX 5082310816).

Transcriptomic analysis and database assembly

The venom glands of five adult female spiders were removed 72 h after venom milking. They were homogenized in Polytron[®] Tissue Homogenizer, and the total RNA was extracted using TRIzol[™] Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The mRNA was isolated with magnetic beads with an oligo (dT) using a Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™] kit (Thermo). It was quantified using Quant-iT[™] RiboGreen[®] RNA Assay Kit (Thermo), and its integrity was evaluated in a 2100 Bioanalyzer pico chip series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

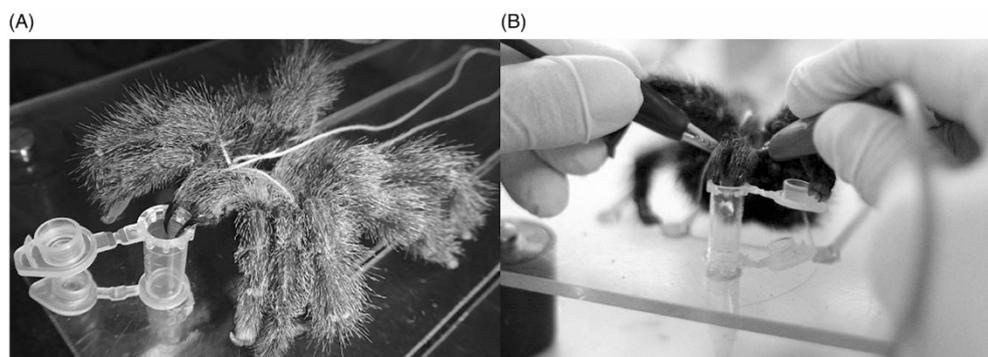


Figure 1. Venom milking from a female *Avicularia juruensis*. (A) The spider, anesthetized with CO₂, was immobilized on special support, and its fangs were positioned inside a microcentrifuge tube. (B) Shocks were applied in the chelicera base, and the venom was directly collected by the microcentrifuge tube, totally free of contamination.

The mRNA obtained was used to construct a cDNA library, which was prepared following the standard TruSeq RNA Sample Prep Kit protocol (Illumina, San Diego, CA, USA). The cDNA library was sequenced on an Illumina HiSeq 1500 system, into a rapid paired-end flow cell in 300 cycles of 2*150bp paired-end technique, according to the standard manufacturer's protocol (Illumina). The software CASAVA, version 1.8.2 (Illumina), was used to extract the data acquired. After pre-processing and obtaining high-quality sequences, the transcripts were assembled using the software rnaSPADES, version 3.10.1 (Bushmanova *et al.* 2019). The transcripts obtained were filtered according to the minimum size of 300 bp; additionally, redundant transcripts were removed using the software CD-HIT (Li and Godzik 2006, Fu *et al.* 2012).

For the identification of potential coding sequences within the assembled transcriptome we used TransDecoder software, version 2.0.1 (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki/>), with a minimum protein length of 60. The transcripts containing the translated sequences were aligned by Basic Local Alignment Search Tool (BLASTp) (Altschul *et al.* 1990) against the database UniProt/Swiss-Prot proteins and non-redundant transcriptome shotgun assembly (TSA-NR) from National Center for Biotechnology Information (NCBI) to assess the protein description with a cutoff e-value of <1e-05 and according to the criterion with longer protein similarity. The predicted proteins were analyzed for Protein families (Pfam) domains with hmmer3 (Wheeler and Eddy 2013), against the Pfam domains database (El-Gebali *et al.* 2019). TransDecoder may predict more than one coding sequence by transcript, and we selected only the best one based on the priority order of UniProt-KB/Swiss-Prot, Pfam domains database and TSA-NR, all of

which databases were used for annotation and selection of the best candidate for each transcript.

Abundance estimate and gene expression

In order to estimate transcript abundance, the paired-end reads were aligned back with the *A. juruensis* assembled transcriptome. Further computing of the abundance for each transcript was performed by RSEM (RNA-Seq Expectation-Maximization) (Li and Dewey 2011), along with a maximum likelihood abundance estimates, using the expectation-maximization algorithm for its statistical model. Final abundance estimates were calculated as Fragments Per Kilobase of exons per Million fragments mapped (FPKM) and Transcripts Per Million (TPM) values.

After manual annotation, the gene expression percentage was calculated by adding the FPKM of transcripts of the same category divided by the sum of the total FPKM.

Zymography

An evaluation of proteolytic activity was performed on 12% polyacrylamide gel copolymerized with 0.1% bovine milk casein (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA). The mini gel was made in dimensions 85 × 80 × 1.0 mm in a DIGEL[®] vertical electrophoresis system (model DGV10).

Quantities of 100 µg of *A. juruensis* crude venom and 50 µg of *Bothrops jararaca* venom (used as a positive control of caseinolytic activity) were evaluated under non-reducing conditions. They were diluted in a four-fold concentrated buffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 300 mM SDS, 1 mM bromophenol blue, 40% glycerol) before being applied to the gel. PageRuler[™]

Prestained Protein Ladder (Thermo) was used as a reference for molecular masses.

The run was performed at a constant voltage of 80 V, with the electrophoresis tank immersed in ice and the room temperature controlled at 18 °C to preserve the proteolytic properties of the venoms. The running buffer was composed of 250 mM glycine, 25 mM Tris-HCl, and 3 mM SDS.

After the run, the gel was immersed in a 2.5% Triton X-100 solution for 60 min and washed with ultrapure water three times for 10 min each. Then, it was incubated in a buffer (30 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 9 mM MgCl₂, pH 7.4) for 12 h, at 37 °C and with constant shaking. Finally, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (45% methanol, 10% acetic acid, 3 mM Coomassie Brilliant Blue R-250) and de-stained by continuous immersion in a 25% methanol/8% acetic acid destaining solution, until the appearance of clear zones on the dark blue background of the gel, which indicated caseinolytic activity.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Electrophoresis was carried out based on the method described by Laemmli (1970). One hundred micrograms of *A. juruensis* crude venom were analyzed under non-reducing conditions. They were diluted in a four-fold concentrated buffer (previously cited) and applied to a 12% polyacrylamide gel with dimensions 85 × 80 × 1.0 mm (DIGEL[®] vertical electrophoresis system). PageRuler[™] Prestained Protein Ladder (Thermo) was used as a molecular weight marker.

The run was performed at a constant voltage of 120 V at room temperature using the same running buffer aforementioned. After, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and de-stained until the appearance of blue-colored bands.

Protein digestion (reduction, alkylation, and trypsinization)

The band located in the same place where caseinolytic activity was observed (by zymography) was cut from the electrophoresis gel and subjected to trypsin digestion based on the method described by Hanna *et al.* (2000).

Briefly, the band was completely de-stained by continuous immersion in a 50% methanol/5% acetic acid destaining solution. Afterward, it was dehydrated by two 5-min incubations with 200 μL of acetonitrile

(ACN). The ACN was evaporated in a vacuum centrifuge, and the band was rehydrated for 30 min with 30 μL of reducing solution (10 mM dithiothreitol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)/100 mM ammonium bicarbonate). This solution was removed, then 30 μL of alkylation solution (50 mM iodoacetamide (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)/100 mM ammonium bicarbonate) was added for 30 min. After removing this solution, the band was hydrated with 100 mM ammonium bicarbonate (two times) and dehydrated with ACN (four times) before digestion. In this step, 800 ng of bovine trypsin (Sigma-Aldrich) was added; after 30 min, the excess was removed and a 50 mM ammonium bicarbonate solution was applied in sufficient volume to cover the band, which was incubated for 18 h at 37 °C.

To extract the digested protein from the gel band, 30 μL of 5% formic acid (FA) solution was added for 10 min. It was collected and stored in a new microcentrifuge tube. Afterward, the band was incubated twice for 10 min in 12 μL of a 50% ACN/5% FA solution. It was collected and transferred to the same microcentrifuge tube that already contained the first solution. The volume obtained was concentrated in a vacuum centrifuge, and the digested protein was analyzed by mass spectrometry.

Mass spectrometry and bioinformatics analysis

The sample obtained after digestion by trypsin was resuspended in 20 μL of 0.1% FA solution and analyzed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, using an LTQ XL (Thermo) connected to an Easy-nLC 1000 (Thermo) system. A volume of 10 μL was automatically injected into a pre-column Jupiter[®] C18 (10 μm; 100 μm × 50 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) coupled to an analytical reverse-phase column Aqua[®] C18 (5 μm; 75 μm × 100 mm) (Phenomenex). Two eluents were used: Phase A (0.1% FA) and Phase B (0.1% FA/ACN). The sample was eluted in a linear gradient of 5–95% of Phase B over 18 min, with a flow rate of 200 nL/min. Electrospray ionization (ESI) was operated in positive mode, with voltage and temperature adjusted to 2.0 kV and 200 °C, respectively. The mass scan interval considered for the full scan (MS1) was 200–1800 m/z, operating in data-dependent acquisition mode (DDA). The five most intense ions per scan were selected for collision-induced dissociation (CID) fragmentation.

The MS/MS spectra obtained (.raw file) were processed using PEAKS Studio software, version X Plus (Bioinformatics Solution Inc., Waterloo, ON, Canada).

Using the PEAKS DB function (*de novo* sequencing assisted database search), the spectra were searched against the database assembled with predicted proteins obtained in venom gland transcriptomic analysis. The searches involved a 0.5 Da error tolerance for precursor ions and fragment ions. Carbamidomethylation of cysteines was determined as a fixed post-translational modification. Asparagine and glutamine deamidation, methionine oxidation, and N-terminal acetylation were determined as variable modifications, and trypsin was considered enzyme-specific.

Database searches were performed using BLAST (Altschul *et al.* 1997), with default parameters. Alignments and coloring were made using Seaview (Gouy *et al.* 2010) and Sequence Manipulation Suite (Color Align Conservation tool) (Stothard 2000), respectively.

Results

The proteolytic activity of *A. juruensis* venom was evaluated by zymography, using a polyacrylamide gel copolymerized with bovine milk casein. One clear zone, indicating the caseinolytic activity, was observed between 95 and 130 kDa (Figure 2(A)). Additionally, the venom was analyzed by electrophoresis, and one band was identified in the same place where the clear zone was observed (Figure 2(B)). This band was cut from the electrophoresis gel and then analyzed by mass spectrometry. After bioinformatics analysis, it

was observed that the band has high identity with several regions of one predicted protein (Figure 3, Supplemental online material 1).

By BLASTp search, it was observed that this protein has high identity with a neprilysin from the venom of the spider *Trittame loki* and with five isoforms of neprilysin-1-like from the scorpion *Centruroides sculpturatus*; it also has conserved domains which are characteristics of the M13 and GluZincin families. Given these results, the protein was called "Ajur_Neprilysin".

When aligned with other neprilysins, it was observed that Ajur_Neprilysin has the active site and the zinc binding site conserved (Figure 4). In addition, it also aligns with all cysteines that form disulfide bridges (Supplementary Appendix 1).

In transcriptomic analysis it was identified 8 transcripts encoding neprilysins, 6 of them are isoforms of the Ajur_Neprilysin gene (Table 1, Supplemental online material 2) which represent 34.6% of gene expression (Figure 5). All Ajur_Neprilysin gene isoforms encoding identical proteins (Supplementary Appendix 2).

Discussion

In this study, we characterized for the first time the caseinolytic activity of the venom from the mygalomorph spider *A. juruensis*. This type of activity has already been observed in venoms from different species. In araneomorph spiders, for example, it was

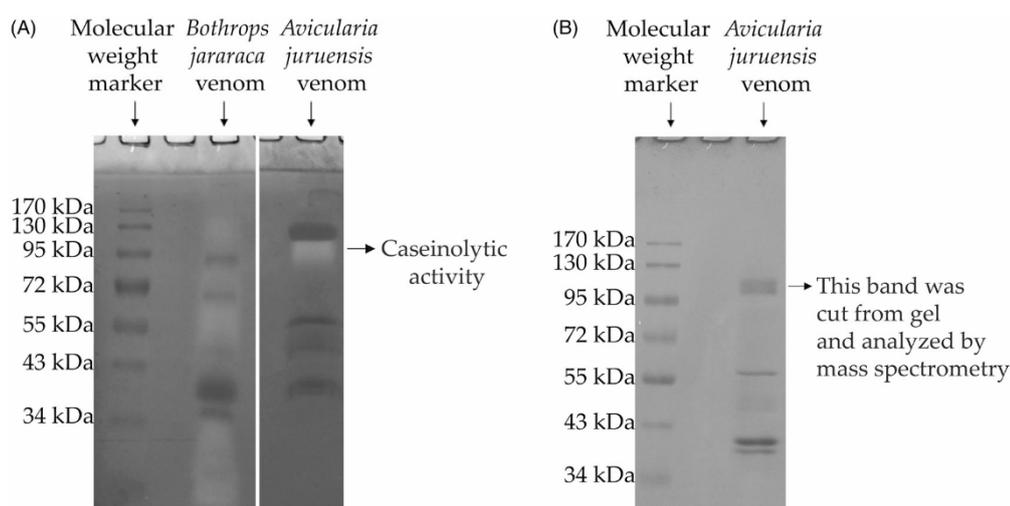


Figure 2. Zymography and electrophoresis gels obtained in the analysis of 100 μ g of *Avicularia juruensis* crude venom (under non-reducing conditions). (A) 12% polyacrylamide gel copolymerized with 0.1% bovine milk casein; *Bothrops jararaca* venom (50 μ g) was used as a positive proteolytic control. The clear zones on the dark background indicate the caseinolytic activity. (B) 12% polyacrylamide gel electrophoresis. The band located in the same place where we observed the caseinolytic activity (in the zymography gel) was cut from the gel and analyzed by mass spectrometry. Molecular weight marker: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.).

6 S. M. DO NASCIMENTO ET AL.

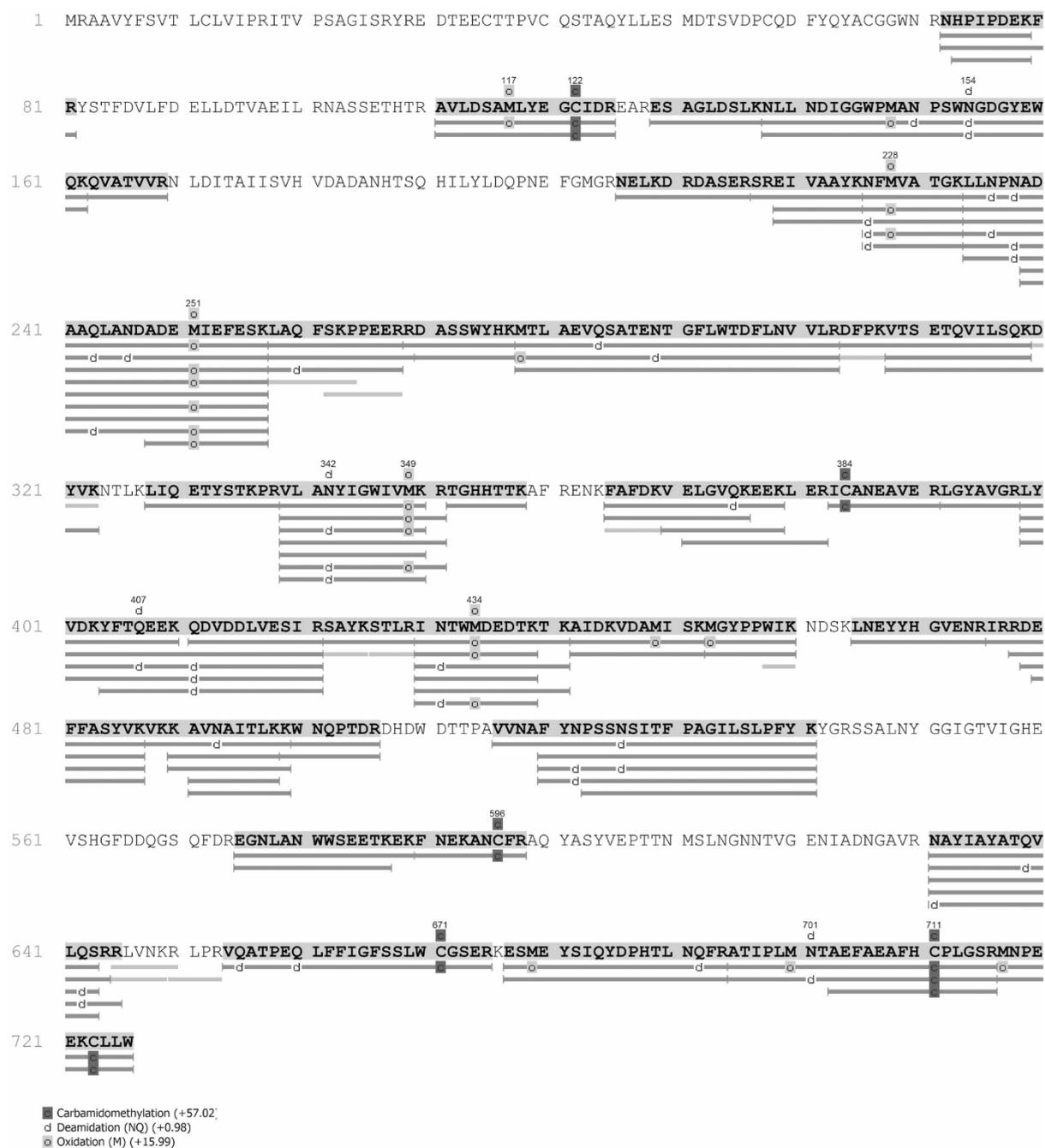


Figure 3. Results obtained in the analysis by mass spectrometry of the band cut from electrophoresis gel. High similarity was observed with several regions of one predicted protein, which was assembled in the transcriptomic analysis of *Avicularia juruensis* venom glands. Peptide fragments detected by mass spectrometry are identified by grey shadings and bars.

described for *Badumna insignis*, *Loxosceles rufescens*, *Lampona cylindrata* (Young and Pincus 2001), *Hippasa partita*, *H. agelenoides*, *H. lycosina* (Nagaraju et al. 2006), and *Phoneutria boliviensis* (Estrada-Gomez et al. 2015). Devaraja et al. (2008) characterized the Hag-protease, a low-molecular-weight serine protease

from *H. agelenoides*, and Barbaro et al. (2005) demonstrated that the venoms of the brown spiders *L. deserta*, *L. gaucho*, *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. reclusa* contain caseinolytic enzymes, most of them metalloproteases, since they are inhibited by 1,10-phenanthroline.



Figure 4. Alignment of the region of the conserved active sites of Ajur_Neprilysin and other neprilysins: from the venom of the spider *Trittame loki* (National Center for Biotechnology Information (NCBI) ID: W4VS99); from the scorpion *Centruroides sculpturatus* (neprilysin-1-like isoforms X5 to X1; NCBI ID: XP_023211936.1 to XP_023211932.1, respectively); from the venom of the spider *Physocyclus mexicanus* (UniProt ID: MN004884); and from the venom of the snake *Crotalus horridus* (neprilysin-like protein; NCBI ID: JAA96348.1). Residues that are identical among the sequences were given a black background, and those that are similar among the sequences were given a gray background. The remaining residues have a white background.

Table 1. Ajur_Neprilysin gene isoforms expression profile.

Transcript ID	Gene ID	Length	Effective length	FPKM*	TPM*
NODE_1_length_3835_cov_5782.441520_g0_i0	NODE_1_length_3835_cov_5782.441520_g0_i0	3835	3,661.27	8,418.97	29,769.89
NODE_2_length_3827_cov_5779.893713_g0_i1	NODE_2_length_3827_cov_5779.893713_g0_i1	3827	3,653.27	1,806.98	6,389.56
NODE_3_length_3792_cov_5863.905889_g0_i2	NODE_3_length_3792_cov_5863.905889_g0_i2	3792	3,618.27	44,435.27	157,125.26
NODE_4_length_3737_cov_5929.441867_g0_i3	NODE_4_length_3737_cov_5929.441867_g0_i3	3737	3,563.27	1,005.33	3,554.91
NODE_5_length_3688_cov_6033.661411_g0_i4	NODE_5_length_3688_cov_6033.661411_g0_i4	3688	3,514.27	189,122.31	668,745.54
NODE_6_length_3688_cov_6023.256432_g0_i5	NODE_6_length_3688_cov_6023.256432_g0_i5	3688	3,514.27	38,012.73	134,414.85

*FPKM: Fragments Per Kilobase of exons per Million fragments mapped; TPM: Transcripts Per Million. There 6 predicted Ajur_Neprilysin isoforms presented different expression profiles based on the bowtie2 alignment.

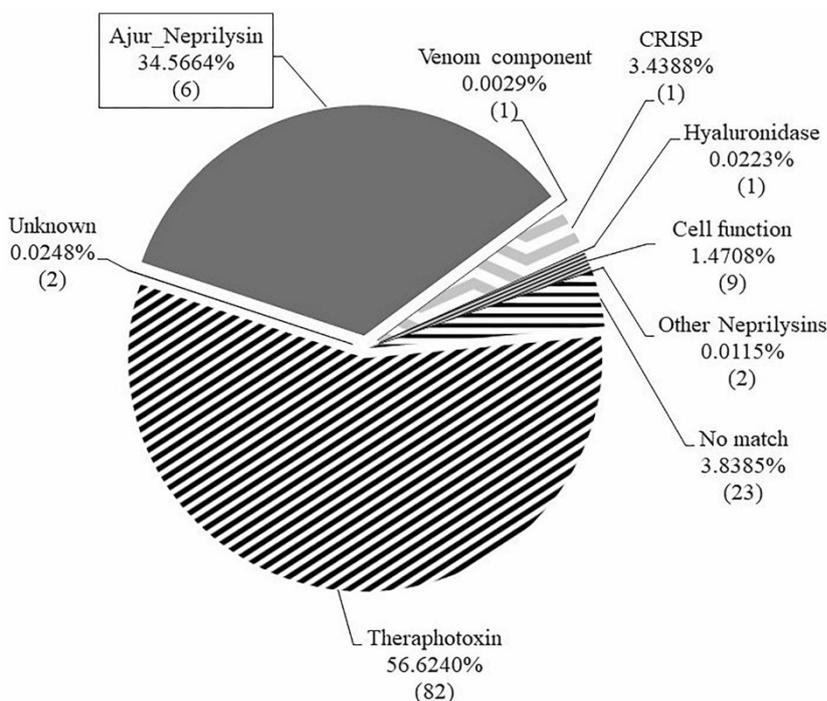


Figure 5. Graph indicating percentages of gene expression of toxins from *Avicularia juruensis* venom. The value between parentheses indicates the number of transcripts in each category.

Concerning mygalomorph spiders from the Theraphosidae family, Perret (1977) proposed that the proteolytic activity observed was due to contamination by digestive secretions expelled during the venom milking. In fact, no caseinolytic activity was observed in studies carried out with the pure venom of the species *Pamphobeteus aff. nigricolor* (Estrada-Gomez et al. 2013), *Poecilotheria regalis*, *Ceratogyrus darlingi*, and *Brachypelma epicureanum* (García-Arredondo et al. 2015). However, Fernandes (2010) demonstrated the proteolytic activity on casein of *Nhandu coloratovillosus* venom, and we also identified this for *A. juruensis*, both Theraphosidae spiders.

Using mass spectrometry and transcriptomic analysis of *A. juruensis* venom glands, it was found that one protein is the component responsible for the caseinolytic activity. By BLASTp search, it was observed that this protein has high identity with neprilysins (NEPs), so it was called “Ajur_Neprilysin”. NEPs are a type of metalloendopeptidase with known presence in the venoms of different animals, but in spiders this enzyme has been identified in only *Physocyclus mexicanus* (Araneomorphae: Pholcidae) (Zobel-Thropp et al. 2019) and *Trittame loki* (Mygalomorphae: Barychelidae) (Undheim et al. 2013). Thus, in this present work, we describe the finding of a third spider (the second from the Mygalomorphae suborder) which has neprilysin in its venom.

In *P. mexicanus* spider, neprilysins are the most abundant venom proteins (Zobel-Thropp et al. 2019), while in *A. juruensis* the transcripts that encoding Ajur_Neprilysin represent 34.6% of gene expression, being the second most expressed type of toxin. Such results indicate that neprilysins probably have an important role during envenoming.

The Ajur_Neprilysin presents conserved domains which are characteristics of the M13 and GluZincin families. The Gluzincin family comprises several zinc-dependent metallopeptidases, including M13 proteases. These are found in a large variety of organisms (from bacteria to mammals, but not in yeasts) and participate in a broad range of physiological processes due to their greater variation at the S2' subsite. All M13 proteases have the Zn binding motifs “HEXXH” and “EXXXD,” in which histidine residues and glutamic acid (in EXXX) are ligands for zinc atoms, while glutamic acid (in EXX) and aspartic acid are involved in catalysis (Bianchetti et al. 2002, National Center for Biotechnology Information 2020). In the alignments performed, it was observed that Ajur_Neprilysin has the active site and the zinc binding site conserved, as well as all cysteines that form disulfide bridges.

Invertebrate NEPs can cleave a wide range of substrates (Turner et al. 2001) but their role in envenomation has not yet been elucidated (Tan et al. 2017, Kunalan et al. 2018). There are two hypotheses: they degrade the extracellular matrix, facilitating the access of other toxins to their targets (Undheim et al. 2013, Zobel-Thropp et al. 2019), or they are involved with neurotoxicity and prey paralysis (Casewell et al. 2009, Liu et al. 2015, Yoon et al. 2020). As demonstrated herein, Ajur_Neprilysin is able to cleave casein. Until now, this type of ability had only been observed for bacterial NEPs from *Streptococcus diacetylactis* and *Lactococcus lactis* (Desmazeaud and Zevaco 1976, Zevaco and Desmazeaud 1980, Monnet 1995). So, in this study, we described for the first time one non-bacterial neprilysin capable of degrading casein, which shows that the probable role of NEPs in envenomation is related to extracellular matrix degradation. Also, as the release of venom into prey usually precedes the injection of digestive fluids, it seems plausible that venom components with enzymatic properties can also facilitate digestion and, for this reason, envenomation may be considered as the first step of extra-oral digestion (Vassilevski et al. 2009, Walter et al. 2017).

Conclusion

In summary, we analyzed the venom of the species *A. juruensis* (Mygalomorphae: Theraphosidae) and identified Ajur_Neprilysin, one metalloendopeptidase of the type neprilysin. This class of enzyme has only been observed in the venom of two other spiders, but this present work was the first to assess its function. Given that Ajur_Neprilysin showed caseinolytic activity, we suggest that its role in envenomation is to degrade the extracellular matrix, facilitating the spread of other toxins, as well as digestive fluids. Finally, the study of Theraphosidae spider venoms is important to describing their composition and mode of action, since this group is less studied in comparison to spiders with medical importance, such as *Latrodectus* spp. and *Loxosceles* spp.

Acknowledgements

We would like to thank MSc Thiago de Jesus Oliveira for his help in the maintenance of the bioterium where the spiders used in this study were kept. Mariana Salgado Loureiro de Caldas Morone and Ismael Feitosa Lima for their support in the transcriptomic and mass spectrometry analysis, respectively, and PhD Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho for helping to correct the final manuscript.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, as well as by the Research Support Foundation of the State of São Paulo [FAPESP/CeTICS - grant No. 2013/07467-1] and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development [CNPq - grant No. 472744/2012-7].

ORCID

Soraia Maria do Nascimento  <http://orcid.org/0000-0003-0181-4770>

Ursula Castro de Oliveira  <http://orcid.org/0000-0002-4811-757X>

Milton Yutaka Nishiyama-Jr  <http://orcid.org/0000-0002-2410-0562>

Alexandre Keiji Tashima  <http://orcid.org/0000-0002-1332-8895>

Pedro Ismael da Silva Junior  <http://orcid.org/0000-0001-6619-6489>

References

- Akef, H.M., 2018. Anticancer, antimicrobial, and analgesic activities of spider venoms. *Toxicology research*, 7 (3), 381–395.
- Altschul, S.F., et al., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215 (3), 403–410.
- Altschul, S.F., et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25 (17), 3389–3402.
- Arbuckle, K., 2017. Evolutionary context of venom in animals. In: A. Malhotra, ed. *Evolution of venomous animals and their toxins*. Dordrecht: Springer Netherlands, 3–31.
- Barbaro, K.C., et al., 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon : official journal of the international society on toxinology*, 45 (4), 489–499.
- Bertani, R., 2012. Revision, cladistic analysis and biogeography of *Typhochlaena* C. L. Koch, 1850, *Pachistopelma* Pocock, 1901 and *Iridopelma* Pocock, 1901 (Araneae, Theraphosidae, Aviculariinae). *ZooKeys*, 230, 1–94.
- Bianchetti, L., Oudet, C., and Poch, O., 2002. M13 endopeptidases: new conserved motifs correlated with structure, and simultaneous phylogenetic occurrence of PHEX and the bony fish. *Proteins*, 47 (4), 481–488.
- Bland, N.D., et al., 2008. Bioinformatic analysis of the neprilysin (M13) family of peptidases reveals complex evolutionary and functional relationships. *BMC evolutionary biology*, 8, 16.
- Bushmanova, E., et al., 2019. rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *GigaScience*, 8 (9), giz100.
- Casewell, N.R., et al., 2009. Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: *Echis*) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. *BMC genomics*, 10, 564.
- Desmazeaud, M.J., and Zevaco, C., 1976. General properties and substrate specificity of an intracellular soluble dipeptidase from *Streptococcus diacetilactis*. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 16 (6), 851–736.
- Devaraja, S., et al., 2008. A low molecular weight serine protease: purification and characterization from *Hippasa agelenoides* (funnel web) spider venom gland extract. *Toxicon : official journal of the international society on toxinology*, 52 (1), 130–138.
- El-Amouri, S.S., et al., 2008. Neprilysin: an enzyme candidate to slow the progression of Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 172 (5), 1342–1354.
- El-Gebali, S., et al., 2019. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, 47 (D1), D427–D432.
- Estrada-Gomez, S., et al., 2015. Partial characterization of venom from the Colombian spider *Phoneutria boliviensis* (Araneae:Ctenidae). *Toxins*, 7 (8), 2872–2887.
- Estrada-Gomez, S., Vargas Muñoz, L.J., and Quintana Castillo, J.C., 2013. Extraction and partial characterization of venom from the Colombian spider *Pamphobeteus aff. nigricolor* (Araneae:Theraphosidae). *Toxicon : official journal of the international society on toxinology*, 76, 301–309.
- Fernandes, S. C. R., 2010. *Caracterização química e biológica de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira Nhandu coloratovillosus (Schmidt, 1998)*. Dissertation (MSc). Universidade de Brasília.
- Ferreira, F.R.B., et al., 2016. Evaluation of antimicrobial, cytotoxic, and hemolytic activities from venom of the spider *Lasiodora* sp. *Toxicon : official journal of the international society on toxinology*, 122, 119–126.
- Foelix, R. F., 2011. *Biology of spiders*. 3rd ed. New York: Oxford University Press.
- Fry, B.G., et al., 2009. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual review of genomics and human genetics*, 10, 483–511.
- Fu, L., et al., 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28 (23), 3150–3152.
- Fukushima, C.S., and Bertani, R., 2017. Taxonomic revision and cladistic analysis of *Avicularia* Lamarck, 1818 (Araneae, Theraphosidae, Aviculariinae) with description of three new aviculariine genera. *ZooKeys*, 659, 1–185.
- García-Arredondo, A., et al., 2015. Pharmacological characterization of venoms from three theraphosid spiders: *Poecilotheria regalis*, *Ceratogyrus darlingi* and *Brachypelma epicureanum*. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 21 (15), 1–9.
- Gomes, P. C., and Palma, M. S., 2016. The nonpeptide low molecular mass toxins from spider venoms. In: P. Gopalakrishnakone, G.A. Corzo, M.E. De Lima and E. Diego-García, eds. *Spider venoms*. Dordrecht: Springer Netherlands, 3–19.
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for

- sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution*, 27 (2), 221–224.
- Hanna, S.L., et al., 2000. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology*, 146 (10), 2495–2508.
- Holford, M., et al., 2018. Venoms to the rescue. *Science (New York, N.Y.)*, 361 (6405), 842–844.
- Khusro, A., et al., 2018. Venom as therapeutic weapon to combat dreadful diseases of 21st century: a systematic review on cancer, TB, and HIV/AIDS. *Microbial Pathogenesis*, 125, 96–107.
- King, G.F., 2011. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11 (11), 1469–1484.
- Kunalan, S., et al., 2018. Proteomic characterization of two medically important malaysian snake venoms, *Calloselasma rhodostoma* (Malayan Pit Viper) and *Ophiophagus hannah* (King Cobra). *Toxins (basel)*, 10 (11), 434.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680–685.
- Li, B., and Dewey, C.N., 2011. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 12, 323.
- Li, W., and Godzik, A., 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22 (13), 1658–1659.
- Liu, G., et al., 2015. Global transcriptome analysis of the tentacle of the jellyfish *Cyanea capillata* using deep sequencing and expressed sequence tags: insight into the toxin- and degenerative disease-related transcripts. *PLoS One*, 10 (11), e0142680.
- Luddecke, T., Vilcinskas, A., and Lemke, S., 2019. Phylogeny-guided selection of priority groups for venom bioprospecting: harvesting toxin sequences in tarantulas as a case study. *Toxins (Basel)*, 11 (9), 488.
- Mello Leitão, C. F. D., 1923. *Theraphosoideas do Brasil* São Paulo: Revista do Museu Paulista.
- Monnet, V., 1995. Oligopeptidases from *Lactococcus lactis*. *Methods in Enzymology*, 248, 579–592.
- Nagaraju, S., et al., 2006. Venom from spiders of the genus *Hippasa*: biochemical and pharmacological studies. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 144 (1), 1–9.
- National Center for Biotechnology Information, 2020 [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cl14813> [Accessed 06 July 2020].
- Nicholson, G. M., 2013. Spider Peptides. In: A.J. Kastin, ed. *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed. Boston: Academic Press, 461–472.
- Pennisi, E., 2017. Untangling spider biology. *Science (New York, N.Y.)*, 358 (6361), 288–291.
- Perret, B.A., 1977. Proteolytic activity of tarantula venoms due to contamination with saliva. *Toxicon : official journal of the international society on toxinology*, 15 (6), 505–510.
- Pineda, S.S., et al., 2020. Structural venomomics reveals evolution of a complex venom by duplication and diversification of an ancient peptide-encoding gene. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 117 (21), 11399–11408.
- Rocha-E-Silva, T.A.A., Sutti, R., and Hyslop, S., 2009. Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon*, 53 (1), 153–161.
- Rojas-Azofeifa, D., et al., 2019. Biochemical characterization of the venom of Central American scorpion *Didymocentrus krausi* Francke, 1978 (Diplocentridae) and its toxic effects in vivo and in vitro. *Comparative biochemistry and physiology. toxicology & pharmacology : CBP*, 217, 54–67.
- Rokyta, D.R., Wray, K.P., and Margres, M.J., 2013. The genesis of an exceptionally lethal venom in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) revealed through comparative venom-gland transcriptomics. *BMC Genomics*, 14, 394.
- Rokyta, D.R., et al., 2015. The transcriptomic and proteomic basis for the evolution of a novel venom phenotype within the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). *Toxicon : official journal of the international society on toxinology*, 98, 34–48.
- Stothard, P., 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28 (6), 1102–1104.
- Tan, C.H., et al., 2015. Venom-gland transcriptome and venom proteome of the Malaysian King Cobra (*Ophiophagus hannah*). *BMC genomics*, 16 (1), 687.
- Tan, K.Y., et al., 2017. Comparative venom gland transcriptomics of *Naja kaouthia* (Monocled Cobra) from Malaysia and Thailand: elucidating geographical venom variation and insights into sequence novelty. *PeerJ.*, 5, e3142.
- Turner, A.J., Isaac, R.E., and Coates, D., 2001. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *BioEssays*, 23 (3), 261–269.
- Undheim, E.A., et al., 2013. A proteomics and transcriptomics investigation of the venom from the Barychelid spider *Trittame loki* (brush-foot trapdoor). *Toxins*, 5 (12), 2488–2503.
- Vassilevski, A.A., Kozlov, S.A., and Grishin, E.V., 2009. Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry. Biokhimiia*, 74 (13), 1505–1534.
- Walter, A., et al., 2017. Characterisation of protein families in spider digestive fluids and their role in extra-oral digestion. *BMC Genomics*, 18 (1), 600.
- Wheeler, T.J., and Eddy, S.R., 2013. nhmmer: DNA homology search with profile HMMs. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29 (19), 2487–2489.
- World Spider Catalog, 2021. [online]. Available from: <http://wsc.nmbe.ch> [Accessed 04 January 2021].
- Yoon, K.A., et al., 2020. Characterization of venom components and their phylogenetic properties in some aculeate bumblebees and wasps. *Toxins (basel)*, 12 (1), 47.
- Young, A.R., and Pincus, S.J., 2001. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon : official journal of the international society on toxinology*, 39 (2–3), 391–400.
- Zevaco, C., and Desmazeaud, M.J., 1980. Hydrolysis of beta-casein and peptides by intracellular neutral protease of *Streptococcus diacetylactis*. *Journal of dairy science*, 63 (1), 15–24.
- Zobel-Thropp, P.A., et al., 2019. Not so dangerous after all? Venom composition and potency of the Pholcid (Daddy Long-Leg) spider *Physocyclus mexicanus*. *Frontiers in ecology and evolution*, 7, 256.

Artigo no preprint *bioRxiv*

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

How a tarantula can help treat infections: *Avicularia juruensis*'s theraphotoxins that also act as antimicrobials

Soraia Maria do Nascimento^{a,b*}, Andrea Díaz Roa^a, Ronaldo Zucatelli Mendonça^c and Pedro Ismael da Silva Junior^{a,b*}

^aLaboratory of Applied Toxinology - Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS/CEPID), Butantan Institute, São Paulo, Brazil; ^bPostgraduate Program Interunits in Biotechnology, USP/IBu/IPT, São Paulo, Brazil; ^cLaboratory of Parasitology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil

*Correspondence: pisjr@butantan.gov.br; soraia.nascimento@butantan.gov.br

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

How a tarantula can help treat infections: *Avicularia juruensis*'s theraphotoxins that also act as antimicrobials

Short abstract: Considering that there are still many species little-studied, this work aimed to analyze the venom of the spider *Avicularia juruensis* searching for antimicrobial peptides. Using reverse-phase high-performance liquid chromatography, microbial growth inhibition assay, transcriptomics, and proteomics approaches we identified three antimicrobial peptides: Avilin, Juruin_2, and Juruenine. All of them showed similarities with neurotoxins that act on ion channels and, probably, they have the ICK motif. The study of animal venoms is of great importance to carry out the characterization of unknown components and that may have a biotechnological application, in special venoms from spiders that are from less studied families.

Spiders are the most successful group of venomous animals, comprising more than 50,350 species distributed in all terrestrial habitats. One strategy that facility their broad distribution is the production of elaborate venoms, which are composed of inorganic salts, organic molecules with low molecular mass, free amino acids, small polypeptides, linear peptides, nucleotides, disulfide-rich peptides, enzymes, and high molecular mass proteins. Considering that there are still many species little-studied, this work aimed to analyze the venom of the mygalomorph spider *Avicularia juruensis* searching for new antimicrobial peptides. Using reverse-phase high-performance liquid chromatography, microbial growth inhibition assay, transcriptomics, and proteomics approaches we identified three antimicrobial peptides that were named Avilin, Juruin_2, and Juruenine. All of them showed similarities with neurotoxins that act on ion channels and, probably, they have the ICK motif in their structure. The ICK fold seems to be conserved in several venomous animal lineages and presents elevated functional diversity, as well as gives stability to the toxins. The study of animal venoms is of great importance to carry out the characterization of unknown components and that may have a biotechnological application (like the antimicrobial peptides), in special venoms from spiders that are from less studied families.

Keywords: venom; spider; antimicrobial; Theraphosidae; *Avicularia juruensis*

Introduction

Several are the animals that evolved using an efficient immune system and excellent protection against pathogens, some of them also employed venoms as a defense mechanism, including arthropods, cnidarian, echinoderms, mollusks, annelids, and vertebrates (Pineda *et al.* 2014, Zhang 2015, Arbuckle 2017).

Concerning biodiversity, spiders are the most successful group of venomous animals (Luddecke *et al.* 2019), comprising more than 50,350 species, 4,280 genera, and 132 families characterized to date (World Spider Catalog 2022). Their venoms are highly elaborate cocktails composed of a heterogeneous mixture of inorganic salts, organic molecules with low molecular mass (< 1 kDa), free amino acids, small polypeptides and linear peptides, nucleotides, disulfide-rich peptides (generally with 3-6 disulfide bonds), as well as enzymes and higher mass proteins (10-120 kDa) (Pineda *et al.* 2014, Saez and Herzig 2019). These molecules can have multiple functions like blockage or modulation of ion channels, anti-cancer, anti-insect, antimicrobial and antihypertensive activities (Melo-Braga *et al.* 2020).

To date, more than 1,390 spider toxins have been described in Uniprot (The UniProt Consortium 2021) most of them from araneomorph spiders, as the anticancer peptide Latacin-2a from *Lachesana tarabaevi* (Dubovskii *et al.* 2015), or the neurotoxins Tx3, PnPP-19, and δ -CNTX-Pn1a from well-studied *Phoneutria nigriventer* (Cordeiro *et al.* 1992, Cordeiro *et al.* 1993, Figueiredo *et al.* 1995). Although less studied, the suborder Mygalomorphae comprises spiders that are very helpful for biotechnology purposes due to their longevity (15-30 years) and large venom glands (Bond *et al.* 2012, Windley *et al.* 2012). The biggest mygalomorph species are included in the Theraphosidae family and their toxins are named theraphotoxins, whose

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

majority conform to the Inhibitory Cystine Knot (ICK) motif (Escoubas and Rash 2004, King *et al.* 2008). The ICK fold seems to be conserved in several venomous animal lineages and presents elevated functional diversity (Gao *et al.* 2013), as well as gives tremendous thermal, chemical, and biological stability to the toxins (Saez *et al.* 2010).

The peptides GsMTx4, from *Grammostola spatulata* venom (Jung *et al.* 2006), and Oh-defensin, from *Cyriopagopus hainanus* (Zhao *et al.* 2011), are examples of theraphotoxins that adopt the ICK motif and have antimicrobial activity. These toxins are antimicrobial peptides (AMPs), molecules that can be good candidates for the development of new antibiotics since they present notable features like specific action against microorganisms, accelerated pharmacokinetics, immunomodulatory activity, the effect on endotoxin neutralization, and also the possibility of combining with conventional antibiotics to increase the treatment effectiveness (Santos *et al.* 2016).

The search for novel effective antibiotics becomes urgent due to the remarkable proficiency of pathogenic microorganisms at adapting to environmental stresses and developing at least one mechanism of resistance to conventional drugs, compromising their effectiveness. The ever-increasing antibiotic resistance associated with the decrease in the rate of creation of new medicines makes infectious diseases one of the main causes of human deaths (Saez *et al.* 2010, Garcia *et al.* 2013, Saez and Herzig 2019).

Therefore, in this work, we analyzed the venom of the spider *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae: Theraphosidae) (Mello Leitão 1922) looking for new antimicrobial peptides. This species is found in Colombia, Ecuador, Peru, and Brazil (Fukushima and Bertani 2017), and is often an exotic pet due to its docility, awesome color, and size. Although *A. juruensis* is easily raised in captivity, there are only two

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

studies about its venom composition, in which it was described the antifungal peptide Juruin (Ayroza *et al.* 2012) and a neprilysin (Nascimento *et al.* 2021).

In addition to the identification of molecules that can be employed in the development of new drugs effective against resistant microorganisms, the study of venoms from mygalomorph spiders is very important to understand its composition, since this suborder is less studied than Araneomorphae.

Materials and methods

Animals and venom milking

Spiders from the species *A. juruensis* were collected in Porto Velho and Monte Negro, Rondônia, Brazil, under the Permanent Zoological Material license n°11024-3-IBAMA and Special Authorization for Access to Genetic Patrimony n°010345/2014-0. They were kept in the bioterium of the Laboratory of Applied Toxinology at Butantan Institute (São Paulo, Brazil) and were fed with cockroaches every 15 days, with water at ease. The room temperature was controlled between 24 and 26°C.

Venom was extracted by electrical stimulation as described by Rocha-e-Silva *et al.* (2009). After milking, the venom obtained was centrifuged at 2450× g for 10 minutes at 4°C; the supernatant was collected, lyophilized, and stored at -80°C.

This research follows the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Ethic Committee in the Use of Animals of Butantan Institute and was approved on September 21, 2016 (protocol n°CEUAX 5082310816).

Reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)

5 mg of crude venom were reconstituted in 2 mL of acidified ultrapure water

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

[0.05% trifluoroacetic acid (TFA)] and centrifuged at 16,000× g for 5 minutes, the supernatant was subjected to RP-HPLC on a Prominence LC-20A system (Shimadzu, Kyoto, KY, Japan), carried out with a semi-preparative reverse-phase column Jupiter® C18 (10 µm, 300 Å, 10 mm x 250 mm) (Phenomenex International, Torrance, CA, USA).

Two eluents were used: phase A (0.05% TFA) and phase B [acetonitrile (ACN)/0.05% TFA]. Elution was made with a linear gradient of 2 to 80% of phase B over 60 minutes, with a flow rate of 1.5 mL/minute and absorbance monitored at 225 nm. The fractions corresponding to peaks observed in the chromatogram were collected manually and dried in a refrigerated vacuum centrifuge.

Second chromatography step

The fractions with antimicrobial activity were acidified with 0.05% TFA and subjected to the second chromatography step using the same system aforementioned and an analytic reverse-phase column Jupiter® C18 (10 µm, 300 Å, 250 x 4.60 mm) (Phenomenex). A linear gradient of phase B was calculated specifically for each fraction according to their retention time observed in the first chromatography step: Avilin = from 0 to 7%, Juruin_2 = from 18 to 48%, and Juruenine = from 23 to 53%. Elutions were carried out for 60 minutes, with a flow rate of 1 mL/minute and absorbance monitored at 225 nm. The fractions corresponding to peaks observed in the chromatogram were collected manually and dried in a refrigerated vacuum centrifuge.

Quantification

Quantification was carried out based on absorbance at 225 nm measured by NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA,

USA).

Bioassays

Microbial growth inhibition assay and minimum inhibitory concentration (MIC)

Fractions collected in the RP-HPLC step were reconstituted with ultrapure water and tested against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (strain SBS 363), Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* (strain A270), yeast *Candida albicans* (strain MDM8), and the fungi *Aspergillus niger*.

Bacteria were cultured in Poor Broth medium (PB) (1% bactopectone, 0.5% NaCl, pH 7.4, 217 mOsm) and fungi were cultured in Potato Dextrose Broth medium (PDB) (1.2% PDB, pH 5.0, 79 mOsm). 0.2 mg of streptomycin and sterile ultrapure water were employed as a positive inhibition control and microbial growth control, respectively. The plates were incubated at 30°C for 18 hours under constant shaking, then the antimicrobial activity was evaluated by measuring absorbance at 595 nm in a Victor3 microplate reader (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA).

The determination of MIC was performed as described above but using a serial dilution of the antimicrobial fractions. It was expressed as [a]–[b]: [a] is the highest concentration at which the microorganism grows and [b] is the lowest concentration that inhibits the growth.

Hemolytic assay

Type A+ human blood was centrifuged at 700× g for 15 min, plasma was discarded and the red blood cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4), at each washing

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

new centrifugations were performed and the supernatant was discarded. The erythrocytes obtained were diluted in the same PBS 1X buffer until a final concentration of 3% (v/v).

Aliquots of the antimicrobial fractions were reconstituted in the PBS 1X buffer and tested in duplicate in serial dilutions using a 96-well U-bottom microplate. 0.1% Triton X-100 solution and the PBS 1X buffer were used as positive and negative hemolysis control, respectively. The plate was incubated for 1 hour at 37°C, then the supernatant was transferred to a 96-well flat-bottom microplate, and hemolysis was evaluated by measuring the absorbance at 405 nm using a Victor3 microplate reader (Perkin Elmer). Hemolysis percentage was expressed concerning the 100% lysis control, according to the equation: % hemolysis = (Absorbance sample - Absorbance PBS 1X)/(Absorbance Triton X-100 - Absorbance PBS 1X).

The use of human blood was authorized by the Brazilian National Health Council, Plataforma Brasil CAAE: 15390119.9.0000.5473 (protocol number 3.486.142).

Cytotoxicity assay

Vero cells (ATCC CCL81; Manassas, VA, USA) were cultivated and maintained in Opti-MEM(1X) + GlutaMAX (reduced serum medium) culture medium (Gibco, Waltham, MA, USA). The cells were seeded in 96-well flat-bottom sterile plates (2×10^5 cells/well) and cultured for 24 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Serial dilutions of the samples were carried out using the same culture medium aforementioned (starting at 100 µg/mL for Avilin and 100 µM for Juruin_2 and Juruenine) and were incubated with cells for 24 h. The assays were conducted in duplicate and the culture medium was employed as a negative cytotoxicity

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

control. 20 μ L of MTT (5 mg/mL in PBS) were added and a new incubation was carried out for 3 h at 37°C. After, 150 μ L of isopropanol was used to dissolve the formazan crystals.

Absorbance at 570 nm was measured using a FlexStation 3 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and the cell survival was calculated according to the equation: % survival = (Absorbance treated cells/Absorbance untreated cells) \times 100.

Transcriptomic analysis and database assembly

Venom glands of five adult spiders were removed and homogenized in Polytron® Tissue Homogenizer. Total RNA was extracted using TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) and mRNA was isolated with magnetic beads with an oligo (dT) using a Dynabeads® mRNA DIRECT™ kit (Thermo). It was quantified using Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit (Thermo) and its integrity was evaluated in a 2100 Bioanalyzer pico chip series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

The mRNA obtained was used to assemble the cDNA library, following the standard TruSeq RNA Sample Prep Kit protocol (Illumina, San Diego, CA, USA). The cDNA library was sequenced on Illumina HiSeq 1500 system, into a rapid paired-end flow cell in 300 cycles of 2*150 bp paired-end technique, according to the standard manufacturer's protocol (Illumina). Transcripts obtained were assembled using maSPAdes software, version 3.10.1 (Bushmanova *et al.* 2019), and filtered according to the minimum size of 300 bp. Also, redundant transcripts were removed using CD-HIT software (Li and Godzik 2006, Fu *et al.* 2012).

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Potential coding sequences were identified by TransDecoder software, version 2.0.1 (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki/>), with a minimum protein length of 60. Transcripts containing the translated sequences were aligned by BLASTp (Altschul *et al.* 1990) against the databases UniProt/Swiss-Prot proteins and TSA-NR from NCBI to assess the protein description with a cut-off e-value of $<1e-05$ and according to the criterion with longer protein similarity. The predicted proteins were analyzed for Protein families (Pfam) domains with HMMER3.1 (Wheeler and Eddy 2013), against the Pfam domains database (El-Gebali *et al.* 2019). TransDecoder may predict more than one coding sequence by transcript and we selected only the best one based on the priority order of UniProt-KB/Swiss-Prot, Pfam domains database, and TSA-NR. All these databases were used for annotation and selection of the best candidate for each transcript.

In-solution digestion (reduction, alkylation, and trypsinization)

Aliquots of antimicrobial fractions were reconstituted in 20 μ L of 8 M urea/0.4 M ammonium bicarbonate solution. 5 μ L of reducing solution [45 mM dithiothreitol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)] were added and incubated at 50°C for 15 minutes. After cooling at room temperature, 5 μ L of alkylation solution [100 mM iodoacetamide (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)] was added and incubated protected from light for 15 minutes. 130 μ L of ultrapure water and bovine trypsin (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) were added in a 1:25 (enzyme:protein) ratio and incubated at 37°C for 12 hours, then the digestion was stopped by acidifying with 0.1% TFA.

The samples were desalinated by ZipTip® Pipette Tips (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) with a unique elution step using 80% ACN, concentrated in a vacuum centrifuge, and analyzed by mass spectrometry.

Mass spectrometry and bioinformatics analyses

Aliquots of the antimicrobial fractions (trypsinized and non-trypsinized) were reconstituted in 0.1% formic acid solution and analyzed by the Easy-nLCII system (Thermo) connected to LTQ-Orbitrap Velos (Thermo). Electrospray ionization was operated in positive mode, with voltage and temperature adjusted to 2.0 kV and 200°C. The mass scan interval considered for the full scan (MS1) was 200-2,000 m/z, operating in data-dependent acquisition mode. The five most intense ions were selected for collision-induced dissociation fragmentation and the minimum signal required to start fragmentation events (MS2) was adjusted to 5,000 cps.

The MS/MS spectra obtained from non-trypsinized samples were analyzed by MassAnalyzer software, version 1.03 (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA). The spectra of trypsinized samples were converted to a .mgf file by MSConvert software (Chambers *et al.* 2012) and employed in searches in different databases using Mascot Server (Perkins *et al.* 1999). They were also processed by PEAKS Studio software, version X Plus (Bioinformatics Solution Inc., Waterloo, ON, Canada). Using the PEAKS DB function, the spectra were searched against the database assembled with predicted proteins obtained in the transcriptomic analysis. The searches involved 10 ppm and 0.6 Da error tolerance for precursor ions and fragment ions, respectively.

Database searches were performed using BLASTp and Uniprot. Alignments and coloring were made using Seaview (Gouy *et al.* 2010) and Sequence Manipulation Suite (Stothard 2000), respectively. The similarity percentage was calculated by the SIAS server (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>), and physical and chemical parameters were evaluated by ProtParam (Gasteiger *et al.* 2005). For all tools were used default parameters.

Results

Fractionation of the venom by RP-HPLC

To isolate and characterize the antimicrobial peptides (AMPs), *A. juruensis* venom was fractionated by RP-HPLC, and all fractions obtained were tested by microbial growth inhibition assay. Thus, were identified three fractions with antimicrobial activity: fraction 1, which prevented the growth of *Escherichia coli* SBS 363; fraction 19, which prevented the growth of *Aspergillus niger*, *Candida albicans* MDM8, *Micrococcus luteus* A270, and *E. coli* SBS 363; and fraction 24, which was effective against *E. coli* SBS 363 and *M. luteus* A270.

By mass spectrometry analysis, it was observed that these fractions were not homogeneous (data not shown), therefore, it was necessary to submit them to a new RP-HPLC step. The purified antimicrobial fractions obtained were named Avilin, Juruin_2, and Juruenine (Figure 1 and Appendices 1 to 3).

Bioassays

The Table 1 indicates the MIC of Avilin, Juruin_2, and Juruenine against the microorganisms tested. By hemolytic assay, it was observed that only Avilin has toxic effects in MIC concentrations (Figures 2C, 3D, and 4D). Concerning cytotoxicity assay, the viability of cells decreased at the maximum concentrations tested for all samples, and Juruenine is the molecule with the lowest cytotoxicity observed (cell viability between 70-90%) (Figures 2D, 3E, and 4E).

Characterization of antimicrobial fractions

Avilin (Fraction 1)

No significant results were obtained in the analyzes carried out with PEAKS X and MassAnalyzer. In the searches performed with the Mascot Server, it was observed that Avilin has a similarity with the theraphotoxin U12-TRTX-Hs1a from the venom of the spider *Cyriopagopus schmidtii*. Using this theraphotoxin as a reference were performed searches among the predicted proteins obtained in the transcriptomic analysis, thus, it was identified the transcript which encodes the Avilin (NODE_18923), as well as their complete sequence with signal peptide, propeptide, and active peptide (Figure 2A and Appendice 4).

By aligning Avilin with five other theraphotoxins which has ICK motif, it is observed that it also probably has this structure, with disulfide bridges formed between C1-C4, C2-C5, and C3-C6 (Figure 2B). Additionally, using ProtParam the molecular mass of the active peptide region of Avilin was evaluated at 3,260.9 Da. Its cationic character was also verified due to the presence of eight positively charged amino acids (five lysines and three arginines), with pI calculated at 9.08.

Juruin_2 (Fraction 19)

By analyzes carried out with PEAKS X, it was observed high similarity with the antimicrobial peptide Juruin, which was previously isolated and characterized in *A. juruensis* venom by Ayroza et al. (2012) (Figure 3A). Additionally, it was identified that the transcript NODE_41161 encodes the Juruin and Juruin_2 (Figure 3B and Appendice 5).

Analyses carried out with Mascot Server indicated that Juruin_2 has similarity with the theraphotoxin U4-TRTX-Hhn1ac from the venom of the spider *Cyriopagopus*

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

hainanus and, as expected, it has ICK motif with disulfide bridges formed between C1-C4, C2-C5, and C3-C6 (Figure 3C).

Searches performed using MassAnalyzer indicated a molecular mass of 4,319.1 Da (Appendice 6), which corresponds to the Juruin molecule with DR and G amino acids linked to its N and C-terminal portions, respectively (**DRFTCAISCNIKVNGKPKKGSGEKKCSGGWSCKFNVCVKVG**). This result shows that even with three more amino acid residues linked to its original structure, Juruin still maintains its antimicrobial action, and this isoform was named Juruin_2.

By ProtParam was verified that Juruin_2 has a cationic character due to the presence of eight positively charged amino acids (seven lysines and one arginine), with pI calculated at 9.27.

Juruenine (Fraction 24)

No significant results were obtained in the analyzes carried out with the Mascot Server. In the searches performed with PEAKS X, it was observed that Juruenine contains peptide fragments corresponding to the transcript NODE_17940 (Figure 4A and Appendice 7). Using BLASTp it was identified similarity with the theraphotoxins U5-TRTX-Hhn1a and U6-TRTX-Hhn1a from the venom of the spider *Cyriopagopus hainanus*. By alignment and comparison with these toxins, the signal peptide, propeptide, and active peptide were identified (Figure 4B).

As Avilin and Juruin_2, Juruenine probably has an ICK motif in this structure, with disulfide bridges formed between C1-C4, C2-C5, and C3-C6 (Figure 4C). Searches performed using MassAnalyzer indicated a molecular mass of 4,221.6 Da (Appendice 8), which corresponds to the fragment

GDCHKFLGWCRGEPDPCCEHLSCSRKHGWCVWDWTV, the active peptide of Juruenine. Additionally, by ProtParam it was verified that the active peptide has an anionic character due to the presence of eleven negatively charged amino acids (five aspartic acid and six glutamic acid), with pI calculated at 5.46.

Discussion

The study of antimicrobial molecules is an important strategy to identify substances that may be alternatives to actual antibiotics. Several works carried out with invertebrates characterized antimicrobial peptides from the hemolymph of *Acanthoscurria rondoniae* (Riciluca *et al.* 2012), *Acutisoma longipes* (Sayegh *et al.* 2016), *Tityus serrulatus* (de Jesus Oliveira *et al.* 2019), and *Triatoma infestans* (Diniz *et al.* 2020), for example. Concerning spider venoms, it was verified the presence of these molecules in the species *Acanthoscurria gomesiana* (Abreu *et al.* 2017), *Lycosa erythrognatha* (Santos *et al.* 2010), *L. singoriensis* (Wang *et al.* 2016), and *Lachesana tarabaevi* (Lazarev *et al.* 2013), for example.

All antimicrobial molecules identified in *A. juruensis* venom are effective against *E. coli* SBS 363 and Avilin has the lowest MIC (1.75 - 3.5 µg/mL), nether than the MIC of the peptide U1-SCRTX-Lg1a from *Loxosceles gaucho* venom (7.6 µg/mL) (Segura-Ramírez and Silva Júnior 2018). Only Juruin_2 prevented the growth of all microorganisms tested, similar to Gomesin, a potent antimicrobial peptide isolated from hemocytes of mygalomorph spider *A. gomesiana* (Silva Júnior *et al.* 2000). However, this peptide has MIC up to four times smaller than Juruin_2. Juruenine showed antimicrobial activity against *M. luteus* A270 and *E. coli* SBS 363, but with a MIC eight times higher for Gram-positive bacteria than Gram-negative, probably due to differences between the cell walls of these bacterias.

In the hemolytic assays, it was observed only Avilin causes hemolysis of human erythrocytes from a concentration of 0.875 $\mu\text{g/mL}$. This characteristic is also observed for the Zodatoxins Ltc 1, Ltc 2a, and Ltc 5 from *L. tarabaevi* venom (Kozlov *et al.* 2006) and Lycosin-II from *L. singoriensis* venom (Wang *et al.* 2016). The Zodatoxins cause hemolysis of rabbit red blood cells at concentrations ranging from 245.6 to 17.4 $\mu\text{g/mL}$, values much higher than those observed for Avilin. The Lycosin-II led to approximately 20% hemolysis of human red blood cells from the concentration of 50 μM .

In cytotoxicity assays, Juruin_2 was the most toxic molecule. However, this cytotoxicity is observed at higher concentrations of which there is antimicrobial activity. The highest MIC is 6.4 μM for *A. niger* and the cytotoxicity is detected from the concentration of 12.5 μM . Furthermore, it was also observed that Juruin_2 is an isoform of Juruin, previously isolated in *A. juruensis* venom by Ayroza *et al.* (2012). In the transcriptomic analysis of the venom glands, the complete nucleotide sequence of the transcript NODE_41161 was not obtained, which made it impossible to identify the signal peptide and propeptide of the Juruin and Juruin_2 molecule. However, it was possible to observe that the amino acid located at position 8 is aspartic acid and not asparagine as described by Ayroza *et al.*, (2012). This can be explained by the fact that the molecular masses of these two amino acids are very similar: aspartic acid has a mass of 115 Da, while asparagine has a mass of 114 Da. Moreover, in the study carried out by Ayroza *et al.*, (2012) only the antifungal activity of Juruin was observed, while in this work it was detected the antimicrobial activity of Juruin_2 was also against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Avilin has a similarity with the theraphotoxin U12-TRTX-Hs1a from the venom of the spider *Cyriopagopus schmidtii*, a neurotoxin that acts by blocking N-type

calcium channels (Jiang *et al.* 2008). Juruin₂ and Juruenine have a similarity with the theraphotoxins U4-TRTX-Hhn1ac, U5-TRTX-Hhn1a, and U6-TRTX-Hhn1a from *C. hainanus* (Tang *et al.* 2010), respectively. All these theraphotoxins are also neurotoxins that act in ion channels. According to Redaelli *et al.* (2010), arachnid neurotoxins can also be potent antimicrobial molecules as, for example, the Cupienins 1a, 1b, 1c, and 1d from *Cupiennius salei* venom (Kuhn-Nentwig *et al.* 2002), the Lycotoxins M-LCTX-Hc1a, M-LCTX-Hc2a, and M-LCTX-Ls2a from *Lycosa carolinensis* (Yan and Adams 1998), CsTx-1 from *Cupiennius salei* (Kuhn-Nentwig *et al.* 2012), and GsMTx-4 (Jung *et al.* 2006) from *Grammostola spatulata*.

Avilin, Juruin₂, and Juruenine probably have the ICK motif in their structure. According to Fujitani *et al.* (2007), the ICK motif is fundamental for the antimicrobial activity of Tachistatins, antimicrobial peptides isolated from the horseshoe crab *Tachyples tridentatus*. The authors observed that Tachystatins A and B are molecules with high similarity, however, in the antimicrobial tests performed, it was noticed that only Tachystatin A is effective against *E. coli*. The difference between the two molecules is in the size of the loop formed between two cysteine residues that form a disulfide bridge. Tachistatin B has a smaller loop, which impairs its antimicrobial potential. Therefore, the ICK motif may also be of fundamental importance for the structure and function of spider venom antimicrobial molecules.

The phylogeny of toxins with ICK motif suggests that they are derived from genes related to β -defensins, a class of innate immunity-related antimicrobial peptides widely found in different living organisms. These toxins may have originated by duplication of genes related to defensins in venom glands, developing new functions during evolution (Fry *et al.* 2009). The existence of β -defensins from *Drosophila melanogaster* reinforces the aforementioned hypothesis. These antimicrobial peptides

act by blocking sodium channels, identical to the mechanism of action of the majority of neurotoxins from arachnids that have an ICK motif (Cohen *et al.* 2009).

Conclusion

In summary, we analyzed the venom of the mygalomorph spider *Avicularia juruensis* and identified 3 new antimicrobial peptides, since they have a molecular mass of less than 10 kDa. Antimicrobial peptides are fundamental molecules from innate immunity found in all living organisms and they are a principal first line of defense against pathogens. Their presence in venom is very important to protect venom glands and, furthermore, considering that the envenomation is the first step of feeding, they could avoid the contamination of the prey by pathogenic microorganisms.

The study of animal venoms is of great importance to carry out the characterization of unknown components and that may have a biotechnological application, in special of spider venoms that are from less studied families compared to those with medical importance.

Acknowledgments: We would like to thank MSc Thiago de Jesus Oliveira for his help in the maintenance of the bioterium where the spiders used in this study were kept. Mariana Salgado Loureiro de Caldas Morone, Ursula Castro de Oliveira, and Milton Yutaka Nishiyama-Jr for their support in the transcriptomic analysis. Ismael Feitosa Lima for his support in the mass spectrometry analysis.

Declaration of interest statement: No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, as well as by the Research Support Foundation of the State of São Paulo (FAPESP/CeTICS - grant No. 2013/07467-1) and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - grant No. 472744/2012-7).

References

- Abreu, T.F., *et al.*, 2017. Peptidomics of *Acanthoscurria gomesiana* spider venom reveals new toxins with potential antimicrobial activity. *Journal of Proteomics*, 151, 232-242.
- Altschul, S.F., *et al.*, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3), 403-410.
- Arbuckle, K., 2017. Evolutionary context of venom in animals. In: A. Malhotra, ed. *Evolution of venomous animals and their toxins*. Dordrecht: Springer Netherlands, 3-31.
- Ayroza, G., *et al.*, 2012. Juruin: an antifungal peptide from the venom of the Amazonian Pink Toe spider, *Avicularia juruensis*, which contains the inhibitory cystine knot motif. *Frontiers in Microbiology*, 3, 324.
- Bond, J.E., *et al.*, 2012. A reconsideration of the classification of the spider infraorder Mygalomorphae (Arachnida: Araneae) based on three nuclear genes and morphology. *PLoS One*, 7 (6), e38753.
- Bushmanova, E., *et al.*, 2019. rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *Gigascience*, 8 (9), giz100.
- Chambers, M.C., *et al.*, 2012. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology*, 30 (10), 918-920.
- Cohen, L., *et al.*, 2009. Drosomycin, an innate immunity peptide of *Drosophila melanogaster*, interacts with the fly voltage-gated sodium channel. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (35), 23558-23563.
- Cordeiro, M.N., *et al.*, 1992. The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *FEBS Letters*, 310 (2), 153-156.
- Cordeiro, M.N., *et al.*, 1993. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon*, 31 (1), 35-42.
- de Jesus Oliveira, T., Oliveira, U.C., and Silva Júnior P.I., 2019. Serrulin: a glycine-rich bioactive peptide from the hemolymph of the yellow *Tityus serrulatus* scorpion. *Toxins (Basel)*, 11 (9), 517.
- Diniz, L.C.L., *et al.*, 2020. Two tachykinin-related peptides with antimicrobial activity isolated from *Triatoma infestans* hemolymph. *Microbiology Insights*, 13, 1178636120933635.
- Dubovskii, P., *et al.*, 2015. Latarcins: versatile spider venom peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72 (23), 4501-4522.
- El-Gebali, S., *et al.*, 2019. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47 (D1), D427-D432.
- Escoubas, P., and Rash, L., 2004. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, 43 (5), 555-574.
- Figueiredo, S.G., *et al.*, 1995. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon*, 33 (1), 83-93.
- Fry, B.G., *et al.*, 2009. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10, 483-511.
- Fu, L., *et al.*, 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28, 3150-3152.

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

- Fujitani, N., *et al.*, 2007. The solution structure of horseshoe crab antimicrobial peptide Tachystatin B with an inhibitory cystine-knot motif. *Journal of Peptide Science*, 13 (4), 269-279.
- Fukushima, C.S., and Bertani, R., 2017. Taxonomic revision and cladistic analysis of *Avicularia* Lamarck, 1818 (Araneae, Theraphosidae, Aviculariinae) with description of three new aviculariine genera. *ZooKeys*, 659, 1-185.
- Gao, B., *et al.*, 2013. Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold. *Bioscience Reports*, 33 (3), e00047.
- Garcia, F., *et al.*, 2013. Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 66 (1), 3-10.
- Gasteiger, E., *et al.*, 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: J.M. Walker, ed. *The proteomics protocols handbook*. Totowa: Humana Press, 571-607.
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27 (2), 221-224.
- Jiang, L., *et al.*, 2008. Molecular diversification based on analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*. *Toxicon*, 51 (8), 1479-1489.
- Jung, H.J., *et al.*, 2006. Lipid membrane interaction and antimicrobial activity of GsMTx-4, an inhibitor of mechanosensitive channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340 (2), 633-638.
- King, G.F., *et al.*, 2008. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon*, 52 (2), 264-276.
- Kozlov, S.A., *et al.*, 2006. Latacins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (30), 20983-20992.
- Kuhn-Nentwig, L., *et al.*, 2002. Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Journal of Biological Chemistry*, 277 (13), 11208-11216.
- Kuhn-Nentwig, L., *et al.*, 2012. A venom-derived neurotoxin, CsTx-1, from the spider *Cupiennius salei* exhibits cytolytic activities. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (30), 25640-25649.
- Lazarev, V.N., *et al.*, 2013. Antimicrobial peptide from spider venom inhibits *Chlamydia trachomatis* infection at an early stage. *Archives of Microbiology*, 195 (3), 173-179.
- Li, W., and Godzik, A., 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22 (13), 1658-1659.
- Luddecke, T., Vilcinskas, A., and Lemke, S., 2019. Phylogeny-guided selection of priority groups for venom bioprospecting: harvesting toxin sequences in tarantulas as a case study. *Toxins (Basel)*, 11 (9), 488.
- Melo-Braga, M.N., *et al.*, 2020. Antimicrobial peptides from Lycosidae (Sundevall, 1833) spiders. *Current Protein & Peptide Science*, 21 (5), 527-540.
- Mello Leitão, C.F.D., 1922. *Theraphosoideas do Brasil*. São Paulo: Revista do Museu Paulista.
- Nascimento, S.M., *et al.*, 2021. Presence of a neprilysin on *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae: Theraphosidae) venom. *Toxin Reviews*, 41 (2), 370-379.

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

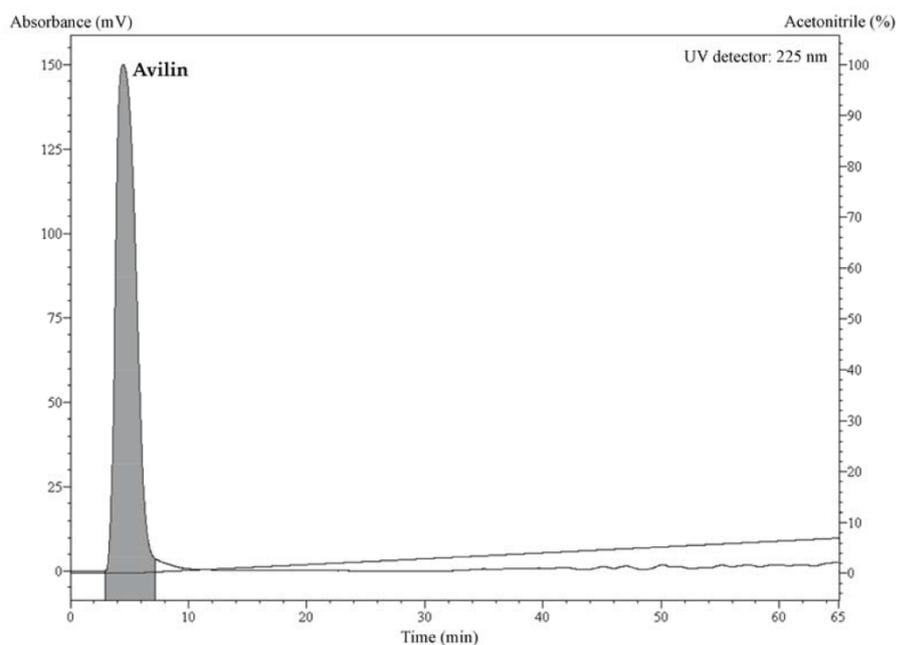
- Perkins, D.N., *et al.*, 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20 (18), 3551-3567.
- Pineda, S.S., *et al.*, 2014. Spider venomics: implications for drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*, 6 (15), 1699-1714.
- Redaelli, E., *et al.*, 2010. Target promiscuity and heterogeneous effects of tarantula venom peptides affecting Na⁺ and K⁺ ion channels. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (6), 4130-4142.
- Riciluca, K.C., *et al.*, 2012. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Results in Immunology*, 2, 66-71.
- Rocha-e-Silva, T.A.A., Sutti, R., and Hyslop, S., 2009. Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon*, 53 (1), 153-161.
- Saez, N.J., *et al.*, 2010. Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins (Basel)*, 2 (12), 2851-2871.
- Saez, N.J., and Herzig, V., 2019. Versatile spider venom peptides and their medical and agricultural applications. *Toxicon*, 158, 109-126.
- Santos, D.M., *et al.*, 2010. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Amino Acids*, 39 (1), 135-144.
- Santos, D.M., Reis, P.V., and Pimenta, A.M.C., 2016. Antimicrobial peptides in spider venoms. In: P. Gopalakrishnakone, *et al.*, eds. *Spider venoms*. Dordrecht: Springer Netherlands, 361-377.
- Sayegh, R.S.R., *et al.*, 2016. Longipin: an amyloid antimicrobial peptide from the harvestman *Acutisoma longipes* (Arachnida: Opiliones) with preferential affinity for anionic vesicles. *PLoS One*, 11 (12), e0167953.
- Segura-Ramírez, P.J., and Silva Júnior, P.I., 2018. *Loxosceles gaucho* spider venom: an untapped source of antimicrobial agents. *Toxins (Basel)*, 10 (12), 522.
- Silva Júnior, P.I., Daffre, S., and Bulet, P., 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (43), 33464-33470.
- Stothard, P., 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28 (6), 1102-1104.
- Tang, X., *et al.*, 2010. Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses. *Journal of Proteome Research*, 9 (5), 2550-2564.
- The Uniprot Consortium, 2021. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49 (D1), D480-D489.
- Wang, Y., *et al.*, 2016. The spider venom peptide Lycosin-II has potent antimicrobial activity against clinically isolated bacteria. *Toxins (Basel)*, 8 (5), 119.
- Wheeler, T.J., and Eddy, S.R., 2013. nhmmer: DNA homology search with profile HMMs. *Bioinformatics*, 29 (19), 2487-2489.
- Windley, M.J., *et al.*, 2012. Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins*, 4 (3), 191-227.
- World Spider Catalog, 2022. [online]. Available from: <http://wsc.nmbe.ch> [Accessed 10 September 2022].

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

- Yan, L., and Adams, M.E., 1998. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (4), 2059-2066.
- Zhang, Y., 2015. Why do we study animal toxins? *Zoological Research*, 36 (4), 183-222.
- Zhao, H., *et al.*, 2011. A defensin-like antimicrobial peptide from the venoms of spider, *Ornithoctonus hainana*. *Journal of Peptide Science*, 17 (7), 540-544.

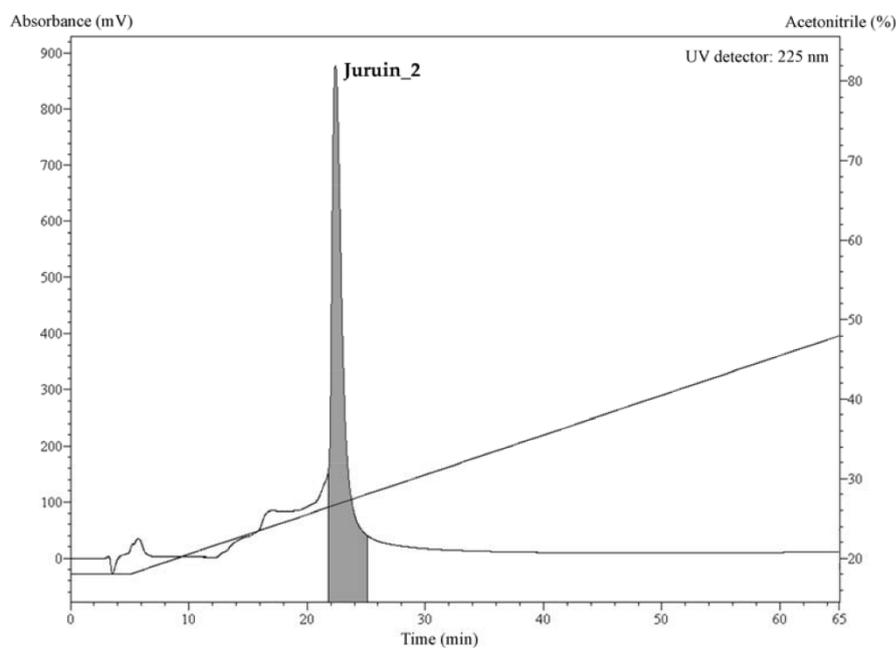
bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Appendices



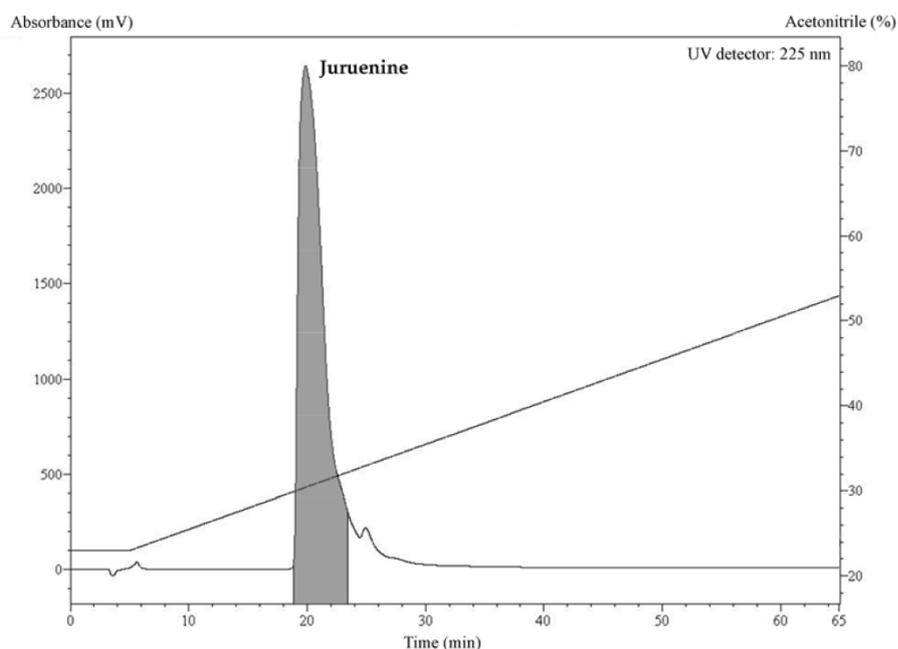
Appendice 1: Chromatographic profile of the second high-performance liquid chromatography step performed with the fraction 1. Elution was carried out using an analytic reverse-phase column Jupiter® C18 (Phenomenex) under a flow rate of 1 mL/minute for 60 minutes. A linear gradient of acetonitrile in acidified water was calculated according to its retention time observed in the first chromatography step (from 0 to 7%). The purified antimicrobial fraction obtained was named Avilin.

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



Appendice 2: Chromatographic profile of the second high-performance liquid chromatography step performed with the fraction 19. Elution was carried out using an analytic reverse-phase column Jupiter® C18 (Phenomenex) under a flow rate of 1 mL/minute for 60 minutes. A linear gradient of acetonitrile in acidified water was calculated according to its retention time observed in the first chromatography step (from 18 to 48%). The purified antimicrobial fraction obtained was named Juruin_2.

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



Appendice 3: Chromatographic profile of the second high-performance liquid chromatography step performed with the fraction 24. Elution was carried out using an analytic reverse-phase column Jupiter® C18 (Phenomenex) under a flow rate of 1 mL/minute for 60 minutes. A linear gradient of acetonitrile in acidified water was calculated according to its retention time observed in the first chromatography step (from 23 to 53%). The purified antimicrobial fraction obtained was named Juruenine.

```

atg aat caa aaa ata ata gtt ttt ctt atg gtt ctt acc ctt gtg att tgc agt cat gca gaa cag gaa ttt gaa ccc gat atc gga
M  N  Q  K  I  I  V  F  L  M  V  L  T  L  V  I  C  S  H  A  E  Q  E  F  E  P  D  I  G

gac gca cca cta ttt caa gag aat ttt gaa agg gga tgc ttt aga gaa ggc cat gcg tgc aca aag tct gct cct tgc tgt agg ccc
D  A  P  L  F  Q  E  N  F  E  R  G  C  F  R  E  G  H  A  C  T  K  S  A  P  C  C  R  P

atg aaa tgt aaa gaa agg aaa tgc act aag aca taa
M  K  C  K  E  R  K  C  T  K  T  *

```

Appendix 4: Nucleotide sequence and translated amino acids of NODE_18923 (Xpression_FPKM 943.26), which encodes the Avilin. The cysteines that form disulfide bonds are highlighted in black.

```

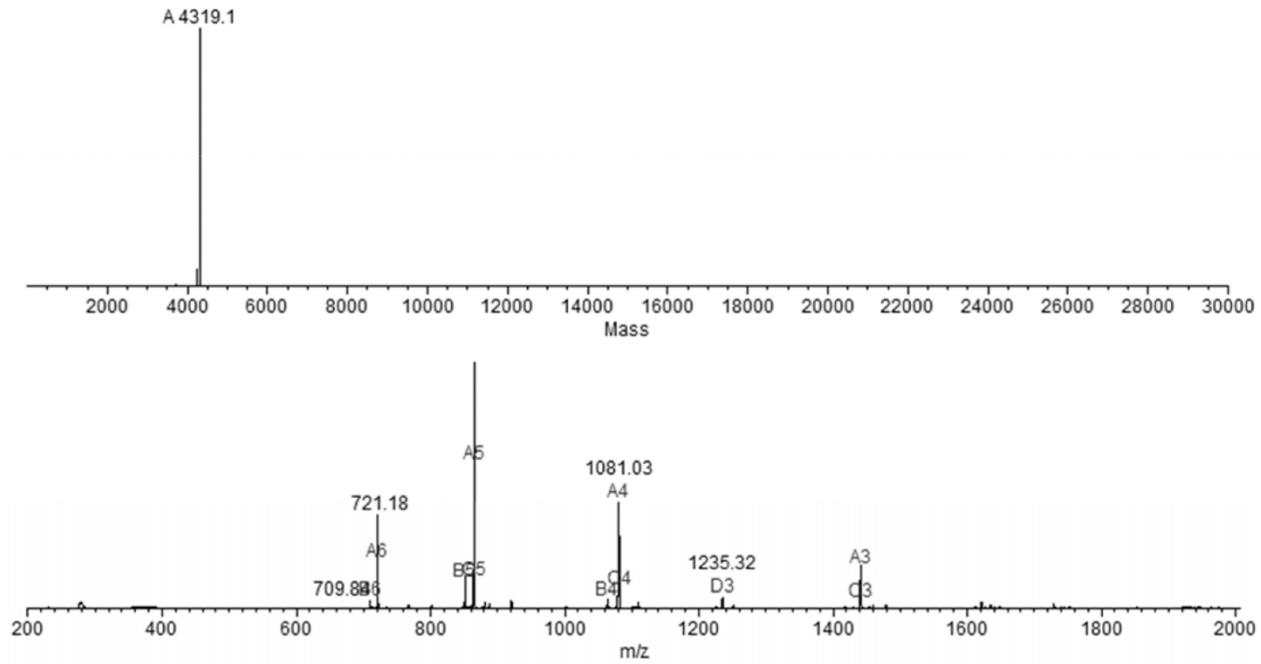
ttg att gcc atc ctt gta tgc gct ttg tta tac att tcc cac gca gag gaa ctc gaa gca caa gat ttg atg ata cct aaa gat tac
L I A I L V C A L L Y I S H A E E L E A Q D L M I P K D Y

                Juruin_2 Juruin
                ↓       ↓
gaa aca gca att gca cct ctg gaa gaa gac aga ttc acg tgt gcc ata tca tgc aac ata aaa gtg aac gga aaa ccg tgt aaa ggc
E T A I A P L E E D R F T C A I S C N I K V N G K P C K G

                                Juruin Juruin_2
                                ↓       ↓
agt ggg gag aag aag tgt tca ggc gga tgg tca tgc aaa ttt aat gtc tgc gta aaa gtg ggg aaa tag
S G E K K C S G G W S C K F N V C V K V G K *

```

Appendix 5: Nucleotide sequence and translated amino acids of NODE_41161 (Xpression_FPKM 10,965.1), which encodes the Juruin and Juruin_2. The arrows indicate the regions that correspond to each molecule. The cysteines that form disulfide bonds are highlighted in black.



Appendice 6: Determination of molecular mass of Juruin_2 by MassAnalyzer 1.03 (Amgen), the analysis indicated mass of 4,319.1 Da.

```

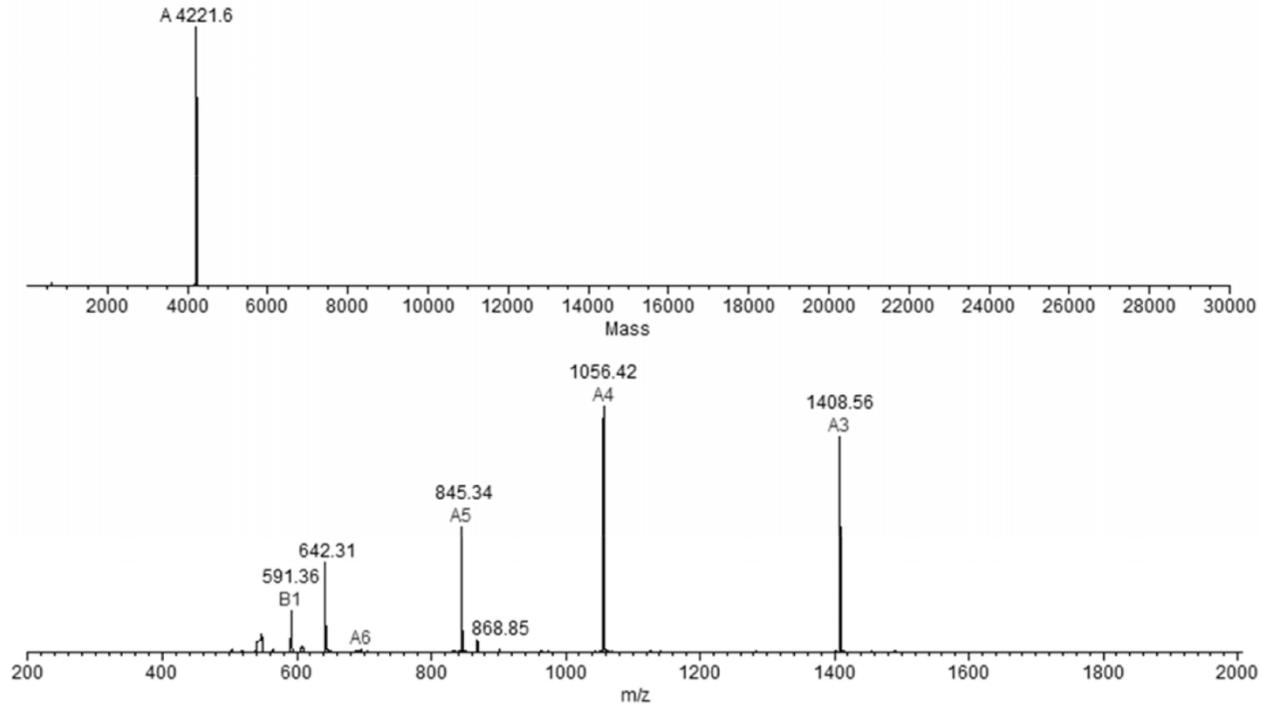
atg aag gca ttc gtt gtg ttg gct att gca gca tta gct ctg ctt tct gtt gtt tgt tat gct tcc gaa tcg aag gag caa gat tct
M  K  A  F  V  V  L  A  I  A  A  L  A  L  L  S  V  V  C  Y  A  S  E  S  K  E  Q  D  S

ctt gat gaa atg tcg gcc att ctc tcg gaa cag cct cag caa aga gga gac tgc cat aag ttt ctg gga tgg tgc aga ggc gaa ccg
L  D  E  M  S  A  I  L  S  E  Q  P  Q  Q  R  G  D  C  H  K  F  L  G  W  C  R  G  E  P

gat cca tgc tgt gaa cat ttg tct tgt agt agg aaa cat gga tgg tgt gta tgg gat tgg acc gtc
D  P  C  C  E  H  L  S  C  S  R  K  H  G  W  C  V  W  D  W  T  V

```

Appendix 7: Nucleotide sequence and translated amino acids of NODE_17940 (Xpression_FPKM 460.63), which encodes the Juruenine. The cysteines that form disulfide bonds are highlighted in black.



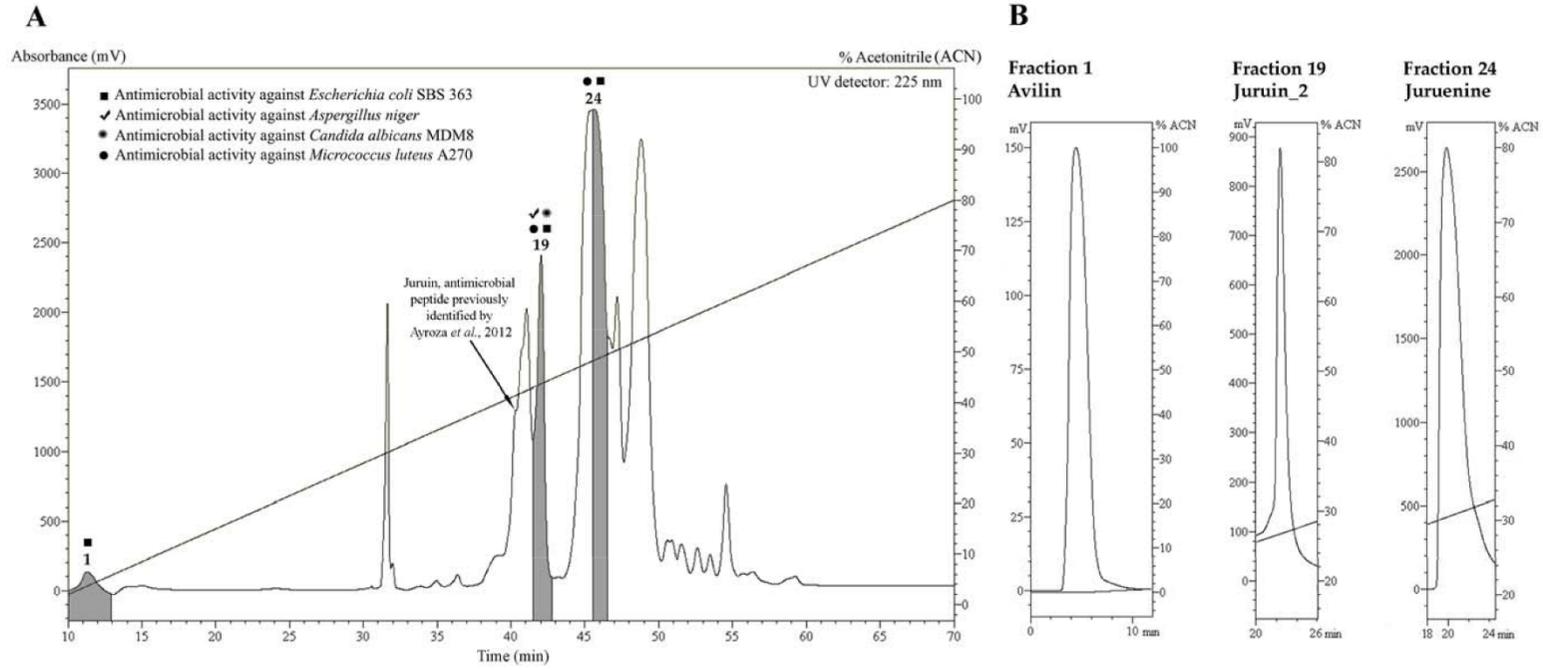
Appendix 8: Determination of molecular mass of Juruenine by MassAnalyzer 1.03 (Amgen), the analysis indicated mass of 4,221.6 Da.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial fractions.

Microorganism	Avilin		Juruin_2		Juruenine	
	MIC (μM)	MIC (μg/mL)	MIC (μM)	MIC (μg/mL)	MIC (μM)	MIC (μg/mL)
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	3.2 - 6.4	13.8 - 27.6	-	-
<i>Candida albicans</i> MDM8	-	-	1.6 - 3.2	6.9 - 13.8	-	-
<i>Escherichia coli</i> SBS 363	ND	1.75 - 3.5	1.6 - 3.2	6.9 - 13.8	2.5 - 5	10.46 - 20.92
<i>Micrococcus luteus</i> A270	-	-	1.6 - 3.2	6.9 - 13.8	20 - 40	83.67 - 167.35

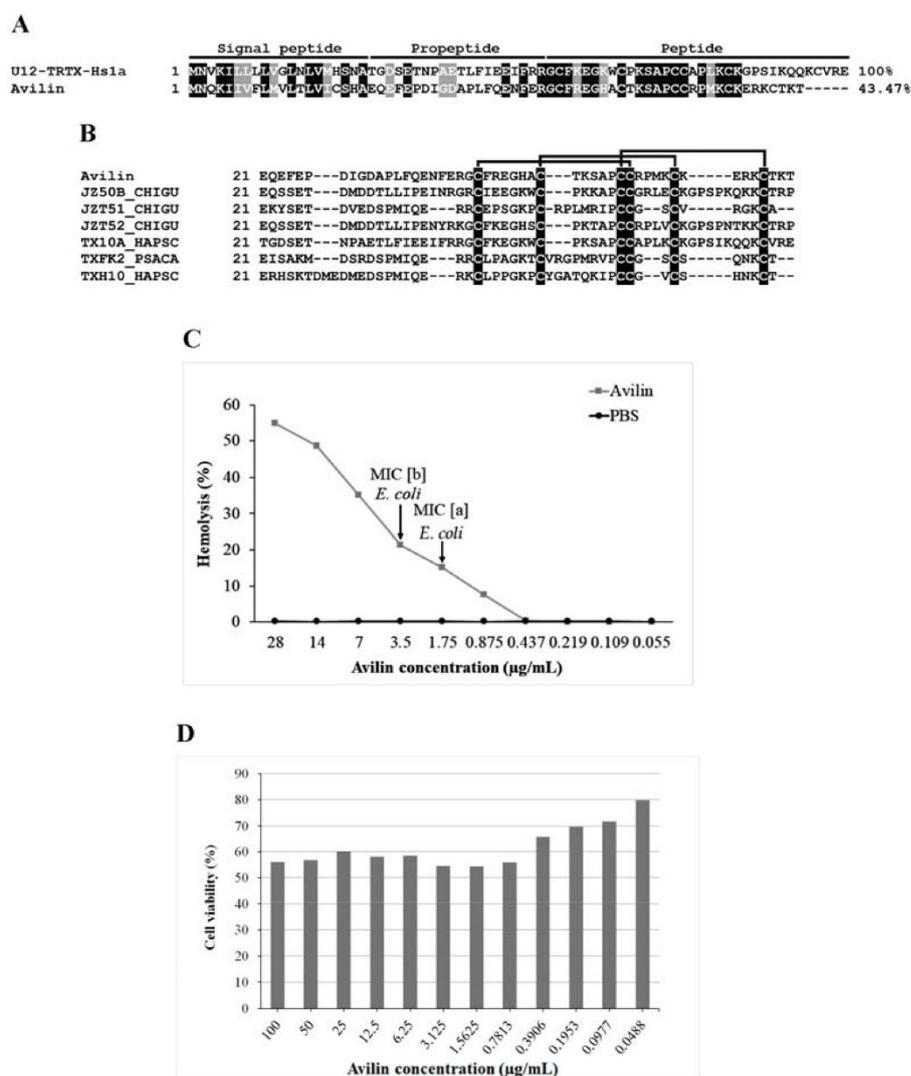
Avilin, Juruin_2, and Juruenine were tested against the fungi *Aspergillus niger*, the yeast *Candida albicans* (strain MDM8), the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (strain SBS 363), and the Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* (strain A270). Symbol (-): not detected. ND: not determinate.

Figure 1



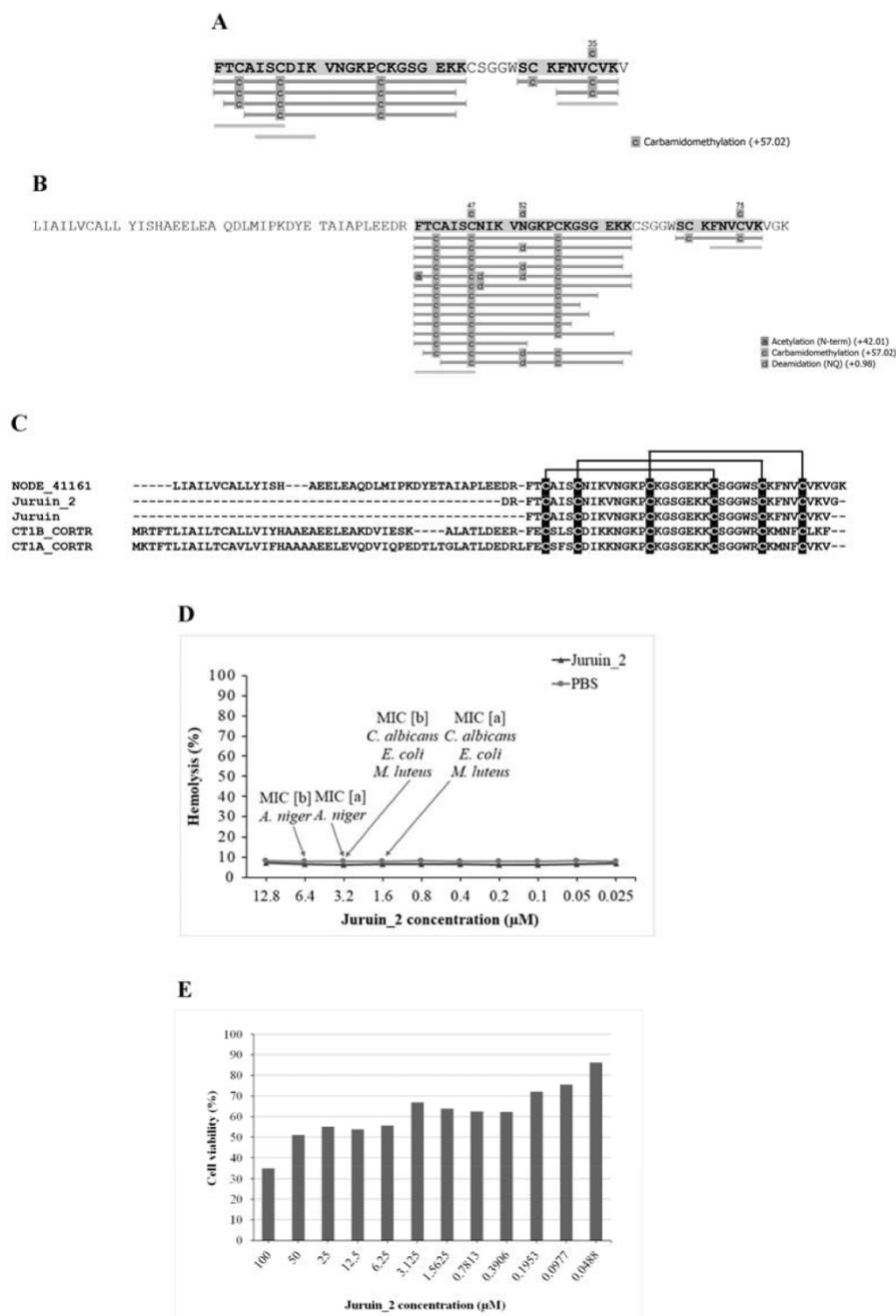
bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Figure 2



bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Figure 3



bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Figure 4

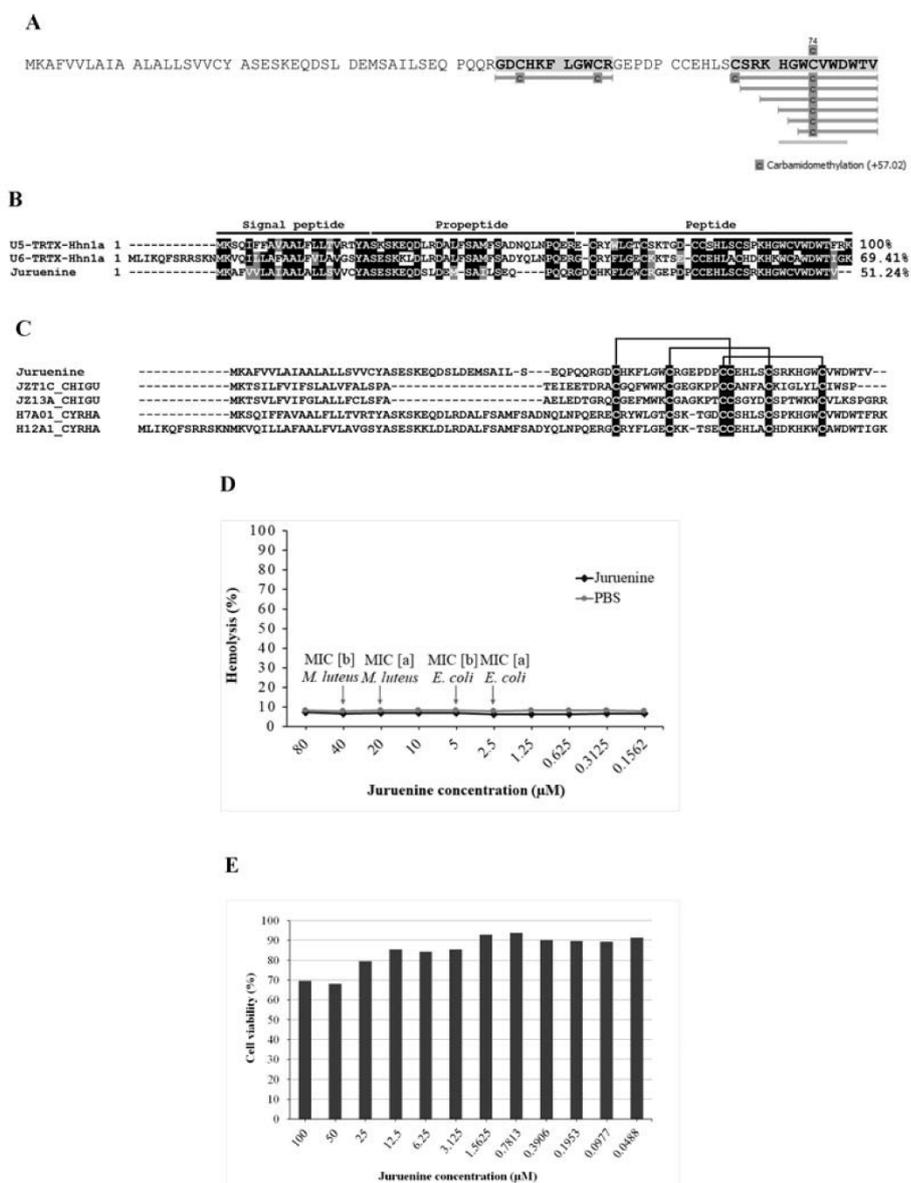


Figure captions

Figure 1. (A) Chromatographic profile of *Avicularia juruensis* venom, obtained by high-performance liquid chromatography carried out with a semi-preparative reverse-phase column Jupiter® C18 (Phenomenex). Elution was performed using a gradient of 2 to 80% of acetonitrile in acidified water, over 60 minutes under a flow rate of 1.5 mL/minute. The fractions corresponding to the peaks observed in the chromatogram were collected separately, those with antimicrobial activity are highlighted: fraction 1, which prevented the growth of the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* SBS 363; fraction 19, which prevented the development of the fungus *Aspergillus niger*, the yeast *Candida albicans* MDM8, the Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* A270 and *E. coli* SBS 363; and fraction 24, which prevented the growth of *E. coli* SBS 363 and *M. luteus* A270. The fraction corresponding to the antimicrobial peptide Juruin (previously identified in *A. juruensis* venom by Ayroza *et al.*, 2012) is also indicated. (B) Chromatographic profiles of the second high-performance liquid chromatography step performed with the fractions 1, 19, and 24. Elutions were carried out using an analytic reverse-phase column Jupiter® C18 (Phenomenex) under a flow rate of 1 mL/minute for 60 minutes. A linear gradient of acetonitrile in acidified water was calculated specifically for each sample according to their retention time observed in the first chromatography step: fraction 1 = from 0 to 7%, fraction 19 = from 18 to 48%, and fraction 24 = from 23 to 53%). The purified antimicrobial fractions obtained were named Avilin, Juruin_2, and Juruenine.

Figure 2. (A) Alignment of Avilin with the theraphotoxin U12-TRTX-Hs1a from the venom of the spider *Cyriopagopus schmidtii*. The signal peptide, propeptide, and active peptide are indicated. Conserved amino acids are shown in black, those with the same chemical character are shown in gray, and non-conserved amino acids are shown in white. The percentages of identity, compared to the first sequence, are indicated at the end of the amino acid sequence. The symbol (-) represents the gaps. (B) Alignment of Avilin with five theraphotoxins that have the Inhibitor Cystine Knot (ICK) motif. The disulfide bridges are formed between C1-C4, C2-C5, and C3-C6 (highlighted in black). Uniprot ID JZT52_CHIGU: theraphotoxin U5-TRTX-Cg1a from the venom of the spider *Chilobrachys guangxiensis*. TX10A_CYRSC: theraphotoxin U12-TRTX-Hs1a from *Cyriopagopus schmidtii*. JZ50B_CHIGU, JZ50A_CHIGU, and JZ50C_CHIGU: isoforms of the theraphotoxin U4-TRTX-Cg1a from *C. guangxiensis*. (C) Hemolytic

effect of Avilin on human erythrocytes. The concentration-response curves of hemolytic activity show its toxicity at different concentrations. The arrows indicate the minimum inhibitory concentration at which Avilin has antimicrobial activity against *Escherichia coli* SBS 363 ([a] is the highest concentration at which the microorganism grows and [b] is the lowest concentration that inhibits the growth). PBS was used as a negative hemolysis control. (D) Cytotoxic effect of Avilin on Vero cells (ATCC CCL81). The cells were incubated with different concentrations of Avilin (0.05 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h at 37°C. The effects on cell viability were determined by MTT colorimetric assay. Untreated cells were used as a negative cytotoxic control.

Figure 3. (A) Result obtained in mass spectrometry analyses of Juruin_2, carried out by PEAKS Studio software X Plus (Bioinformatics Solution). Juruin_2 has peptide fragments corresponding to the antimicrobial peptide Juruin (Ayroza *et al.*, 2012), which are highlighted by gray shadings and bars. The carbamidomethylation of cysteines (post-translational modification) is indicated. (B) By mass spectrometry, it was also possible to identify that the NODE_41161 encodes the Juruin and Juruin_2. The peptide fragments detected are highlighted by gray shadings and bars. N-term acetylation, carbamidomethylation of cysteines, and NQ deamidation (post-translational modification) are indicated. (C) Alignment of the translated amino acids of NODE_41161, Juruin, and Juruin_2 with two theraphotoxins that have the Inhibitor Cystine Knot (ICK) motif. The disulfide bridges are formed between C1-C4, C2-C5, and C3-C6 (highlighted in black). Uniprot ID CT1B_CORTR: theraphotoxin U1-TRTX-Ct1b from the venom of the spider *Coremiocnemis tropix*. CT1A_CORTR: theraphotoxin U1-TRTX-Ct1a from *C. tropix*. (D) Hemolytic effect of Juruin_2 on human erythrocytes. The concentration-response curves of hemolytic activity show its toxicity at different concentrations. The arrows indicate the minimum inhibitory concentration at which Juruin_2 has antimicrobial activity against *Escherichia coli* SBS 363, *Micrococcus luteus* A270, *Candida albicans* MDM8, and *Aspergillus niger*. ([a] is the highest concentration at which the microorganism grows and [b] is the lowest concentration that inhibits the growth). PBS was used as a negative hemolysis control. (E) Cytotoxic effect of Juruin_2 on Vero cells (ATCC CCL81). The cells were incubated with different concentrations of Juruin_2 (100 to 0.0488 μM) for 24 h at 37°C. The effects on cell viability were determined by MTT colorimetric assay. Untreated cells were used as a negative cytotoxic control.

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511474>; this version posted October 9, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Figure 4. (A) Result obtained in mass spectrometry analyses of Juruenine, carried out by PEAKS Studio software X Plus (Bioinformatics Solution). Juruenine has peptide fragments corresponding to the NODE_17940, which are highlighted by gray shadings and bars. The carbamidomethylation of cysteines (post-translational modification) is indicated. (B) Alignment of Juruenine with the theraphotoxins U5-TRTX-Hhn1a and U6-TRTX-Hhn1a from the venom of the spider *Haplopelma hainanum*. The signal peptide, propeptide, and active peptide are indicated. Conserved amino acids are shown in black, those with the same chemical character are shown in gray, and non-conserved amino acids are shown in white. The percentages of identity, compared to the first sequence, are indicated at the end of the amino acid sequence. The symbol (-) represents the gaps. (C) Alignment of Juruenine with four theraphotoxins that have the Inhibitor Cystine Knot (ICK) motif. The disulfide bridges are formed between C1-C4, C2-C5, and C3-C6 (highlighted in black). Uniprot ID JZT1C_CHIGU: theraphotoxin Delta-TRTX-Cg1a from the venom of the spider *Chilobrachys guangxiensi*. JZ13A_CHIGU: theraphotoxin U10-TRTX-Cg1a from *Coremiocnemis tropix*. H7A01_CYRHA: theraphotoxin U5-TRTX-Hhn1a from *Cyriopagopus hainanus*. H12A1_CYRHA: theraphotoxin U6-TRTX-Hhn1a from *C. hainanus*. (D) Hemolytic effect of Juruenine on human erythrocytes. The concentration-response curves of hemolytic activity show its toxicity at different concentrations. The arrows indicate the minimum inhibitory concentration at which Juruenine has antimicrobial activity against *Escherichia coli* SBS 363 and *Micrococcus luteus* A270 ([a] is the highest concentration at which the microorganism grows and [b] is the lowest concentration that inhibits the growth). PBS was used as a negative hemolysis control. (E) Cytotoxic effect of Juruenine on Vero cells (ATCC CCL81). The cells were incubated with different concentrations of Juruenine (100 to 0.0488 μ M) for 24 h at 37°C. The effects on cell viability were determined by MTT colorimetric assay. Untreated cells were used as a negative cytotoxic control.

Resumo publicado na revista *Toxins* - Indexada ao *PubMed* com fator de impacto 5.075

Abstracts / *Toxicon* 168 (2019) S1–S42

S39

redness of the face and neck, swelling of the eyes and urticaria were more frequent. Regarding the skin test, the subjects presented allergy to foods and respiratory allergens. Serum specific IgE dosage was lower for Bj toxins than C.d.t toxins. It is known that several particles of the venom can spread through the air and induce several IgE-mediated responses. Quantitatively the reactivity was higher with venom of the genus *Crotalus* snake. But all the individuals that showed reactivity for this genus also presented for *Bothrops* sp. PLA2 is present in the venom of both snakes, being homologous, we believe that for this reason reactivity occurs for both types of snakes.

9. OTHERS 0100

AVICULARIA JURUENSIS'S VENOM: A RICH SOURCE OF NEUROTOXINS

Soraia Maria Do Nascimento¹, Ursula Castro De Oliveira¹, Milton Yutaka Nishiyama Junior¹, Alexandre Keiji Tashima², Pedro Ismael Da Silva Junior¹. ¹Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil; ²Universidade Federal De São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Introduction and Objectives: Spiders inhabit almost every environment. This broad distribution suggests that they have efficient strategies that improve survival, like venom production. Spider venoms are estimated to be composed by 12 million molecular compounds, most of them can be better explore as potential molecules with therapeutic and biotechnological applications. Recent studies describe that spider venom toxins can be used to treat different disorders including: neurodegenerative and skeletal muscle diseases, pain and metabolic disorders. Therefore, the aim of this study was to analyze the composition of the venom of mygalomorph spider *Avicularia juruensis*, searching for molecules with potential for development of new therapeutic drugs.

Material and Methods: Five days after venom milking by electrical stimulation, the venom glands were removed and total RNA was purified. cDNA libraries were prepared and sequencing was performed in Illumina HiSeq1500 as pair-end run. Databases were created by manual analysis of results. The crude venom was digested by trypsin and analyzed by mass spectrometry by data-dependent acquisition approach in Synapt G2 HDMS instrument. Finally, we used the software Peaks[®] to compare results obtained by transcriptomic analysis and mass spectrometry, in order to estimate venom composition. This study was certified by Butantan Institute Ethic Committee by protocol number CEUAx 5082310816. Spiders were collected under Sisbio n°11024-3 and CGEN n°010345/2014-0 licenses.

Results and Discussion: By transcriptomic analysis, 64,020 transcripts were obtained. After manual analysis of these transcripts and comparison with mass spectrometry results, 121 protein sequences were obtained. The theraphotoxins are the main component of the *A. juruensis*'s venom, corresponding to 82 protein sequences and representing 86.5% of gene expression. These toxins are found in the venom of spiders belonging to Theraphosidae family. They can act on a range of molecular targets, mostly of them has neurotoxic effects. *A. juruensis*'s theraphotoxins are classified as: delta, kappa, omega, pi, tau, and U (unknown activity). These results show that *Avicularia juruensis*'s venom is rich in toxins that may be used to create bioinsecticides or medicines. However, new studies are necessary to better understand the mechanism of action of this venom.

0101

PROSPECTION OF THE ANTIVIRAL EFFECT OF BUFOTENINE ON THE RABIES VIRUS INFECTION INHIBITION

Patrícia Mariano Cruz Pereira¹, Hugo Vigerelli De Barros¹, Juliana Mozer Sciani², Rita De Cássia Collaço³, Thalita Rocha², Daniel Carvalho Pimenta¹. ¹Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil; ²Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brazil; ³Universidade Estadual De Campinas, Campinas, SP, Brazil

Introduction and Objectives: Rabies, an incurable disease, kills over 70,000 people every year. *In vitro* experiments showed that nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) can participate on the entry of rabies virus into cells. Bufotenine, a tryptophan-derived alkaloid found in skin secretion of Brazilian toads of *Rhinella* genus and plants of *Leguminosae* family, can inhibit rabies infection *in vitro* and increase the survival rate of intracerebrally virus-infected mice from 15 to 40%. To glimpse on possible

bufotenine mechanisms of action, this study investigated the action of this alkaloid on cell penetration, interaction with nAChR, through liposomes delivery and andphrenic nerve-diaphragm muscle (PND) preparation, as well as a preliminary proteomic study on bufotenine-treated cells.

Material and Methods: Liposomes were obtained from a mixture of phospholipids and cholesterol. We have synthesized both positively and negatively charged liposomes. Size exclusion chromatograph, Ultra-Fast Liquid Chromatography and Electrospray-Ion Trap-Time of Flight were performed in order to identify bufotenine inside the liposomes and verify its ability to penetrate membranes without transmembrane proteins. Male Swiss mice (*Mus musculus* 30g) were used for twitch-tension studies in an organ bath system, with different concentrations of bufotenine (Butantan Ethics Committee number: CEUA 9532050216). For proteomics experiments, neuroblastoma murine cells (N2A) were treated with different concentrations of bufotenine and lysed for intracellular protein attainment. MS² spectra were acquired and protein identification was performed.

Results and Discussion: Our experiments showed that bufotenine cannot passively penetrate either liposomes, suggesting that cell receptors, or other surface molecules, are necessary to facilitate bufotenine cellular entry. However, in PND preparations, bufotenine did not caused neuromuscular blockade, indicating that this alkaloid does not bind to the nAChR, and the blockage of such receptor is not the mechanism of action of bufotenine, regarding the inhibition of virus infection. Our preliminary proteomic data indicate that cytoskeleton proteins (vimentin, tubulin, actin and tropomyosin) are differently expressed when compared to untreated cells, suggesting that other physiological systems, such as viral retrograde transport, and not only the direct cell penetration virus inhibition, could be involved.

0102

PHRAGMOSIS IN ANURANS: A MORPHOLOGICAL AND TOXINOLOGICAL APPROACH.

César Alexandre¹, Pedro Luiz Mailho-Fontana¹, Marta Maria Antoniazzi¹, Edmund D. Brodie, Jr.², Carlos Jared¹. ¹Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil; ²Utah University, Logan, USA

Introduction and Objectives: Protection against water loss is a persistent challenge for modern amphibians that are still poorly adapted to a strictly terrestrial life, keeping them dependent of water (or humidity), at least for reproduction. Their mechanically unprotected and permeable skin makes survival dependent of a variety of morphological, physiological and behavioural adaptations, capable of promoting water balance and protection against predation. In this context, skin mucous and poisonous glands are very important for amphibian life. The group of casque-headed tree frogs developed phragmosis, which is the peculiar behaviour of entering holes or burrows and closing them with any part of the body. *Corythomantis greening* is a casque-headed tree frog that makes use of its hard and spiny head as a cover when protected in holes.

Material and Methods: Specimens were collected in Angicos, State of Rio Grande do Norte, Brazil, and brought to the vivarium of the Cell Biology Laboratory of Instituto Butantan. Phragmosis was experimentally reproduced submitting the animals to a dry environment provided with test tubes mimetizing holes. Conventional procedures for anatomy, histology and histochemistry were used to study the heads and their relation with phragmosis. The secretion extracted from the head skin was tested for toxicity.

Results and Discussion: The animals were induced by low humidity levels to reproduce phragmosis entering backwards in the tubes and closing them with the flat and spiny head, perfectly adapted to the hole aperture by the large and soft lip. We verified that the head is covered by bony spines, surrounded by poisonous glands with great toxicity, which are specially developed in the lip. These glands are trespassed by the spines when the head is compressed, for example, if the animal is attacked by a predator. This seems, therefore, a very successful defensive model were morphology, behaviour and secretion composition act together protecting the animal both from dehydration and predation. While in phragmosis, the animal defends itself stiffing the body and bending the spiny and poisonous head, which makes it practically unattainable by an aggressor.

ANEXO B - Artigo científico publicado em colaboração durante o doutorado

Artigo publicado na revista *Journal of Proteome Research* - Indexada ao PubMed com fator de impacto 5.370

Journal of
proteome
research

pubs.acs.org/jpr

Article

Multomics Profiling of Toxins in the Venom of the Amazonian Spider *Acanthoscurria juruenicola*

Erika S. Nishiduka,[○] Thiago F. Abreu,[○] Fernanda Midori Abukawa, Ursula C. Oliveira, Caio E. O. Tardivo, Soraia M. Nascimento, Gabriel O. Meissner, Olga M. Chaim, Maria A. Juliano, Eduardo S. Kitano, André Zelanis, Solange M. T. Serrano, Pedro I. da Silva Jr, Inácio L. Junqueira-de-Azevedo, Milton Y. Nishiyama-Jr,* and Alexandre K. Tashima*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00593>

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: *Acanthoscurria juruenicola* is an Amazonian spider described for the first time almost a century ago. However, little is known about their venom composition. Here, we present a multomics characterization of *A. juruenicola* venom by a combination of transcriptomics, proteomics, and peptidomics approaches. Transcriptomics of female venom glands resulted in 93,979 unique assembled mRNA transcript encoding proteins. A total of 92 proteins were identified in the venom by mass spectrometry, including 14 mature cysteine-rich peptides (CRPs). Quantitative analysis showed that CRPs, cysteine-rich secretory proteins, metalloproteases, carbonic anhydrases, and hyaluronidase comprise >90% of the venom proteome. Relative quantification of venom toxins was performed by DIA and DDA, revealing converging profiles of female and male specimens by both methods. Biochemical assays confirmed the presence of active hyaluronidases, phospholipases, and proteases in the venom. Moreover, the venom promoted *in vivo* paralytic activities in crickets, consistent with the high concentration of CRPs. Overall, we report a comprehensive analysis of the arsenal of toxins of *A. juruenicola* and highlight their potential biotechnological and pharmacological applications. Mass spectrometry data were deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE repository with the dataset identifier PXD013149 and via the MassIVE repository with the dataset identifier MSV000087777.

KEYWORDS: *Acanthoscurria juruenicola*, spider, venom, quantitative proteomics, peptidomics, transcriptomics, cysteine-rich peptides

INTRODUCTION

Acanthoscurria juruenicola is a Brazilian Mygalomorphae (tarantula) spider that inhabits regions of the Amazon Forest.¹ The specimens were first described in 1923 and reported as very aggressive, biting, and releasing urticating setae when threatened.^{1,2} Despite being aggressive, most tarantulas are essentially harmless to humans. Clinical reports of bites by *Acanthoscurria* spiders represented less than 1% of cases in a specialized hospital in Brazil.³ The main symptoms of *Acanthoscurria* bites were local pain, oedema, and erythema, without late complications such as necrosis.³ Possibly due to the lack of medical relevance, the venom of *Acanthoscurria* spiders remained unexplored by almost a hundred years. This changed recently with the reports of new cysteine-rich peptides (CRPs) from *Acanthoscurria* spiders, such as the U1-TRTX-Ap1a of *A. paulensis*,⁴ μ -TRTX-An1a of *A. natalensis*,⁵ and U1-TRTX-Agm1a, U1-TRTX-Agm2a and U1-TRTX-Agm3a of *A. gomesiana*.⁶ In addition, a report of the genome and of the venom proteome of *A. geniculata*⁷ and a multomics investigation of *A. rondoniae* venom⁸ vastly increased the number of venom toxins described for *Acanthoscurria* spiders.

These studies provided new understanding of the venom composition, gave insights of possible toxin actions, and highlighted the importance of South American *Acanthoscurria* spider venoms as potential sources of new molecules for pharmacological and biotechnological applications, as shown for venoms of other spider genera.^{9–15}

Spider venoms are mainly composed by proteins and bioactive CRPs.^{16,17} Neurotoxic CRPs are the best characterized spider toxins, playing essential role in paralysis and death of prey.¹⁸ Other enzymes and nonenzymatic toxins in the venoms may also act synergistically to disturb the homeostasis and metabolism of the target organism, as recently proposed by the group of Kuhn-Nentwig.¹⁹ However, it is challenging to make generalizations regarding spider

Received: September 28, 2022

Downloaded via UNIV OF SAO PAULO on October 23, 2022 at 01:22:13 (UTC). See <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> for options on how to legitimately share published articles.