



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**Investigação de compostos isolados da peçonha da aranha
caranguejeira *Acanthoscurria natalensis* Chamberlin, 1917 e sua
caracterização química e biológica**

Tania Barth

Orientador: Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Brasília

2018

Dedico este trabalho,

Aos meus amados pais, Adalberto e Edith, que com todo amor e sabedoria cultivaram o meu jardim e me ensinaram que para ele florir, é preciso amor, respeito, dedicação, honestidade, simplicidade... Assim, cada flor que se abre colorida e perfumada, posso colher graças a vocês.

Ao meu filho Hiroshi, a maior e mais bela flor do meu jardim, que me faz sorrir todos os dias e que desperta em mim as mais incríveis emoções e o amor mais profundo.

Agradecimentos

Agradeço especialmente aos meus pais Adalberto e Edith e, meus irmãos Eneide e Jayson, pelo amor pleno e verdadeiro, pelo apoio e incentivo e por compreenderem minha ausência neste período.

Ao meu filho Hiroshi, que em tantos momentos difíceis, senti sua mãozinha macia e cheia de ternura deslizando nos meus cabelos e me confortando profundamente dizendo: mamãe, eu te amo muiiiiiito!!!

Ao meu esposo Renato, pelos gestos de amor, de compreensão e pelas longas conversas que me ajudaram a seguir em frente.

Agradeço aos professores da Morfologia/UESC, Aparecida, Cristina O., Cristina C., Marco, Andréia, Lígia, Lise, Bau, Fábio, Guisla e a professora Jane Lima, amigos queridos, que mesmo sabendo que passariam por um período difícil, me apoiaram e me ajudaram na realização deste trabalho.

Agradeço às instituições, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC e Universidade de Brasília - UnB, que apoiaram a realização do curso de doutoramento.

À Andréia Pinheiro, pela sua amizade e por sua contagiante alegria, que transformaram nossos dias em causos incríveis, que valerão sempre a pena relembrar.

Agradeço ao professor Osmino R. P. Júnior, pela oportunidade, orientação e ensinamentos e, por compreender todas as situações que envolveram meu papel como mãe.

Aos colegas do laboratório de Toxinologia/UnB, Carlos Santana, Ana Carolina e Lucas Ferreira, por compartilharem conhecimentos, pelo socorro prestado nas horas mais críticas (rsrsrs) e por todos os momentos carinhosos e divertidos que passamos.

Agradeço a Dhara, Elisama, Nayara e Tsai, pela imprescindível ajuda com a coleta das amostras e principalmente pelo carinho!

A todos os professores e alunos do laboratório de Toxinologia/UnB, pela convivência harmoniosa e gentil e, por todas as vezes em que de alguma forma me ajudaram, em especial, Kamillinha e Andréia pelo auxílio com os ensaios hemolíticos.

Agradeço ao Washington, Adolfo, Patrícia, Elias e Danilo, do laboratório de Toxinologia/UnB, pela atenção com que sempre me ajudaram e por tudo o que me ensinaram.

Agradeço aos professores Mariana Castro e Wagner Fontes, pela importante contribuição com este trabalho, especialmente a espectrometria de massa e por todas as conversas sempre produtivas, em que aprendi muita coisa e que sempre levavam a mais um passo adiante.

Ao Nuno, um parceiro especial com quem sempre, sempre pude contar e muito aprendi. Seu jeito simples e bem-humorado, transformou momentos difíceis em diversão e tudo isso, vou guardar no lado esquerdo do peito!

Agradeço aos professores, Carlos André, Peter Roepstorff, Eliane Noronha e Sônia Freitas e aos colegas Amanda e Alonso, pois a participação de vocês neste trabalho foi de extrema importância. Agradeço também por compartilharem seu conhecimento de forma tão atenciosa e incentivadora.

Agradeço a Dra. Jaqueline do laboratório de Nanobiotecnologia/UnB, uma grande companheira e incentivadora. Jaque, te agradeço muito pela amizade, pela força e por todos os ensinamentos que você generosamente fez questão de compartilhar comigo.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de Nanobiotecnologia/UnB, pelo carinho e por toda ajuda que recebi.

A todos os professores, especialmente as professoras Consuelo Medeiros e Aline Martins e aos alunos e servidores do LBQP/UnB, que carinhosamente me receberam, me ajudaram e torceram por mim.

Agradeço aos professores da UnB, Diego Madureira, Ricardo Bentes, Eloísa Dutra e, a Patrícia Diniz por terem viabilizado a realização de experimentos em seus laboratórios e a professora Marta R. Magalhães (PUC/GO) que me esclareceu as primeiras dúvidas nos experimentos enzimáticos.

Enfim, tenho certeza que estas palavras não são suficientes para expressar a gratidão que sinto por todos aqueles que verdadeiramente me ajudaram, inclusive aquela ajuda que vem de um simples sorriso.

E, “de acordo com a literatura, a hialuronidase é uma enzima que cliva preferencialmente o ácido hialurônico e ...,” e eu diria ainda, que ela é uma criatura danada, com vida própria e que gosta de causar fortes emoções. Digo isso, porque tudo começou com ela e nossa “relação” foi muito além do que está escrito aqui, pois além do grande aprendizado, conheci várias pessoas que comigo vibraram a cada conquista. Por isso, a ela também agradeço.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	16
1. Aranhas	17
2. Composição da peçonha e atividades biológicas.....	18
2.1. Ação antimicrobiana.....	19
2.2. Ação citotóxica.....	21
2.3. Ação imunomoduladora.....	22
2.4. Acilpoliaminas.....	24
2.5. Enzimas.....	27
2.6. Proteínas CRISP	30
3. <i>Acanthoscurria natalensis</i>	31
II. JUSTIFICATIVA.....	35
III. OBJETIVOS.....	36
IV. ESTRUTURA DA TESE.....	37
PARTE I.....	38
Fracionamento da peçonha de <i>A. natalensis</i> e <i>screening</i> de atividades biológicas.....	38
1. Material e métodos	38
1.1. Material biológico e obtenção da peçonha.....	38
1.2. SDS-PAGE	39
1.3. Fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC)	39
1.4. <i>Screening</i> de atividades biológicas da peçonha	40
2. Resultados	47
2.1. Perfil eletroforético da peçonha	47
2.2. Fracionamento da peçonha por cromatografia de fase reversa	48

2.3. <i>Screening</i> de atividades biológicas da peçonha	50
3. Discussão	57
PARTE II.....	66
Acilpoliaminas: purificação, atividades biológicas e caracterização parcial da estrutura química	66
1. Material e métodos	66
1.1. Recromatografia por RP-HPLC e atividade antimicrobiana	66
1.2. Determinação de CIM e atividade hemolítica.....	67
1.3. Espectroscopia Ultravioleta (UV)	69
1.4. MALDI-TOF/TOF	69
1.5. ESI-MS	70
2. Resultados	70
2.1. Recromatografia por RP-HPLC e atividade antimicrobiana	70
2.2. CIM e atividade hemolítica	76
2.3. Caracterização parcial da estrutura química	79
3. Discussão	90
PARTE III.....	97
Caracterização bioquímica e estrutural de um complexo proteico contendo as proteínas Hialuronidase e CRISP isoladas da peçonha da aranha <i>Acanthoscurria natalensis</i>	97
1. Material e métodos	97
1.1. SDS-PAGE e zimograma	97
1.2. 1D Blue native (BN)-PAGE, 2D BN/SDS-PAGE e zimograma	98
1.3. Digestão <i>in gel</i>	99
1.4. Espectrometria de massa	99
1.5. Sequenciamento N-terminal por degradação de Edman.....	101
1.6. Processamento dos dados e análise da sequencia	101
1.7. Dicroísmo circular (DC).....	103
1.8. Caracterização enzimática	105
2. Resultados	106

2.1. MALDI-TOF e perfil eletroforético da AnHyal	106
2.2. Caracterização estrutural da AnHyal	107
2.3. Análises 1D e 2D BN-PAGE	116
2.4. Análise de dicroísmo circular e estabilidade térmica.....	119
2.5. Caracterização enzimática da AnHyal	121
3. Discussão.....	122
V. CONCLUSÕES.....	129
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
Anexo I. Licença SISBIO.....	147
Anexo II. Autorização CEUA	148
Anexo III. Artigo científico publicado durante o período do doutorado	149

LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

Figura 1. Representação da estrutura química geral das acilpoliaminas.....	26
Figura 2. Exemplar de <i>Acanthoscurria natalensis</i> ..	34
Figura 3. Distribuição da espécie <i>A. natalensis</i> no território brasileiro.....	34

IV. ESTRUTURA DA TESE

PARTE I. Fracionamento da peçonha de *A. natalensis* e screening de atividades biológicas

Figura 1. Perfil eletroforético da peçonha de <i>A. natalensis</i>	49
Figura 2. Perfil cromatográfico de <i>A. natalensis</i> por RP-HPLC	48
Figura 3. Efeito da peçonha e FR5 sobre a viabilidade celular de células tumorais (Hela e MCF7) e não tumorais (NIH3T3)	51
Figura 4. Efeito da peçonha e FR5 sobre macrófagos J774.....	53
Figura 5. Efeito da peçonha e FR5 sobre macrófagos J774 estimulados (LPS).....	54
Figura 6. Atividade proteolítica da peçonha de <i>A. natalensis</i>	55
Figura 7. Atividade fosfolipásica da peçonha de <i>A. natalensis</i>	56
Figura 8. Atividade hialuronidásica da peçonha e frações cromatográficas de <i>A. natalensis</i>	57

PARTE II. Acilpoliaminas: purificação, atividades biológicas e caracterização parcial da estrutura química

Figura 1. Recromatografia (1ª. RC) da fração 5 (FR5)	71
Figura 2. Recromatografia (2ª. RC) das frações 5.13 a 5.18	74
Figura 3. Espectros MALDI TOF/TOF das frações 5.13 a 5.18	75
Figura 4. Atividade antimicrobiana das frações 5.13 a 5.18	77
Figura 5. Atividade hemolítica da peçonha, FR 5 e frações 5.13 a 5.18.....	78

Figura 6. Espectro de absorção UV das frações 5.13 a 5.16 e 5.18.....	80
Figura 7. Análise ESI-MS/MS da ApAn728..	83
Figura 8. Análise ESI-MS/MS da ApAn614a	84
Figura 9. Análise ESI-MS/MS da ApAn614b	86
Figura 10. Análise ESI-MS/MS da ApAn742	87
Figura 11. Análise ESI-MS/MS da ApAn756.	89

PARTE III. Caracterização bioquímica e estrutural de um complexo proteico contendo as proteínas Hialuronidase e CRISP isoladas da peçonha da aranha *Acanthoscurria natalensis*

Figura 1. Análise da AnHyal por SDS-PAGE e zimograma	106
Figura 2. Peptídeos da AnHyal sequenciados <i>de novo</i> com similaridade para a hialuronidase de <i>Brachypelma vagans</i>	108
Figura 3. Peptídeos da AnHyal por degradação de Edman e sequenciados <i>de novo</i> com similaridade para GTx-VA1 de <i>Grammostola rosea</i>	108
Figura 4. Alinhamento múltiplo da AnHyalH com a hialuronidase de outros artrópodes.	114
Figura 5. Alinhamento múltiplo da AnHyalC com CRISPs de aranhas	115
Figura 6. BN-PAGE, 2D BN/SDS-PAGE e/ou zimograma da AnHyal	117
Figura 7. Espectro de Dicroísmo Circular (DC) da AnHyal em função da temperatura	120
Figura 8. Caracterização enzimática da AnHyal.....	121

LISTA DE TABELAS

IV. ESTRUTURA DA TESE

PARTE I. PARTE I

Fracionamento da *peçonha* de *A. natalensis* e screening de atividades biológicas

Tabela 1. Atividade antimicrobiana da *peçonha* de *A. natalensis* e frações cromatográficas. 50

PARTE II. Acilpoliaminas: purificação, atividades biológicas e caracterização parcial da estrutura química

Tabela 1. Atividade antimicrobiana das frações 5.1 a 5.19 73

PARTE III. Caracterização bioquímica e estrutural de um complexo proteico contendo as proteínas Hialuronidase e CRISP isoladas da *peçonha* da aranha *Acanthoscurria natalensis*

Tabela 1. Sequenciamento *de novo* da AnHyal com similaridade para a hialuronidase de *Brachypelma vagans*..... 109

Tabela 2. Sequencia N-terminal e sequenciamento *de novo* da AnHyal com similaridade para GTx-VA1 de *Grammostola rósea*. 110

Tabela 3. Sequenciamento *de novo* dos peptídios da AnHyalH e AnHyalC obtidos pela digestão *in gel*..... 118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Colection
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês “bovine serum albumin”
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CIM	Concentração inibitória mínima
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ESI	Ionização por eletrospray
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
IL	Interleucina
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas sequencial
LPS	Lipopolissacarídeo purificado de <i>Escherichia coli</i> 0127
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Fligth
MeOH	Metanol
[M+H] ⁺	Massa molecular monoisotópica
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Espectrometria de massa, do inglês “mass spectrometry”
MTT	3-(4,5)-dimetilazolil-2,5-difeniltetrazólio
m/z	Massa/carga
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NEED	diamina-di-hidroclorido naftaleno
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
PBS	Tampão fosfato de sódio, do inglês “Phosphate-buffered saline”
RPMI	Meio de cultura celular, do inglês “Roswell Park Memorial Institute”
RMN	Ressonância magnética nuclear
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês “Reversed-Phase High Performance Liquid Chroatography”
SA	Ácido sinapínico, do inglês “Sinapinic acid”
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio - Gel de Poliacrilamida
SFB	Soro fetal bovino
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultravioleta

INVESTIGAÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS DA PEÇONHA DA ARANHA CARANGUEJEIRA *ACANTHOSCURRIA NATALENSIS* CHAMBERLIN, 1917 E SUA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA

RESUMO

A peçonha de aranhas é composta por uma mistura complexa de moléculas, como acilpoliaminas, peptídios e proteínas neurotóxicas e, enzimas, como hialuronidasas. A caracterização destas moléculas tem possibilitado o desenvolvimento de diversas aplicações farmacológicas e biotecnológicas. Contudo, poucas moléculas foram estudadas em aranhas do gênero *Acanthoscurria*, inclusive em *Acanthoscurria natalensis*. Assim, o objetivo deste estudo foi a investigação de compostos presentes na peçonha de *A. natalensis* e sua caracterização química e biológica. A peçonha foi fracionada por cromatografia líquida (RP-HPLC) obtendo-se 18 frações principais. O *screening* de atividades biológicas da peçonha e/ou frações, identificou ação antimicrobiana pronunciada, manutenção da viabilidade celular e redução da produção de óxido nítrico, na fração composta por acilpoliaminas. A peçonha apresentou atividade hialuronidásica correspondente a fração 18 (AnHyal) e nenhuma atividade proteásica e fosfolipásica. A concentração inibitória mínima (CIM) das acilpoliaminas contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* variou entre 128 e 256 μM , sem causar hemólise nestas mesmas concentrações. A estrutura química parcial das acilpoliaminas (614—756 Da) sugerida pelo espectro UV e padrão de fragmentação (ESI-MS/MS), compreende uma unidade tirosil ligada a uma cadeia poliamina, contendo ao menos uma espermidina. A caracterização da AnHyal indicou atividade máxima entre pH 4,0 e 6,0 e temperatura entre 30 e 60°C, degradando preferencialmente o ácido hialurônico. O sequenciamento parcial (LC-MS/MS e degradação de Edman) da AnHyal mostrou similaridades para a hialuronidase da aranha *Brachipelma vagans* e proteína CRISP de *Grammostola rosea*, com 64% e 79% de cobertura proteica, respectivamente. Análises por 1D e 2D BN-PAGE/SDS-PAGE/zimograma, mostraram que a AnHyal é composta pelas proteínas hialuronidase e CRISP, formando um complexo enzimaticamente ativo. Sua estrutura secundária contém 36,15% de α -hélice e a temperatura de desnaturação (T_m) foi de 46,37 °C, sendo esta irreversível. Em conclusão, este estudo possibilitou a identificação e caracterização parcial de acilpoliaminas com propriedades biológicas que podem contribuir para sua qualificação como possível agente terapêutico. Ainda, a AnHyal mostrou a presença de um complexo proteico enzimaticamente ativo entre as proteínas hialuronidase e CRISP, sendo este descrito pela primeira vez. Estudos adicionais poderão elucidar outras propriedades deste complexo, ampliando as possibilidades de aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: aranha, *Acanthoscurria natalensis*, peçonha, acilpoliaminas, antimicrobiano, óxido nítrico, hialuronidase, CRISP, complexo proteico, sequenciamento *de novo*.

INVESTIGATION OF ISOLATED COMPOUNDS FROM SPIDER CARANGUEJEIRA *ACANTHOSCURRIA NATALENSIS* CHAMBERLIN, 1917 AND ITS CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION

ABSTRACT

Spider venom is composed of a complex mixture of molecules, such as acylpolyamines, peptides and neurotoxic proteins, and enzymes such as hyaluronidases. The characterization of these molecules has enabled the development of several pharmacological and biotechnological applications. However, few molecules have been studied in spiders of the genus *Acanthoscurria*, including *Acanthoscurria natalensis*. Thus, the objective of this study was the investigation of the compounds present in *A. natalensis* venom and its chemical and biological characterization. The venom was fractionated by liquid chromatography (RP-HPLC) obtaining 18 main fractions. The *screening* of biological activities of venom and/or fractions, identified pronounced antimicrobial action, maintenance of cellular viability and reduction of nitric oxide production, in the fraction composed of acylpolyamines. The venom presented hyaluronidase activity corresponding to fraction 18 (AnHyal) and no protease and phospholipase activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the acylpolyamines against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* varied between 128 and 256 μM , without causing hemolysis at these same concentrations. The partial chemical structure of the acylpolyamine (614-756 Da) suggested by the UV spectrum and fragmentation standard (ESI-MS / MS) comprises a tyrosyl moiety attached to a polyamine chain containing at least one spermidine. The characterization of AnHyal indicated maximum activity between pH 4.0 and 6.0 and temperature between 30 and 60°C, preferentially degrading hyaluronic acid. AnHyal's partial sequencing (LC-MS / MS and degradation of Edman) showed similarities to the *Brachipelma vagans* spider hyaluronidase and *Grammostola rosea* CRISP protein, with 64% and 79% protein coverage, respectively. Analyzes by 1D and 2D BN-PAGE/SDS-PAGE/zymogram, showed that AnHyal is composed of hyaluron and CRISP proteins, forming an enzymatically active complex. Its secondary structure contains 36.15% α -helix and the denaturation temperature (T_m) was 46.37 ° C, which is irreversible. In conclusion, this study allowed the identification and partial characterization of acylpolyamines with biological properties that may contribute to its qualification as a possible therapeutic agent. Furthermore, AnHyal showed the presence of an enzymatically active protein complex between the hyaluronidase and CRISP proteins, which is described for the first time. Further studies may elucidate other properties of this complex, expanding the possibilities of biotechnological applications.

Keywords: spider, *Acanthoscurria natalensis*, venom, acylpolyamines, antimicrobial, nitric oxide, hyaluronidase, CRISP, protein complex, *de novo* sequencing.

I. INTRODUÇÃO

As aranhas representam um grupo de organismos terrestres com extraordinário sucesso evolutivo, com registros fósseis que datam de 380 milhões de anos, abrangendo o período Devoniano. Este sucesso é sustentado por diversos fatores, como a presença de estruturas especializadas para a transferência segura de sêmen para a fêmea e a presença de um par de glândulas de peçonha na base das quelíceras (Mygalomorpha) ou em seu prossoma (Araneomorpha) (Coddington e Levi, 1991). A peçonha é um importante recurso para estes animais, com o propósito de promover sua alimentação e defesa contra predadores naturais. Assim, dispor de uma peçonha contendo componentes com ação mais inespecífica, possibilita maior eficiência frente a um amplo espectro de presas e predadores (Kuhn-Nentwig, Stöcklin e Nentwig, 2011). Estas ações incluem neurotoxicidade, citotoxicidade e outras associadas a degradação da matriz extracelular (Sannanigaiah, Subbaiah e Kempaiah, 2014). Por outro lado, permanentes modificações ocorridas ao longo da sua evolução, promoveram o desenvolvimento de uma complexa mistura de compostos na peçonha de aranhas, resultando na ampliação dos seus efeitos biológicos (Kuhn-Nentwig, Stöcklin e Nentwig, 2011). Estes foram continuamente sendo investigados e a descoberta de várias outras atividades biológicas relacionadas a peçonha foram aproveitadas para o desenvolvimento de produtos com interesse farmacológico e biotecnológico (Harvey, 2014). Nas últimas décadas, este potencial tem sido demonstrado por diversas pesquisas, que tem possibilitado o isolamento, purificação e caracterização de moléculas da peçonha de várias espécies de aranhas por meio de diferentes metodologias, como a espectrometria de massa, que tem sido uma

importante aliada para novas descobertas (Baldwin, 2004). Mas, apesar deste potencial e da grande diversidade de espécies de aranhas, apenas uma pequena parte deste grupo de animais foi estudado quanto a composição de sua peçonha, correspondendo a aproximadamente 0,4 % das espécies e, menos que um terço das famílias conhecidas (Nentwig, 2013).

1. Aranhas

As aranhas (classe Araneae) compõem um grupo muito diversificado de organismos terrestres, compreendendo aproximadamente 46.986 espécies amplamente distribuídas em diversos continentes (Platnick, 2017). A classe Araneae é dividida em dois grupos: o Mesothelae e o Opisthothelae. O primeiro mantém características plesiomórficas, como a glândula de peçonha pouco desenvolvida. Já o grupo Opisthothelae, apresenta esta glândula bem desenvolvida, o que os torna interessantes do ponto de vista toxinológico. Este grupo é representado pelas subordens Migalomorfos e Araneomorfos (Coddington e Levi, 1991). A glândula de peçonha está localizada dentro das quelíceras (migalomorfos) ou ocupa a porção anterior do cefalotórax (araneomorfos) e suas presas movem-se dorsoventralmente (migalomorfos) ou mediolateralmente (araneomorfos) em direção ao seu alvo, atuando como pinças (Kuhn-Nentwig, Stöcklin e Nentwig, 2011).

A subordem Migalomorfa é um grupo bastante diverso, representado por 16 famílias. Entre estas, destaca-se a família Theraphosidae, que reúne aranhas de grande porte (com até 10 cm de comprimento do corpo) denominadas

caranguejeiras ou tarântulas e contém quase três vezes mais espécies que as demais famílias (Coddington e Levi, 1991).

As aranhas são animais predadores generalistas ecologicamente importantes, alimentando-se predominantemente de insetos e outros pequenos invertebrados. O principal mecanismo para a obtenção de suas presas, bem como sua defesa, se dá pelo uso de sua peçonha (Kuhn-Nentwig, Stöcklin e Nentwig, 2011). Contudo, devido à complexidade de sua composição, o custo energético de produção e a quantidade limitada, as aranhas utilizam este recurso de forma estratégica, visando sua economia e otimização (Cooper, Nelsen e Hayes, 2015).

2. Composição da peçonha e atividades biológicas

A peçonha das aranhas é composta por uma mistura complexa de moléculas biologicamente ativas. Quanto à natureza de sua ação, podem ser divididas em moléculas neurotóxicas e necróticas (citólíticas). Em termos de estrutura química, podem ser agrupadas em: i) compostos de baixa massa molecular (<1 kDa), como sais, carboidratos, aminoácidos, aminas biogênicas e acilpoliaminas; ii) peptídeos (1-10 kDa), como neurotoxinas contendo pontes dissulfeto e peptídeos citolíticos lineares e; iii) compostos de alta massa molecular (>10 kDa) representados por diferentes proteínas, incluindo enzimas e outras neurotoxinas (Vassilevski, Kozlov e Grishin, 2009) e, proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP) (Sanggaard *et al.*, 2014). As acilpoliaminas e peptídeos lineares representam as principais categorias de moléculas produzidas continuamente e que possuem alta potência e seletividade para múltiplos alvos celulares (Kuhn-Nentwig, Stöcklin e Nentwig, 2011). Dentre os compostos enzimáticos, as hialuronidases, proteases,

fosfolipases e esfingomielinases foram extensivamente identificadas e caracterizadas na peçonha de aranhas (Sannanigaiah, Subbaiah e Kempaiah, 2014).

Em humanos, estes compostos podem produzir uma série de eventos adversos, incluindo toxicidade local (edema, hemorragia, dermo e mionecrose) e sistêmica (neurotoxicidade, miotoxicidade, citotoxicidade, alterações hemostáticas e inflamação), os quais podem ser atribuídos ao efeito sinérgico de toxinas enzimáticas e não enzimáticas (Sannanigaiah, Subbaiah e Kempaiah, 2014).

A permanente investigação da diversidade molecular presente na peçonha, das propriedades bioquímicas, estruturais e os mecanismos de ação de seus compostos, revelaram um leque ainda maior de atividades biológicas, ampliando as possibilidades de aplicações farmacológicas e biotecnológicas (Matavel, Estrada e Marco Almeida, 2016; Vassilevski e Grishin, 2011). Assim, os compostos presentes na peçonha podem ser empregados como agentes antimicrobianos, citotóxicos contra células tumorais, imunomoduladores, entre outros (Saez *et al.*, 2010; Utkin, 2015).

2.1. Ação antimicrobiana

A ação antimicrobiana da peçonha de aranhas, assim como em outros organismos, tem sido relacionada a compostos de natureza peptídica, denominados peptídios antimicrobianos (PAMs) (Kuhn-Nentwig, 2003). Os PAMs presentes na peçonha são utilizados especialmente para a obtenção de suas presas e defesa contra predadores, atuando isolada ou sinergicamente com outros compostos (Kuhn-Nentwig, 2003). Os PAMs da peçonha são de natureza

catiônica, anfipática, com estrutura em α -hélice linear e sem resíduos de cisteína (Kuhn-Nentwig, 2003). O caráter anfipático comum a muitos PAMs, confere grande habilidade em provocar distúrbios na membrana plasmática (Giangaspero, Sandri e Tossi, 2001).

A atividade antimicrobiana dos PAMs da peçonha de aranhas é bastante ampla, incluindo peptídios com ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus, fungos e parasitas (Wang e Wang, 2016).

Na peçonha de aranhas, os principais PAMs foram identificados em *Lycosa carolinensis* (licotoxinas I e II) (Yan e Adams, 1998), *Oxyopes takobius* (oxiopininas) (Corzo *et al.*, 2002) e *Cupiennius salei* (cupieninas) (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2002). A atividade antimicrobiana dos peptídios licotoxina I e II (ambos em concentração de 10 a 20 μ M) foi similar contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*, mas contra a bactéria Gram-positiva *Bacillus thuringensis israelenses*, a licotoxina I (5 μ M) foi mais efetiva (Yan e Adams, 1998). Os peptídios oxiopininas mostraram alta atividade contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* (MIC 0,5-1 μ M) e *S. aureus* (MIC 10 μ M) (Corzo *et al.*, 2002), enquanto os peptídios isolados de *C. salei* foram ativos contra as bactérias *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *Enterococcus faecalis* (0,31-5 μ M) (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2002).

A análise da estrutura secundária destes peptídios mostrou uma conformação em α -hélice catiônica anfipática, sendo esta característica estrutural relacionada a muitos PAMs capazes de romper membranas biológicas por meio da formação de poros (Estrada, Villegas e Corzo, 2007; Giangaspero, Sandri e

Tossi, 2001). Desta forma, este mesmo mecanismo foi sugerido para os PAMs da peçonha de aranhas citados acima.

Por outro lado, em estudos posteriores, a atividade antimicrobiana foi identificada também em um grupo de moléculas não peptídicas presentes na peçonha de aranhas, denominadas acilpoliaminas (Ferreira e Silva Junior, 2012; Sutti *et al.*, 2015). Assim, este tema será abordado adiante, no item 2.4 da introdução.

2.2. Ação citotóxica

Compostos isolados da peçonha animais como escorpiões, abelhas, vespas, aranhas, formigas e lagartas, possuem propriedades citotóxicas sobre células tumorais, que são capazes de afetar diferentes funções celulares, como viabilidade celular, apoptose, migração e proliferação celular (Heinen e Veiga, 2011). Estes compostos são representados principalmente por peptídeos e proteínas e têm sido empregados como agentes antitumorais. Algumas relações entre tais propriedades e seus efeitos sobre células tumorais podem ser exemplificadas, como: i) compostos que atuam sobre canais iônicos, podem afetar a fisiologia da célula tumoral bloqueando canais iônicos específicos; ii) compostos que se ligam a alvos específicos na membrana celular, podem causar a morte de células tumorais; iii) compostos que inibem a angiogênese, podem afetar o desenvolvimento do tumor; iv) compostos que são formadores de poros, podem causar permeabilização da membrana e levar a morte celular, entre outros (Heinen e Veiga, 2011).

Em relação a peçonha de aranhas, o seu efeito citotóxico foi avaliado sobre diferentes linhagens tumorais, sendo demonstrado que a peçonha das espécies da família Salticidae provocou o rompimento instantâneo da membrana celular de células N1E-115 (neuroblastoma murino). Contudo, considerou-se que este efeito foi provavelmente devido às enzimas contidas na peçonha e não aos peptídeos ou acilpoliaminas presentes (Cohen e Quistad, 1998). Neste mesmo estudo, uma ação citotóxica mais moderada foi identificada para as espécies das famílias Lycosidae e Oxyopidae, enquanto que as espécies da família Theraphosidae e Arenidae, apresentaram baixa citotoxicidade.

Outros estudos investigaram o efeito da peçonha da aranha *Macrothele raven* (Hexatelidae), sendo demonstrado que *in vitro*, a peçonha diminuiu a proliferação de células HeLa (carcinoma cervical humano) e MCF-7 (câncer de mama humano) de maneira dose dependente e *in vivo*, o tamanho do tumor foi significativamente reduzido (Gao *et al.*, 2005) (Gao *et al.*, 2007).

2.3. Ação imunomoduladora

A imunomodulação está relacionada a ações que modificam a resposta imune de uma maneira positiva ou negativa (Saroj *et al.*, 2012). A estimulação ou supressão da resposta imune pode ser necessária frente a diferentes condições de saúde, como em infecções ou imunodeficiência (Saroj *et al.*, 2012). Algumas moléculas de natureza peptídica foram identificadas como reguladoras do sistema imune, atuando como estimuladores ou supressores da produção de citocinas e mediadores inflamatórios e prevenindo a ativação de macrófagos, por exemplo (Haney e Hancock, 2014). Apesar da complexidade deste processo, algumas

moléculas estão classicamente envolvidas na resposta imune inata, como o óxido nítrico (NO). Este é um importante sinalizador biológico, que apresenta rápida difusão e habilidade para permear membranas celulares, atuando em diversos processos fisiológicos, como regulação da pressão sanguínea, resposta imune e comunicação neural e, patológicos como câncer (Choudhari *et al.*, 2013).

A ação imunomoduladora de compostos da peçonha, representados principalmente por peptídeos, tem sido identificada em alguns animais, como formigas, escorpiões, anêmonas, serpentes, abelhas e anfíbios (Kastin, 2013), porém em aranhas esta propriedade tem sido pouco explorada.

Um estudo relacionado a aranhas, porém não com moléculas da peçonha, avaliou o efeito imunomodulador da Migalina. Esta molécula isolada da hemolinfa de *Acanthoscurria gomesiana*, foi capaz de induzir a produção de interferon gama (IFN- γ) e NO por esplenócitos e macrófagos murinho (Mafrá *et al.*, 2012).

O primeiro relato a respeito de ação imunomoduladora na peçonha de aranhas, refere-se ao peptídeo Cupienina 1a, isolado de *Cupiennius salei*. Esta é uma molécula com importante atividade citolítica, mas também capaz de inibir a formação de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS), cujo mecanismo envolve a formação de um complexo entre a Cupienina 1a e a calmodulina, uma proteína reguladora de cálcio (Pukala *et al.*, 2007).

O peptídeo Tx2-6 purificado da peçonha de *Phoneutria nigriventer*, apresentou um significativo aumento da produção de óxido nítrico no tecido cavernoso de ratos após injeção subcutânea, promovendo a ereção. Este estudo

demonstrou que o peptídeo Tx2-6 é uma molécula promissora para o tratamento da disfunção erétil (Nunes *et al.*, 2008).

Ainda relacionado a peçonha, mas dentro de outro contexto, alguns estudos avaliaram o envolvimento de diversas moléculas nos processos de envenenamento, onde compostos presentes na peçonha podem interagir com proteínas e receptores celulares de células T e macrófagos, por exemplo, resultando em eventuais respostas inflamatórias. Estas envolvem a ativação de células e liberação de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores, como o óxido nítrico. Estes são importantes para a interação entre células do sistema imune e respostas inflamatórias, que tem o propósito de reparar danos teciduais gerados pelo envenenamento (Petricevich, 2004). Por exemplo, a injeção de diferentes doses da proteína F35 isolada da peçonha de *Loxosceles intermedia* e da peçonha total em camundongos, induziu a produção de fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-6, IL-10 e NO no soro, além de diversos sintomas clínicos e alterações histopatológicas (Tambourgi *et al.*, 1998).

2.4. Acilpoliaminas

As acilpoliaminas são um grupo de moléculas presentes em diversos organismos, sendo os mais abundantemente representados na peçonha de aranhas (Estrada, Villegas e Corzo, 2007). Entre as aranhas, as acilpoliaminas foram primeiramente identificadas em *Nephila clavata* e *Argiope lobata* e posteriormente, muitas outras espécies também foram investigadas e um número significativo de acilpoliaminas foi caracterizado (Nentwig, 2013). Mais de cem estruturas químicas já foram elucidadas, sendo as acilpoliaminas presentes em

aranhas da subfamília Nephilinae e do gênero *Argiope*, as que foram amplamente caracterizadas (Palma, 2012).

As acilpoliaminas apresentam massas moleculares entre 350 e 1000 Da e podem ser organizadas em dois grupos, aquelas contendo aminoácidos, presentes em aranhas das famílias Araneidae e Nephilidae e, aquelas sem aminoácidos em sua composição, presentes em algumas famílias como Ctenizidae, Hexathelidae e Theraphosidae (Nentwig, 2013).

A estrutura química geral destas moléculas pode ser dividida em quatro segmentos: i) um grupo acil aromático lipofílico, ii) uma ligação amina, iii) uma cadeia poliamina estrutural e iv) uma cadeia poliamina terminal (Fig. 1). O grupo acil aromático e a estrutura poliamina, compõem a parte principal comum a todas as moléculas conhecidas desta classe, enquanto a ligação amina e a cauda são opcionais, presentes em certas acilpoliaminas (Palma e Nakajima, 2005).

Devido a combinação destes diferentes componentes, as acilpoliaminas podem ser estruturalmente muito diversas, variando em extensão, número de ligações amida e grupos funcionais (Nentwig, 2013; Palma, 2012), de modo que um número ainda maior destas moléculas pode existir.

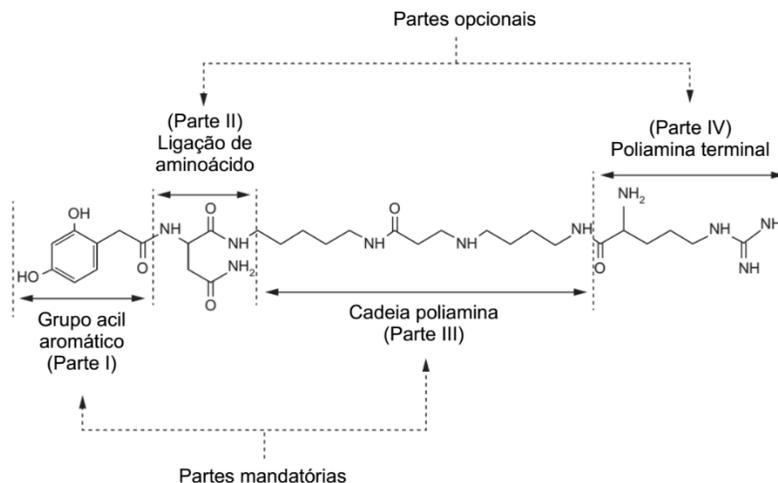


Figura 1. Representação dos blocos estruturais que podem ser encontradas em acilpoliaminas da peçonha de aranhas. Adaptado de Palma, 2012.

Inicialmente, a resolução da estrutura química das acilpoliaminas era obtida por meio de extensiva purificação da peçonha, seguida por técnicas de hidrólise e derivatização, análise de aminoácidos por degradação de Edman e ressonância magnética nuclear (NMR). Mais recentemente, outras estratégias têm sido empregadas envolvendo métodos cromatográficos associados à NMR bidimensional, HRMS e MS/MS, entre outras (Palma, 2012).

As acilpoliaminas são reconhecidas por sua atividade neuromoduladora sobre o sistema nervoso de vertebrados e invertebrados. A presença de cargas positivas nas amins livres e secundárias de sua cadeia poliamina, confere importante ação neuroativa, antagonizando receptores de glutamato e bloqueando seletivamente canais catiônicos (Estrada, Villegas e Corzo, 2007). Contudo, atualmente as acilpoliaminas têm sido investigadas também acerca do seu potencial antimicrobiano.

Em 2007, o estudo realizado por Pereira e colaboradores, identificou uma molécula produzida por hemócitos da aranha caranguejeira *A. gomesiana*, sendo denominada Migalina. A análise estrutural revelou que se tratava de uma acilpoliamina. Esta molécula mostrou uma importante atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas em concentrações micromolares (Pereira *et al.*, 2007).

O primeiro relato sobre a ação antimicrobiana de acilpoliaminas isoladas da peçonha de aranha foi publicado apenas recentemente, sendo esta, uma função biológica anteriormente desconhecida para tais moléculas. A análise da peçonha de *Nephilengys cruentata*, uma espécie de aranha brasileira, revelou a presença de vários peptídeos antimicrobianos e acilpoliaminas, com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos (Ferreira e Silva Junior, 2012).

A acilpoliamina VdTX-I isolada da peçonha da aranha caranguejeira *Vitalius dubius* foi primeiramente identificada como uma molécula antagonista de receptores nicotínicos colinérgicos (Rocha-e-Silva, Sutti e Hyslop, 2009). Posteriormente, a VdTX-I foi avaliada quanto a sua atividade antimicrobiana e mostrou um amplo espectro de atividade contra diferentes linhagens de bactérias e fungos, em concentrações micromolares (Sutti *et al.*, 2015).

2.5. Enzimas

Por algum tempo, pouca atenção foi dada às enzimas presentes na peçonha de aranhas. Atualmente, as enzimas identificadas na peçonha de aranhas podem ser separadas em dois grupos: aquelas que atuam sobre

polímeros da matriz extracelular e as que atuam sobre fosfolipídios de membrana e compostos relacionados. A ação conjunta das enzimas com as demais toxinas da peçonha tem o propósito de transpor as barreiras representadas pela matriz extracelular e assim facilitar o acesso dos demais compostos (Kuhn-Nentwig, Stöcklin e Nentwig, 2011).

A presença de enzimas na peçonha de aranhas, especialmente proteases, foi alvo de questionamento, devido à possibilidade de contaminação por proteases tissulares ou fluido digestivo durante o processo de extração por dissecação ou eletroestimulação, respectivamente (Rash e Hodgson, 2002). Contudo, foi demonstrado que a adoção de cuidados apropriados no processo de eletroestimulação evita a contaminação da peçonha (Kuhn-Nentwig, Schaller e Nentwig, 1994).

As proteases (E.C. 3.4) são enzimas que catalisam a hidrólise especificamente de ligações peptídicas de proteínas e podem ser classificadas de acordo com o local de clivagem em exopeptidases e endopeptidases (López-Otín e Bond, 2008). Proteases presentes na peçonha podem causar a destruição tecidual facilitando a difusão de outras toxinas (Sannanigaiah, Subbaiah e Kempaiah, 2014). Proteases, especialmente metalo e serino proteases, estão presentes na peçonha de aranhas de espécies como, *Lycosa raptoria*, *Phoneutria nigriventer* e do gênero *Loxosceles*, sendo neste último, componentes bastantes expressivos da peçonha (Sannanigaiah, Subbaiah e Kempaiah, 2014). Contudo, em geral as espécies da família Theraphosidae, não apresentam relevante atividade proteolítica (García-Arredondo *et al.*, 2015). Com base na homologia destas enzimas com outras proteases envolvidas na ativação de proteínas

precursoras, foi sugerido que as proteases da peçonha atuem também no processamento e ativação de pró-toxinas (Sanggaard *et al.*, 2014).

As fosfolipases (E.C. 3.1.1) compreendem uma classe diversa de enzimas representadas por quatro principais grupos: A, B, C ou D, dependendo do sítio de clivagem dentro do fosfolípido. Estas enzimas atuam sobre fosfolípidios e compostos relacionados, que são os componentes fundamentais das membranas celulares, mas também atuam na regulação da sinalização de diversos eventos celulares (Vines e Bill, 2015) e processos patofisiológicos (Shridas e Webb, 2014).

Na peçonha de aranhas, diferentes fosfolipases foram descritas, tais como: fosfodiesterase (cliva ligações fosfodiéster), esfingomielinase D (degrada a esfingomielina) e fosfolipases (hidrolisam fosfolípidos) (Nentwig, 2013). Contudo, estas enzimas foram identificadas principalmente em aranhas do gênero *Loxosceles* e da família Hexathelidae. Já em aranhas da família Theraphosidae, as fosfolipases são raramente encontradas (Vassilevski, Kozlov e Grishin, 2009).

A hialuronidase (HA) (E.C. 3.2.1.35) é uma enzima bem conservada, produzida por diversos organismos, desde unicelulares até vertebrados (Kuhn-Nentwig, Stöcklin e Nentwig, 2011). A HA de aranhas apresenta massa molecular variando entre 33 and 47 kDa em sua forma monomérica (Bordon *et al.*, 2015). Esta enzima preferencialmente catalisa a hidrólise do ácido hialurônico, um polissacarídeo linear formado por unidades dissacarídicas repetidas de N acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) e β -D-ácido glucurônico (GlcUA), sendo o principal constituinte da matriz extracelular presente em tecidos conjuntivos (Bordon *et al.*, 2015). Sua ação facilita a difusão de outras toxinas presentes na peçonha, sendo por isso denominada como “fator de espalhamento” (Sannanigaiah, Subbaiah e

Kempaiyah, 2014). Esta propriedade tem sido empregada para facilitar a absorção e dispersão de drogas injetáveis, mas seu potencial nas áreas médica e biotecnológica é ainda mais amplo, sendo a hialuronidase utilizada em terapias anticancer e imunoterapia (Heinen e Veiga, 2011; Senff-Ribeiro *et al.*, 2008).

A presença da HA na peçonha de diversos animais tem sido relatada (Frost, Csóka e Stern, 1996). Entre as aranhas, a HA foi identificada primeiramente na peçonha da aranha caranguejeira *Dugesiella hentzi*, sendo considerada como o principal constituinte da peçonha (Schanbacher *et al.*, 1973). Adicionalmente, a HA foi também identificada em outras espécies, entre elas, *Hippasa partita* (Nagaraju, Devaraja e Kemparaju, 2007), *Vitaluis dubius* (Rocha-e-Silva, Sutti e Hyslop, 2009), *Brachypelma vagans* (Clement *et al.*, 2012), *Loxosceles intermedia* (Ferrer *et al.*, 2013), *Cupiennius salei* (Biner *et al.*, 2015) e diversas outras espécies de Theraphosidae (Rodríguez-Rios *et al.*, 2017).

2.6. Proteínas CRISP

Proteínas CRISP representam uma extensa família de proteínas secretoras ricas em cisteína altamente conservadas e amplamente distribuídas entre mamíferos, representada por três grupos principais, denominados CRISP-1, CRISP-2 e CRISP-3 (Krätzschar *et al.*, 1996). As principais funções biológicas relacionadas a CRISP-1 e CRISP-2 incluem ação bloqueadora de canais iônicos e envolvimento nos processos de maturação e fusão de gametas, sendo neste caso, mediado pela sequência de aminoácidos chamada assinatura 2 (Cohen *et al.*, 2011). CRISP-3 é encontrada no plasma sanguíneo e nas secreções exócrinas, sendo sua atividade biológica relacionada a imunidade inata (Udby *et al.*, 2002).

Estas proteínas também foram encontradas na forma de complexos com as proteínas α 1B-glicoproteína no plasma sanguíneo (Udby *et al.*, 2004) e PSP94 no plasma seminal (Anklesaria *et al.*, 2016; Udby *et al.*, 2005), sendo proposto que este complexo contribui para a neutralização de efeitos possivelmente danosos da CRISP-3 em sua forma livre.

Apenas recentemente, CRISPs foram identificadas também na peçonha, apresentando diferentes funções. Em serpentes, CRISPs foram descritas para várias espécies, atuando principalmente como bloqueadores de canais iônicos (Yamazaki e Morita, 2004). Em *Bothrops jararaca*, a primeira CRISP isolada desta espécie, denominada Bj-CRP, apresentou atividade sobre sistema complemento e induziu respostas inflamatórias (Lodovicho *et al.*, 2017). Por outro lado, a presença de CRISPs na peçonha de invertebrados tem sido pouco relatada. No gastrópode *Conus textile* (Milne *et al.*, 2003) e na aranha *Grammostola iheringi* (Borges *et al.*, 2016), as CRISPs identificadas mostraram atividade proteolítica, mas nas aranhas *Grammostola rosea* (M5AWW7, UniProtKB) e *Trittame loki* (Undheim *et al.*, 2013), nenhuma atividade biológica foi relatada. Estas evidências mostram que as funções biológicas relacionadas as CRISPs podem ser bastante diversas.

3. *Acanthoscurria natalensis*

O gênero *Acanthoscurria* contém aproximadamente 39 espécies descritas, amplamente distribuídas em regiões Neotropicais, principalmente na América do Sul. O gênero é caracterizado pela presença de cerdas estridulantes na face retrolateral do trocanter palpal, apenas uma apófise tibial na pata I e um nódulo

retrolateral na tíbia palpal. As fêmeas podem ser reconhecidas pelo receptáculo seminal com uma base comum e dois lobos mais ou menos evidentes (Pérez-Miles *et al.*, 1996).

A espécie *A. natalensis* (Fig. 2) tem ampla distribuição em biomas de Caatinga e Cerrado, abrangendo os estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Tocantins, Pernambuco, Paraíba, Mato Grosso, Bahia, Alagoas, Sergipe, Goiás, e Minas Gerais (Fig. 3). Os machos de *A. natalensis* lembram *Acanthoscurria paulensis* e *Acanthoscurria chacoana* em alguns aspectos, mas podem ser distinguidos pela quilha menos desenvolvida e uma projeção anterior do embolo bem marcada. As fêmeas podem ser diferenciadas de outras espécies do gênero pelo lobo do receptáculo seminal com uma base estreita e mais projetado (Lucas *et al.*, 2011). *A. natalensis* é uma espécie não agressiva e se alimenta de diversos invertebrados e pequenos vertebrados (Ferreira *et al.*, 2014).

Poucas espécies deste gênero foram estudadas quanto a presença de moléculas bioativas, sendo que na peçonha, estas estão restritas a apenas dois relatos (Mourão *et al.*, 2013; Rates *et al.*, 2013).

Na hemolinfa de *A. gomesiana* foram identificadas três importantes moléculas, denominadas Migalina, Gomesina e Acanthoscurrina. Estas moléculas apresentaram atividades biológicas relacionadas principalmente a ação antimicrobiana e antiparasitária (Lorenzini *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2007; Silva, Daffre e Bulet, 2000).

Na peçonha de *Acanthoscurria paulensis* foi encontrada a Ap1a, o primeiro peptídeo descrito para esta espécie. Ele contém 48 resíduos de aminoácidos e possui massa molecular de 5.457 Da. Este peptídeo mostrou ação sobre a junção

neuromuscular de insetos e mamíferos, sendo esta, mediada por receptores de glutamato (Mourão *et al.*, 2013).

Em uma publicação mais recente, a análise da peçonha de *A. natalensis* revelou a presença de um peptídeo, denominado μ -Theraphotoxin-An1a (μ -TRTX-An1a). Este peptídeo mostrou atividade sobre canais de sódio dependentes de voltagem de neurônios de insetos (Rates *et al.*, 2013).



Figura 2. Exemplar de *Acanthoscurria natalensis*. Imagem: arquivo pessoal.

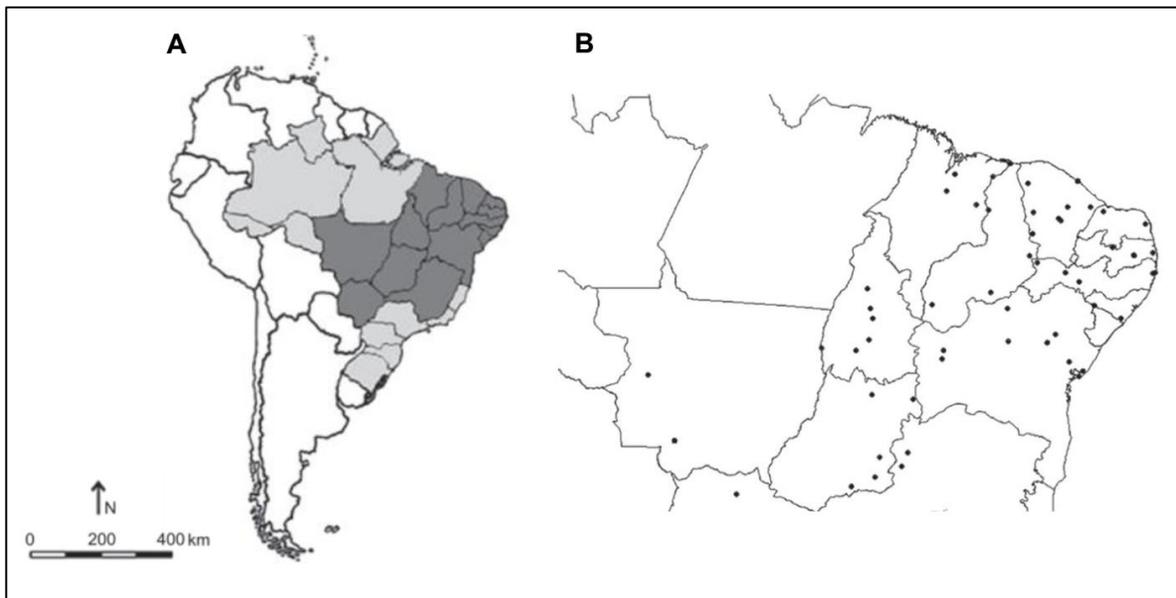


Figura 3. Distribuição da espécie *A. natalensis* no território brasileiro. (A): território brasileiro representado pela área destacada em cinza claro e escuro (em detalhate na figura B). (B): pontos representam a distribuição de *A. natalensis* nos estados da região nordeste e centro-oeste. Adaptado de Lucas *et al.*, 2011.

II. JUSTIFICATIVA

As aranhas são um grupo zoológico de ampla diversidade e representam uma importante fonte para a obtenção de compostos bioativos. Contudo, relativamente poucos compostos foram identificados e caracterizados a partir da peçonha de aranhas. Estes compostos bioativos apresentam diferentes ações biológicas, como: antimicrobiana, antitumoral e imunomodulatória e, com atividades enzimáticas, como a hialuronidase, conferindo assim um grande potencial para novas descobertas. Diversos destes compostos possuem aplicação na área médica e nas indústrias farmacêutica, alimentícia, biotecnológica, entre outras (Matavel, Estrada e Marco Almeida, 2016). Por exemplo, as espécies de aranhas *Phoneutria nigriventer* e *Lycosa erythrognatha* possuem compostos com potencial aplicação na modulação da função erétil e com ação antimicrobiana, respectivamente (Marco Almeida *et al.*, 2015). A propriedade da enzima hialuronidase, conhecida como “fator de espalhamento”, pode ser utilizada no aumento da permeabilidade tecidual para facilitar a dispersão e absorção de drogas injetáveis, na redução de edemas (Bordon *et al.*, 2015) e ainda, pode ser empregada diretamente como agente antitumoral (Heinen e Veiga, 2011).

Estudos dedicados a caracterização de compostos bioativos em *Acanthoscurria* spp. tem se restringido a investigação de peptídeos antimicrobianos e poliaminas presentes na hemolinfa de *A. gomesiana* e neurotóxicos na peçonha de *A. paulensis* e *A. natalensis*. O pouco conhecimento disponível sobre os componentes da peçonha da aranha *A. natalensis* e as evidências de seu potencial científico, torna esta espécie importante alvo de investigação, que poderá contribuir de forma relevante para descrição da

diversidade molecular e a caracterização estrutural e funcional de compostos presentes na sua peçonha, bem como, para o conhecimento científico da biodiversidade brasileira.

III. OBJETIVOS

Geral

Investigar e caracterizar química e biologicamente, compostos isolados da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria natalensis*.

Objetivos específicos

1. Fracionar os compostos presentes na peçonha bruta por cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC).
2. Identificar as frações de interesse por meio de *screening* das atividades: antimicrobiana, efeitos sobre a viabilidade celular e modulação da produção de óxido nítrico.
3. Identificar as frações de interesse por meio de *screening* das atividades enzimáticas: proteásica, fosfolipásica e hialuronidásica.
4. Caracterizar a estrutura química dos compostos de interesse por espectrometria de massa.

IV. ESTRUTURA DA TESE

A tese foi organizada em três partes, nas quais são apresentados os métodos utilizados e os resultados obtidos, bem como a respectiva discussão.

Parte I: Aborda os aspectos relacionados ao fracionamento da peçonha de *A. natalensis* e identificação de frações de interesse por meio de *screenings* de atividades biológicas.

Parte II: Contempla o tema “Acilpoliaminas: purificação, atividade antimicrobiana e hemolítica e, caracterização parcial da estrutura química”.

Parte III: Contempla o tema “Caracterização estrutural e bioquímica de uma nova Hialuronidase isolada da peçonha de *Acanthoscurria natalensis*”.

PARTE I

Fracionamento da peçonha de *A. natalensis* e *screening* de atividades biológicas

1. Material e métodos

1.1. Material biológico e obtenção da peçonha

Exemplares de *A. natalensis* (n~30) foram coletadas (nº. de licença SISBIO: 51803-1, Anexo I) na Fazenda Nossa Senhora Aparecida-GO e transportadas até o biotério do Instituto de Biologia-UnB, onde foram mantidas individualmente em caixas contendo areia e água, em uma sala reservada e sob condições naturais de foto período e ventilação. As aranhas foram alimentadas mensalmente com camundongos neonatos provenientes do biotério. Os exemplares foram identificados (Lucas *et al.*, 2011) e a espécie confirmada pelo professor Dr. Paulo César Motta, curador da Coleção de Aracnídeos da UnB. Um indivíduo de *A. natalensis* foi depositado como testemunho na referida coleção.

A extração da peçonha foi realizada apenas em fêmeas em estágio intermuda nos dias que precedem a alimentação. Cerca de 30 µL de peçonha por animal foram coletados em microtubos por meio de eletroestimulação, posicionando-se os eletrodos lateralmente na base das quelíceras e aplicando-se um estímulo de 75 V por 3 s, sob baixa corrente e pulsado, de 1 a 2 vezes por animal (Rocha-e-Silva, Sutti e Hyslop, 2009). As amostras foram levadas ao Laboratório de Toxinologia-UnB e congeladas individualmente para liofilização (Speed-Vac, Thermo Scientific) e conservação a -20°C até o uso. A quantidade

total de peçonha foi obtida pela pesagem de microtubos, antes e após sua utilização para a coleta e liofilização das amostras (peso seco).

1.2. SDS-PAGE

A separação dos componentes proteicos presentes na peçonha foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições redutoras (Laemmli, 1970). A amostra de peçonha (8 µg) foi preparada em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, glicerol, SDS 10% e azul de bromofenol 0,5%) e aplicada no gel de poliacrilamida 12% separador, preparado em tampão Tris pH 8,8 na presença de SDS. Após a eletroforese em sistema mini-gel a 4°C, sob voltagem de 180 V e corrente de 40 mA, o gel foi colorado com nitrato de prata (Nesterenko, Tilley e Upton, 1994). Proteínas com massa molecular entre 97 e 14,4 kDa foram utilizadas como marcador molecular (fosforilase b: 97 kDa, albumina: 66 kDa, ovoalbumina: 45 kDa, anidrase carbônica: 30 kDa, inibidor de tripsina: 20 kDa e α -lactalbumina: 14,4 kDa) (Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis, GE Healthcare, U.K.).

1.3. Fracionamento da peçonha por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC)

O fracionamento da peçonha foi obtido por RP-HPLC, sob sistema de gradiente de solventes. As amostras liofilizadas (20 mg/mL) foram solubilizadas no solvente A (0,12% ácido trifluoracético (TFA) (v/v) em água Milli-Q) e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. Alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram

aplicadas em coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac 218TP54, 250 mm x 4,5 mm, 5 µm), previamente equilibrada com o mesmo solvente, sob fluxo de 1 mL/min. As frações cromatográficas foram eluídas sob gradiente linear de 0 a 60% do solvente B (0,12% de TFA v/v em acetonitrila (ACN)) em 60 min. e detectadas simultaneamente em 216 e 280 nm. As frações coletadas manualmente em microtubos foram liofilizadas em Speed-Vac (Thermo Scientific) e mantidas a -20°C até o uso. A quantificação das frações cromatográficas foi obtida como descrito acima, no item 1.1.

1.4. Screening de atividades biológicas da peçonha

1.4.1. Ensaio antimicrobiano

A avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de amostras da peçonha total e frações cromatográficas foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando-se as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e, Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e o fungo *Candida albicans* ATCC 10231, cultivadas em meio Mueller-Hinton (MH) (bactérias) ou Brain Heart Infusion (BHI) (fungo), sob leve agitação a 37°C. Após 24 h e a densidade óptica atingir o valor de 1 a 595 nm, alíquotas de 50 µL de cada cultura, diluídas na proporção de 1:100 (bactérias Gram-positivas e fungo) e 1:50 (bactérias Gram-negativas) foram incubadas por 24 h a 37°C com 50 µL da amostra de peçonha (10 mg/mL) ou fração cromatográfica (equivalente a uma corrida), diluídas em água Milli-Q estéril. Para o controle positivo (crescimento pleno) e negativo (ausência de crescimento), os microorganismos foram incubados com meio de

cultura e água Milli-Q e, formaldeído 0,4% (v/v), respectivamente. A leitura da densidade óptica a 595 nm foi realizada em leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific) e o valor do branco (meio de cultura e Milli-Q), subtraído de todas as amostras. O crescimento do microorganismo foi determinado como um percentual do controle positivo, definido como 100%, obtido em dois ensaios independentes em duplicata.

1.4.2. Ensaio de viabilidade celular de células tumorais e não tumorais

A influência da peçonha total e da fração cromatográfica FR5 na viabilidade celular de células tumorais e não tumorais foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), que é baseado na capacidade das células viáveis reduzirem o substrato MTT em um produto de coloração azulada, o formazan (Mosmann, 1983).

As linhagens celulares tumorais Hela (colo de útero humano), MCF-7 (mama humano) e não tumoral NIH/3T3 (fibroblasto de camundongo) foram cedidas pelo Prof. Ricardo Bentes do Laboratório de Nanobiotecnologia-UnB, no qual os experimentos foram realizados. As células provenientes do estoque em nitrogênio líquido foram semeadas em garrafas de poliestireno (25 cm²) contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina e penicilina e incubadas por 24h, a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado após as 24h e posteriormente a cada 48h. Ao atingirem confluência de aproximadamente 80%, as células foram removidas pela adição de 2 mL de tripsina por 2 min, sendo após inativada pela adição de igual volume de meio suplementado. As células foram centrifugadas (5 min., 2000 rpm),

ressuspensas em 1 mL de meio e recultivadas para expansão das células. Ao atingirem confluência de aproximadamente 80%, as células foram removidas com tripsina, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de meio.

As células foram contadas em câmara de Neubauer (utilizando-se 10 µL da diluição obtida pela mistura de 10 µL da suspensão celular com 40 µL de azul tripan) e a concentração celular foi ajustada para 5×10^3 células por poço. As células foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h, nas condições já citadas. Após a remoção do meio de cultura, as células foram tratadas com 200 µL da amostra de peçonha (10 mg/mL) ou fração cromatográfica (equivalente a uma corrida) diluídas em meio suplementado e incubadas por 24h. Células incubadas apenas com meio de cultura suplementado foram utilizadas como controle positivo. Após a incubação e remoção do meio de cultura, 150 µL de uma solução de MTT (15 µL de MTT 5mg/mL diluídos em 135 µL de meio suplementado) foram adicionados a cada poço. Após 4 horas de incubação, o MTT foi removido e os cristais de formazam solubilizados com 100 µL de DMSO 10%. Um branco foi estabelecido somente com DMSO. A absorvância foi lida a 595 nm e a viabilidade celular foi expressa como um percentual do controle positivo, definido como 100% de viabilidade celular, obtida em dois ensaios independentes em duplicata.

1.4.3. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

O efeito da peçonha total e da fração cromatográfica FR5 sobre a produção de óxido nítrico de macrófagos J744, foi avaliada pela reação colorimétrica de Griess (Hibbs *et al.*, 1988). O NO gerado em diferentes processos fisiológicos,

como nas respostas inflamatórias, é rapidamente oxidado a nitrito e nitrato. Assim, sob condições *in vitro*, o NO presente no sobrenadante celular pode ser determinado indiretamente pela quantificação do nitrito (NO_2^-) pela reação de Griess. O reagente de Griess converte o nitrito a um produto azo de coloração violeta, que pode ser detectado espectrofotometricamente e que reflete a quantidade de óxido nítrico produzido.

Cultura celular de macrófagos

A cultura de macrófagos da linhagem J774 ATCC-CCL TIB-67™ ocorreu de modo semelhante ao descrito no item 1.4.2., em relação a manutenção, expansão e contagem celular. Porém, o meio de cultura utilizado para os macrófagos foi o RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina e a concentração de macrófagos por poço (placas de 96 poços) foi de 1×10^5 células. Após a adição das células aos poços, as placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 2h para a aderência celular. Após este período, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 por 24h com lipopolissacarídeo-LPS (utilizado como ativador de produção de NO) a 50 ng/mL em meio suplementado, na presença ou ausência da peçonha total e FR5 nas concentrações de 50, 125 e/ou 250 $\mu\text{g/mL}$ em meio suplementado. O controle de produção de NO foi obtido pela incubação das células somente com LPS. Células cultivadas apenas com meio RPMI representaram o controle de viabilidade celular e ausência de produção de NO.

Teste de viabilidade celular de macrófagos

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTT, como descrito no item 1.4.2. Após a incubação dos macrófagos com LPS e/ou as amostras por 24 h, o sobrenadante celular de cada poço foi transferido para outra placa (para a quantificação de nitrito, descrito a seguir) e as células aderidas foram submetidas ao ensaio do MTT. Os resultados de viabilidade celular obtidos em dois experimentos em triplicata foram expressos como um percentual do controle positivo (células em meio RPMI) definido como 100% de viabilidade celular.

Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos

A produção de NO pelas células expostas ou não ao ativador (LPS) e a peçonha total e FR5 foi detectada pela adição de 100 μ L do reagente de Griess (solução de sulfanilamida 1% e hidrocloreto naftiletileno diamina-NEED 0,1%, ambos em 2,5% de H_3PO_4) preparado no momento do uso, aos poços contendo 100 μ L dos sobrenadantes celulares. Após 10 min., a absorvância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (0 a 200 μ M). Os resultados apresentados foram obtidos em um experimento realizado em triplicata.

1.4.4. Atividade proteolítica

A presença de atividade proteolítica na peçonha total foi avaliada espectrofotometricamente (Christen e Marshall, 1984), pela detecção do grupamento azo liberado pela hidrólise do substrato cromogênico azocaseína. O ensaio foi realizado pela adição de 300 µL da solução de azocaseína (1 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 6,0 ou pH 8,0) em microtubos e em seguida, 20 µL das amostras e controles. As amostras da peçonha de *A. natalensis* foram testadas nas concentrações de 2 e 4 mg/mL. Para o controle positivo, o substrato foi incubado com 20 µL da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* (5 mg/mL). Poços contendo apenas tampão ou azocaseína, foram utilizados como controles de 0% e 100% de substrato, respectivamente. A mistura foi incubada por 1,5 h a 37°C e a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de TCA (ácido tricloroacético) 0,5M. Os tubos foram então centrifugados a 10.000 rpm por 5 min. e 200 µL do sobrenadante, transferidos para uma placa de 96 poços para leitura da absorvância a 342 nm em espectrofotômetro. A atividade proteolítica foi expressa como a porcentagem de substrato hidrolisado em relação ao controle de 100%, em dois ensaios em triplicata.

1.4.5. Atividade de fosfolipase

A presença de atividade fosfolipásica na peçonha total foi avaliada espectrofotometricamente pela diminuição da turbidez provocada pela ação da enzima sobre uma suspensão de gema de ovo utilizada como substrato (Marinetti, 1965). O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, pela adição de 180 µL da suspensão de gema de ovo a 2% (m/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 a cada

poço para a primeira leitura (tempo 0) da absorvância a 405 nm. Em seguida, alíquotas de 20 µL das amostras e controles foram adicionadas aos poços. Após 5 min., uma nova leitura de absorvância foi realizada. As amostras da peçonha de *A. natalensis* foram testadas nas concentrações de 2 e 4 mg/mL. Para o controle positivo, o substrato foi incubado com 20 µL da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* (5 mg/mL). Poços contendo apenas tampão ou emulsão de gema de ovo, foram utilizados como controles de 0% e 100% de substrato, respectivamente. Para verificar o efeito do cálcio na atividade fosfolipásica, as amostras foram incubadas com 10 µL de CaCl 10mM. A atividade fosfolipásica foi expressa como porcentagem de substrato hidrolisado em relação ao controle de 100%, em dois ensaios em triplicata.

1.4.6. Atividade hialuronidásica

A presença de atividade hialuronidásica na peçonha total e frações cromatográficas agrupadas como: fração 1-3, 4, 5, 6-7, 8-12, 13-17 e 18, foi avaliada por turbidimetria de acordo com (Di-Ferrante, 1956), com algumas modificações. A mistura de reação foi preparada em placa de 96 poços utilizando 57 µL de tampão de acetato de sódio 200 mM, pH 5,8 contendo 150 mM de NaCl, 12 µL de ácido hialurônico (0,5 mg/mL) e 5 µL de amostra (contendo 50 µg de peçonha ou 5 µg das frações cromatográficas). Como controle positivo, 5 µg de hialuronidase testicular bovina (400-1000 U/mg, Sigma Aldrich) foi utilizada. Poços contendo apenas tampão ou ácido hialurônico, foram utilizados como controles de 0% e 100% de substrato, respectivamente. A placa foi incubada durante 15 min a 37 °C e a reação enzimática interrompida pela adição de 125 µL de brometo de

cetiltrimetilamônio (CTAB) 2,5% (m/v) em NaOH 2% (m/v). Após 10 min, a absorvância foi medida a 405 nm contra um branco contendo tampão e CTAB. A quantidade de ácido hialurônico hidrolisado foi obtida pela diferença nas absorvâncias entre o controle de 100% e a amostra. A atividade enzimática foi expressa como porcentagem de substrato hidrolisado em relação ao controle de 100%, em dois ensaios em triplicata.

1.5. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA bi-fatorial foi utilizada para as análises estatísticas (dados dos ensaios de MTT e NO), e a diferença estatística foi identificada pelo teste de Bonferroni, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc, EUA). O nível de significância foi estabelecido como $P < 0,05$.

2. Resultados

2.1. Perfil eletroforético da peçonha

O perfil eletroforético da peçonha obtido por SDS-PAGE e coloração por nitrato de prata, revelou a presença de um pequeno número de componentes de natureza proteica (Fig. 2). O principal componente foi identificado na faixa de 45 kDa, sugerindo corresponder a enzima hialuronidase, de modo semelhante ao descrito na literatura para outras hialuronidases (Bordon, *et al.*, 2015).

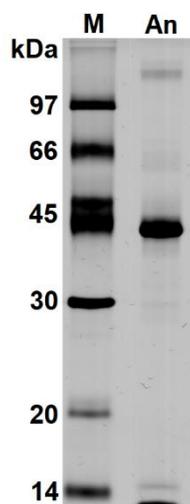


Figura 1. Perfil eletroforético da peçonha (8 µg) de *A. natalensis* (An) em SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata. M: marcador molecular (kDa), fosforilase b (97), albumina (66), ovoalbumina (45), anidrase carbônica (30), inibidor de tripsina (20) e α -lactalbumina (14,4).

2.2. Fracionamento da peçonha por cromatografia de fase reversa

A peçonha total foi fracionada por RP-HPLC em coluna C₁₈ e com sistema de gradiente de solventes (Fig.1), permitindo a identificação de 18 frações principais, eluídas predominantemente com até aproximadamente 30% de ACN, indicando o caráter mais hidrofílico dos seus componentes. Nesta região, a fração 5 (FR5) foi a mais abundante, eluindo entre 15 e 25% de ACN. A baixa resolução deste pico indicou a presença de uma grande quantidade de componentes coeluídos e de natureza química bastante semelhantes, sugerindo corresponder às acilpoliaminas. Já na região mais hidrofóbica (em torno de 50% de acetonitrila), o principal componente eluído foi a fração 18 (FR18).

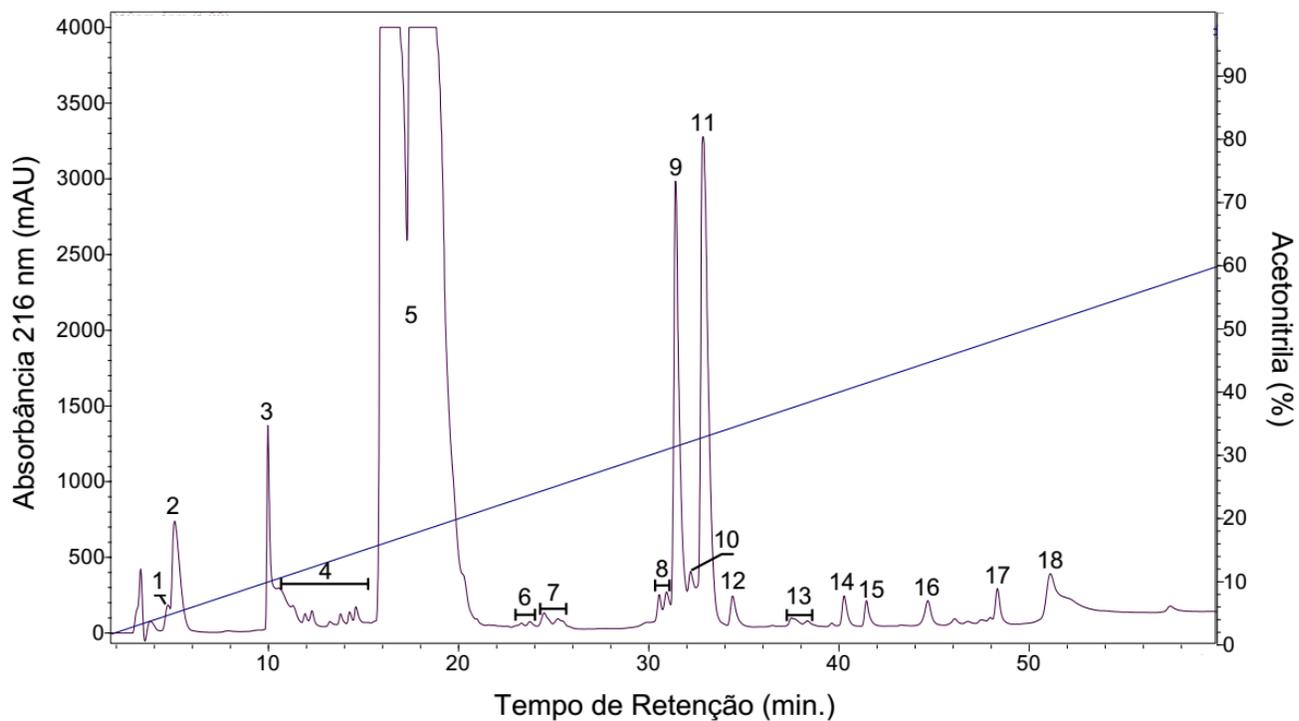


Figura 2. Perfil cromatográfico representativo da peçonha total (4mg) de *A. natalensis* fracionada por RP-HPLC em coluna C18, sob gradiente linear de 0 a 60% do solvente B em 60 min, sob fluxo de 1,0 mL/min. Solvente A: 0,12% de TFA em água Milli-Q. Solvente B: 0,12% de TFA em ACN.

2.3. Screening de atividades biológicas da peçonha

2.3.1. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da peçonha total e das 18 frações cromatográficas foi avaliada contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e uma linhagem de fungo, pelo método de diluição em meio líquido. As amostras que apresentaram atividade antimicrobiana são apresentadas na tabela 1. A peçonha total não se mostrou muito efetiva, com porcentagens de inibição de crescimento inferiores a 50% contra todos os microorganismos. A fração FR5 apresentou expressiva atividade, com inibição acima de 80% contra 4 dos 5 microorganismos testados. A atividade antimicrobiana das demais frações foi mais moderada, inibindo o crescimento microbiano predominantemente entre 50 e 80%.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana da peçonha total (PT) de *A. natalensis* e frações cromatográficas (FR).

Amostra	Microorganismos					
	Fungo	Gram-positivo			Gram-negativo	
	CA	SA	KP	EC	EF	
PT	+	+	+	+	+	
FR2	++	++	+	++	++	
FR5	+++	+++	++	+++	+++	
FR6	++	++	++	++	++	
FR7	+	++	+++	+++	+++	

CA: *Candida albicans*, SA: *Staphylococcus aureus*, KP: *Klebsiella pneumoniae*, EC: *Escherichia coli* e EF: *Enterococcus faecalis*

(+++) inibição de crescimento bacteriano \geq que 80%

(++) inibição de crescimento bacteriano entre 50 e 80%

(+) inibição de crescimento bacteriano < que 50%.

Negrito: fração que apresentou atividade antimicrobiana mais expressiva

2.3.2. Efeito sobre a viabilidade celular de células tumorais e não tumorais

Os resultados obtidos pelo ensaio do MTT, mostraram que a peçonha total e FR5 não reduziram significativamente a viabilidade celular das linhagens celulares testadas, quando comparado com o controle de viabilidade celular (CT). A FR5 mostrou ainda, um possível aumento da viabilidade celular das células MCF7 e NIH3T3, embora não estatisticamente significativo devido ao elevado desvio padrão (Fig. 3).

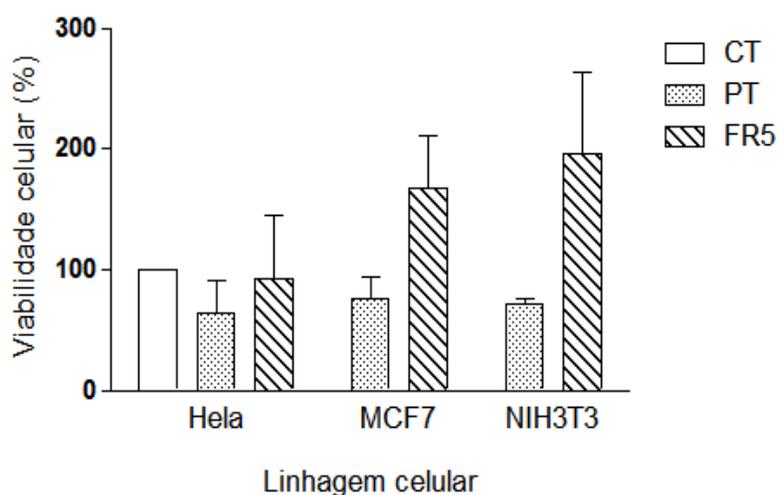


Figura 3. Efeito da peçonha total (PT) e fração cromatográfica FR5 sobre a viabilidade celular de células tumorais (Hela e MCF7) e não tumorais (NIH3T3) após 24 h de incubação, avaliado pelo ensaio do MTT. Hela: colo uterino humano. MCF7: mama humano. NIH3T3: fibroblasto de camundongo. CT: controle (100% de viabilidade celular). Dados foram expressos como média \pm

2.3.3. Produção de óxido nítrico (NO)

Efeito da peçonha total e fração 5 sobre a viabilidade celular e produção de NO de macrófagos

Considerando que a peçonha de aranhas e moléculas como poliaminas, podem interferir na viabilidade celular ou modular respostas imunológicas ou inflamatórias, o efeito da peçonha total e fração 5 de *A. natalensis* sobre a viabilidade celular e produção de NO de macrófagos foi avaliado pelo método do MTT e de Griess, respectivamente.

Como resultado, os macrófagos expostos a diferentes concentrações da peçonha total e fração 5 (50, 125 e/ou 250 µg/mL) não promoveram alterações na viabilidade celular quando comparadas ao controle (células em RPMI) (Fig. 4A). A produção de NO de macrófagos incubados por 24 h com as amostras testes não foi alterada quando comparado as células não estimuladas (células em RPMI) (Fig. 4B), diferentemente do que foi observado nas células incubadas com LPS. Estes resultados demonstram que as amostras não interferem na viabilidade celular e não estimulam a produção de NO de macrófagos nas condições testadas.

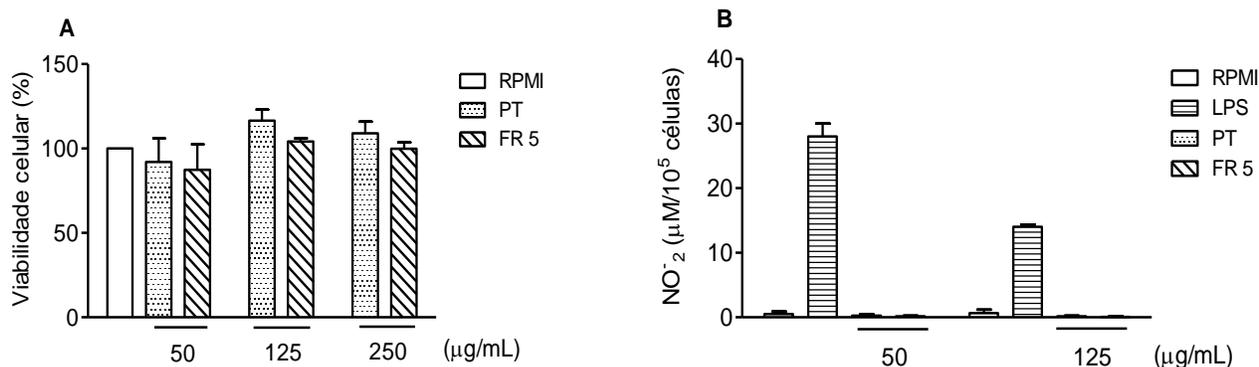


Figura 4. Efeito da peçonha total (PT) e fração cromatográfica FR5 sobre macrófagos J774, em diferentes concentrações (µg/mL). **(A)**: Viabilidade celular (ensaio do MTT). RPMI: controle de 100% de viabilidade celular. **(B)**: Produção de NO (método de Griess). RPMI: controle de ausência de produção de NO. LPS: controle de produção de NO. Dados foram expressos como média ± DP.

Efeito da peçonha total e fração 5 sobre a viabilidade celular e produção de NO de macrófagos estimulados com LPS

Como observado na figura 4B, a peçonha total e fração 5 não induziram a produção de NO. Assim, para investigar o possível efeito supressor da produção de NO, macrófagos estimulados com LPS foram expostos a diferentes concentrações das amostras (50, 125 e/ou 250 µg/mL). Os resultados mostraram que a presença de 50 e 125 µg/mL da peçonha total e fração 5 significativamente reduziu a produção de NO das células estimuladas com LPS (Fig. 5A). O maior efeito foi obtido com 125 µg/mL, que representa uma redução na produção de NO em aproximadamente 64% quando comparado com o respectivo controle (células estimuladas com LPS). A redução na produção de NO observada não foi considerada uma consequência de alterações na viabilidade celular das células estimuladas com LPS, uma vez que esta não diferiu estatisticamente do controle

de viabilidade celular (células em RPMI) em nenhuma das concentrações testadas (Fig. 5B).

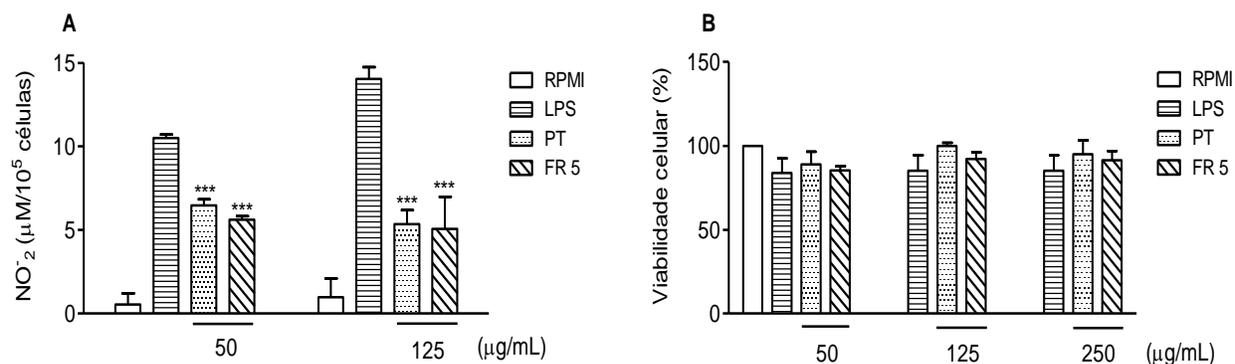


Figura 5. Efeito da peçonha total (PT) e fração cromatográfica FR5 sobre macrófagos J774 estimulados com LPS (50 ng/mL), em diferentes concentrações (µg/mL). **(A)**: Produção de NO (método de Griess). RPMI: controle de ausência de produção de NO. LPS: controle de produção de NO **(B)**: Viabilidade celular (ensaio do MTT). RPMI: controle de 100% de viabilidade celular. Dados foram expressos como média ± DP.

2.3.4. Atividade proteolítica

A presença de atividade proteolítica na peçonha foi avaliada sobre o substrato azocaseína. Nenhuma atividade proteolítica foi identificada nas diferentes concentrações (2 e 4 mg/mL) e pH testados, diferentemente do controle positivo representado pela peçonha de *B. moojeni* (Fig. 6).

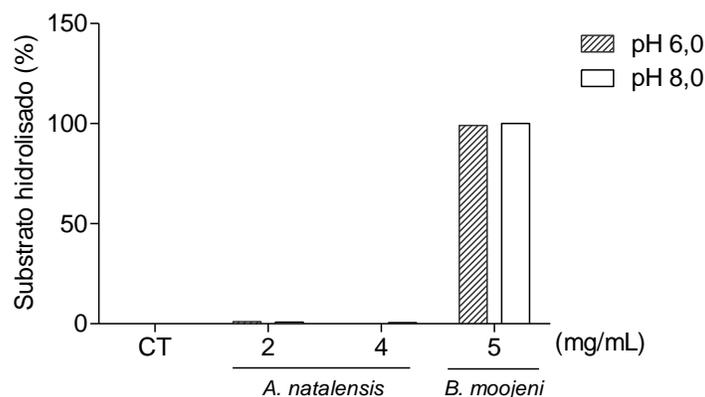


Figura 6. Atividade proteolítica da peçonha de *A. natalensis* usando o substrato azocaseína, sob diferentes concentrações e pH. CT: controle sem adição de enzima (100% de substrato). *B. moojeni*: controle positivo. Dados foram expressos como média \pm DP.

2.3.5. Atividade fosfolipásica

A presença de atividade fosfolipásica na peçonha foi avaliada sobre uma emulsão de gema de ovo como substrato. Nenhuma atividade fosfolipásica foi identificada nas diferentes concentrações (2 e 4 mg/mL) testadas, mesmo na presença de cálcio, diferentemente do controle positivo representado pela peçonha de *B. moojeni* (Fig. 7).

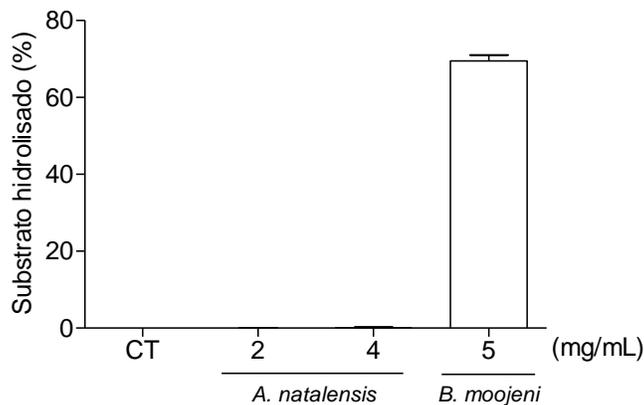


Figura 7. Atividade fosfolipásica da peçonha de *A. natalensis* usando emulsão de gema de ovo como substrato, sob diferentes concentrações. CT: controle sem adição de enzima. *B. moojeni*: controle positivo. Dados foram expressos como média \pm DP.

2.3.6. Atividade hialuronidásica

A atividade hialuronidásica da peçonha e frações cromatográficas foi avaliada turbidimetricamente (Fig. 8). Apenas a peçonha total e fração 18 mostraram atividade hialuronidásica, hidrolisando aproximadamente 100% do substrato, de modo semelhante ao controle positivo, representado pela hialuronidase testicular bovina (Bv).

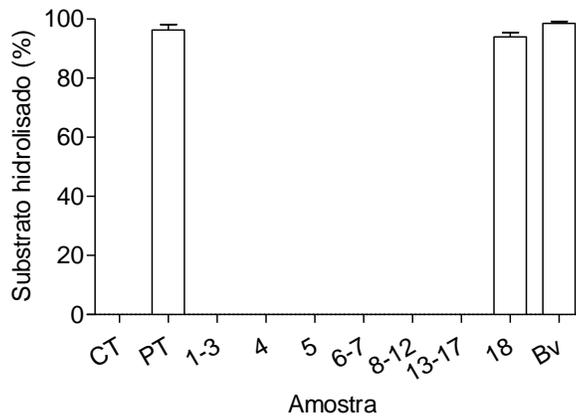


Figura 8. Atividade hialuronidásica da peçonha total (PT) e frações cromatográficas (1-3, 4, 5, 6-7, 8-12, 13-17 e 18) de *A. natalensis* sobre o substrato ácido hialurônico. CT: controle sem adição de enzima. Bv: hialuronidase testicular bovina, usada como controle positivo. Dados foram expressos como média \pm DP.

3. Discussão

Fracionamento da peçonha e perfil eletroforético

A separação de moléculas por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) se baseia na relação de hidrofobicidade entre as moléculas a serem purificadas e a matriz cromatográfica. O fracionamento da peçonha de *A. natalensis* foi realizado por RP-HPLC em coluna C₁₈, sob gradiente linear de acetonitrila, obtendo-se 18 frações principais eluídas predominantemente na região mais hidrofílica do cromatograma. Nesta região, o principal componente encontrado foi a fração 5 (FR5).

Conhecidamente, em RP-HPLC, a região mais hidrofílica do cromatograma caracteriza-se pela eluição preferencial de compostos de baixa massa molecular, tais como, aminas biogênicas e acilpoliaminas (Skinner *et al.*, 1989). Estas últimas constituem uma família de moléculas estruturalmente muito semelhantes e de

difícil separação (Estrada, Villegas e Corzo, 2007). A análise conjunta destes aspectos indicou que a FR5 corresponde ao grupo de acilpoliaminas. Além disto, a eluição desta fração por aproximadamente 4 minutos, mostra que há uma quantidade ainda maior de compostos presentes na peçonha. Entre as aranhas, esta é uma característica que tem sido frequentemente relatada (Palma, 2012).

Já na região mais hidrofóbica do cromatograma, foi observada a eluição de um componente principal, a fração 18 (FR18). Nesta região hidrofóbica, também é conhecido que compostos com massa molecular mais elevada são caracteristicamente eluídos (Skinner *et al.*, 1989), sendo estes em geral, de natureza peptídica. O perfil eletroforético da peçonha mostrou a presença de poucos componentes proteicos na peçonha, sendo a banda na faixa de 45 kDa, a mais expressiva. A presença de componentes proteicos com massa molecular entre 5 e 15 kDa (Estrada-Gomez, Muñoz e Quintana, 2013) e em torno de 40 kDa (Rocha-e-Silva, Sutti e Hyslop, 2009), foi demonstrada na peçonha de aranhas Theraphosidae. Os componentes com massas moleculares mais elevadas (~40 kDa), podem corresponder a enzimas (Gentz *et al.*, 2009) e dentre estas, a hialuronidase tem sido descrita para diversas espécies de aranhas (Rash e Hodgson, 2002) (Vassilevski, Kozlov e Grishin, 2009). Assim, a análise conjunta do perfil cromatográfico e eletroforético e, do ensaio de atividade enzimática de *A. natalensis*, confirmaram que a FR18 contém a enzima hialuronidase (HA).

Screening de atividades biológicas

As atividades biológicas da peçonha de *A. natalensis* avaliadas incluíram: ação antimicrobiana, efeito sobre a viabilidade celular e produção do óxido nítrico (NO).

A atividade antimicrobiana de compostos da peçonha de diversos animais, comumente é atribuída a moléculas de natureza peptídica (Saez *et al.*, 2010). Contudo, na peçonha de *A. natalensis* a atividade antimicrobiana mais pronunciada foi identificada na fração 5 (FR5), constituída por acilpoliaminas. Desta forma, a FR5 foi selecionada para a continuidade do estudo, visando caracterizar suas atividades biológicas e estrutura química (apresentados na Parte II, sobre acilpoliaminas).

Embora a peçonha de diversos animais, como serpentes, abelhas e escorpiões, tem demonstrado efeitos citotóxicos contra células tumorais, entre as aranhas (Heinen e Veiga, 2011), estes efeitos têm sido pouco relatados para membros da família Theraphosidae. Contudo, recentemente a atividade citotóxica de moléculas da peçonha de 24 espécies desta família foi avaliada. Destas, 11 espécies (incluindo uma espécie do gênero *Acanthoscurria*, *Acanthoscurria geniculata*) demonstraram atividade citotóxica contra células MCF7. Esta atividade foi relacionada a duas acilpoliaminas identificadas na peçonha, denominadas PA₃₈₉ e PA₃₆₆. A análise da estrutura química destas moléculas mostrou a presença de um grupo aromático indole na PA₃₈₉, enquanto na PA₃₆₆, a presença de um grupo hidroxifenil, confere a esta uma atividade mais acentuada (Wilson *et al.*, 2017).

A peçonha e a fração acilpoliamina de *A. natalensis* não reduziram a viabilidade celular das células tumorais e não tumoral testadas, mas um possível aumento da viabilidade celular das células MCF7 e NIH3T3 foi observado na fração FR5. Certamente estudo adicionais são necessários para verificar esta possibilidade, sobretudo em relação ao fibroblasto de camundongo (NIH3T3), pois poderia abrir uma linha interessante de investigação, voltada para os processos de cicatrização de feridas, já que estes envolvem diferentes eventos fisiológicos, como a proliferação celular. Neste contexto, alguns animais têm sido explorados para identificar compostos com propriedades cicatrizantes. Em *Lonomia obliqua*, a proteína Losac e rLosac (recombinante) mostrou diversas atividades, como citoproteção, proliferação celular e estimulação da produção de proteínas da matriz extracelular e, *in vivo*, rLosac promoveu aumento a proliferação epidermal e induziu a contração da ferida (Sato *et al.*, 2016). O peptídeo antimicrobiano Pardaxin (GE33), isolado do peixe *Pardachirus marmoratus*, em adição a sua atividade antimicrobiana, promoveu rápida reepitelização de feridas infectadas com *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) e não apresentou efeitos imunotóxicos (Huang *et al.*, 2014). Compostos com propriedades cicatrizantes, também foram identificados na peçonha de alguns animais, como em abelhas e serpentes. A Melitina isolada de *Apis mellifera*, mostrou atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* em concentração micromolar (CIM: 12.5 µg/mL) e acelerou a contração da ferida e reepitelização decorrente da proliferação celular (Alia, Laila e Al-DaoudeAntonious, 2013). Isolado da peçonha de *Crotalus adamanteus*, o composto CaTx-II (7.8 mg/mL) mostrou expressiva ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. CaTx-II não foi citotóxico

contra células de pulmão (MRC-5) e fibroblastos (HEPK), aumentou a produção de citocinas envolvidas na cicatrização e migração celular em camundongos, resultando cicatrização completa da ferida (Samy *et al.*, 2014).

A peçonha de aranhas contém diversas moléculas bioativas, com propriedades já bastante conhecidas, como neurotoxicidade, ação antimicrobiana e enzimática (Kuhn-Nentwig, Stöcklin e Nentwig, 2011). Contudo, o efeito dos componentes da peçonha de aranhas sobre respostas imunológicas tem sido pouco explorado. Embora extremamente complexas, as respostas imunológicas são primariamente mediadas por macrófagos, que rapidamente produzem mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico, em resposta a diferentes antígenos, sejam eles de natureza química ou biológica (Fujiwara e Kobayashi, 2005).

A avaliação do efeito da peçonha total e fração 5 de *A. natalensis* sobre macrófagos não estimulados, mostrou que as amostras em concentrações de até 250 µg/mL não reduziram a viabilidade celular e não induziram a produção de NO. De modo semelhante, a peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* não afetou a viabilidade celular de células mononucleares de sangue periférico nas mesmas concentrações (Casella-Martins *et al.*, 2015). Por outro lado, a peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus* causou a lise de macrófagos em baixas concentrações (25 µg/mL) e induziu a produção de NO (Cruz, Mendonça e Petricevich, 2005). Já a Migalina, uma acilpoliamina isolada da peçonha de *Acanthoscurria gomesiana*, também não afetou a viabilidade celular de esplenócitos e macrófagos sob concentrações entre 5 e 40 µg/mL, mas induziu a produção de NO (Mafrá *et al.*, 2012).

O óxido nítrico é uma molécula produzida endogenamente, atuando como importante sinalizador em diversos processos fisiológicos, como vasodilatação, neurotransmissão e respostas imunológicas (Moncada e Higgs, 1991). No caso de respostas inflamatórias, o NO é um dos mais importantes mediadores e o seu efeito pró ou anti-inflamatório parece depender das concentrações em que é produzido. O NO produzido em baixas quantidades atua como anti-inflamatório, enquanto altas concentrações, como aquelas produzidas em resposta a bactérias, são pró-inflamatórias (Grisham, Jourd'Heuil e Wink, 1999). A produção de NO excessiva ou desregulada pode contribuir para o estabelecimento de condições patofisiológicas, como respostas inflamatórias severas, sepse e câncer (Choudhari *et al.*, 2013). Assim, a busca por novos compostos com habilidade de modular a produção de NO podem representar alternativas terapêuticas para o controle de doenças inflamatórias, autoimunes, entre outras (Barreto, Correia e Muscará, 2005; Saez *et al.*, 2010).

Efeitos imunomoduladores da peçonha de aranhas, tem sido pouco relatado na literatura e a maior parte destes, abordam as respostas pró-inflamatórias causadas pela injeção da peçonha de espécies dos gêneros *Loxosceles* e *Phoneutria* em animais experimentais (Farsky, Antunes e Mello, 2005; Nunes *et al.*, 2008). Alguns estudos *in vitro*, foram realizados com a peçonha de *Loxosceles gaúcho* e *Loxosceles deserta* sobre queratinócitos, sendo demonstrada a indução de TNF- α (Malaque *et al.*, 1999) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Desai, Lankford e Warren, 2000), respectivamente. Em relação ao efeito imunomodulador de moléculas isoladas da peçonha, a Migalina, acima mencionada, promoveu a modulação positiva de macrófagos e esplenócitos,

umentando a produção de algumas citocinas e de NO (Mafra *et al.*, 2012). A peçonha de outros animais como escorpiões e serpentes, também possuem propriedades imunomoduladoras, representadas principalmente por efeitos imunoestimulantes e pró-inflamatórios (Farsky, Antunes e Mello, 2005; Petricevich, 2010).

No presente estudo, a peçonha total e fração 5 foram também avaliadas quanto a capacidade em modular negativamente a produção de NO de macrófagos estimulados com LPS. Os resultados mostraram que ambas as amostras reduziram significativamente a produção de NO induzida por LPS, em concentrações de 50 e 125 µg/mL.

O estudo realizado com peptídeo Cupienina 1a, isolado da peçonha da aranha *Cupiennius salei*, inibiu a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e assim, a produção de NO, em concentrações de IC50 de 1.3 µM (5.1 µg/mL). Neste estudo, a inibição de nNOS foi medida pela conversão da [³H] arginine em [³H] citrulline (Pukala *et al.*, 2007).

Outros estudos relacionados a efeitos imunossupressores em peçonha de aranhas não foram encontrados na literatura. Contudo, estes efeitos têm sido identificados na peçonha de animais, como abelhas, vespas, formigas e serpentes (Rajendra, Armugam e Jeyaseelan, 2004). O efeito imunomodulador da peçonha de abelha e seu principal componente, a Melitina (ambos em concentrações de 1 e 2 µg/mL), foi avaliado sobre células microgliais, resultando na inibição da produção citocinas e de NO induzido por LPS (Moon *et al.*, 2007). A peçonha da vespa *Nasonia vitripennis*, modulou a atividade de macrófagos estimulados com LPS, inibindo a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 e do fator de transcrição

NF- κ B, que regula genes relacionados a reações inflamatórias (Danneels *et al.*, 2014). Atividades anti-inflamatórias também foram identificadas em compostos isolados de organismos marinhos (Abad, Bedoya e Bermejo, 2008; Malve, 2016), a exemplo do coral *Sinularia* spp., que inibiu a produção de TNF- α e NO por macrófagos estimulados com LPS (Takaki *et al.*, 2003). A astaxantina, um carotenoide isolado do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, também reduziu a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS. A concentração que apresentou este resultado foi de 43,5 μ g/mL (Santos *et al.*, 2012), estando próxima a menor concentração (50 μ g/mL) de peçonha total e fração 5 utilizadas no presente trabalho.

A caracterização enzimática da peçonha de *A. natalensis*, envolveu três grupos de enzimas conhecidos em aranhas: proteases, fosfolipases e hialuronidases.

Com relação à presença de enzimas de natureza proteolítica e fosfolipásica, nenhuma atividade foi detectada na peçonha de *A. natalensis*, de modo semelhante a outros Theraphosidae (Kuhn-Nentwig, Stöcklin e Nentwig, 2011) como, *Poecilotheria regalis*, *Ceratogyrus darlingi*, *Brachypelma epicureanum* (García-Arredondo *et al.*, 2015) e *Vitalius dubius* (Rocha-e-Silva, Sutti e Hyslop, 2009). Por outro lado, algumas aranhas do gênero *Loxocles* (Sannanigaiah, Subbaiah e Kempaiah, 2014) e *Hippasa* (Nagaraju *et al.*, 2006) contém ambas as enzimas em sua peçonha, enquanto outras apresentam apenas atividade fosfolipásica ou proteásica, como em *Pamphobeteus aff. nigricolor* (Estrada-Gomez, Muñoz e Quintana, 2013) e algumas espécies de *Phoneutria* (Richardson *et al.*, 2006), respectivamente.

A hialuronidase é uma enzima comumente presente na peçonha de diversos animais, incluindo as aranhas. Em *A. natalensis*, a atividade hialuronidásica foi identificada por turbidimetria na fração 18 (FR18), sendo esta bastante expressiva. Desta forma, a FR18 foi selecionada para a continuidade do estudo, visando a caracterização bioquímica e estrutural da enzima hialuronidase. (apresentados na Parte III, sobre hialuronidase).

V. CONCLUSÕES

A peçonha de *A. natalensis* possui predominantemente compostos de baixa massa molecular e com caráter hidrofílico, eluídos na porção inicial do cromatograma e, uma pequena quantidade de compostos proteicos, sendo o principal encontrado na faixa de 45 kDa (SDS-PAGE).

Os compostos de baixo peso molecular presentes na FR5, representados pelas acilpoliaminas, apresentaram relevante atividade antimicrobiana com até 90% de inibição do crescimento bacteriano.

A FR5 não reduziu a viabilidade celular (VC) de células tumorais e não-tumoral e por outro lado, um possível aumento da VC de fibroblastos de camundongo (NIH3T3) foi observado. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar este possível efeito, que pode representar uma interessante linha de investigação.

Ainda, a FR5 mostrou um possível efeito modulador da produção de NO de macrófagos J774 induzida por LPS, reduzindo esta produção em aproximadamente 64%, sem afetar a VC. Sem dúvida, futuras investigações são necessárias a fim de identificar e isolar o (os) componente (s) que detêm esta capacidade, bem como avaliar seu efeito sobre a produção de citocinas e as vias de ativação dos macrófagos. A ampla caracterização destas propriedades contribuirá para a qualificação dos seus componentes como possíveis agentes terapêuticos no tratamento de doenças relacionadas a infecção e inflamação.

A caracterização das acilpoliaminas da FR5, denominadas ApAn728, ApAn614a, ApAn614b, ApAn742 e ApAn756, mostrou atividade antibacteriana

contra *E. coli* e *S. aureus* com CIM variando entre 128 e 256 μM e ausência de atividade hemolítica contra eritrócitos de camundongos.

As ApAn apresentaram massas moleculares entre 614 e 756 Da e a análise da estrutura química mostrou a presença de uma unidade tirosil como cromóforo, ligada a uma cadeia poliamina contendo ao menos uma unidade similar a espermidina. Análises por ressonância magnética nuclear (RMN) poderão contribuir para a elucidação completa da estrutura química destas acilpoliaminas.

A peçonha não apresentou atividade proteolítica e fosfolipásica, porém uma expressiva atividade hialuronidásica foi identificada na FR18, sendo esta denominada AnHyal.

A AnHyal apresentou um íon monocarregado em 42,55 kDa (MALDI-TOF), sugerindo a homogeneidade da amostra e íons multi-carregados sugerindo a presença de formas oligoméricas. Uma banda principal em 45 kDa e outras bandas menores (acima de 45 kDa) enzimaticamente ativas, além de uma banda não ativa em 42 kDa, foram identificadas na AnHyal (SDS-PAGE e zimograma).

O sequenciamento *de novo* e degradação de Edman da AnHyal resultou na identificação de similaridades para as proteínas hialuronidase de *B. vagans*, com cobertura proteica de 64% e CRISP de *G. rosea*, com cobertura proteica de 79%.

A identificação de domínios conservados (característicos das proteínas hialuronidase ou CRISP) nos peptídios da AnHyal e o alinhamento destes com outras hialuronidases e CRISP, indicaram a presença destas duas proteínas na AnHyal, sendo denominados AnHyalH (hialuronidase) e AnHyalC (CRISP).

As análises por BN-PAGE mostraram que a AnHyal pode ser encontrada como formas oligoméricas enzimaticamente ativas. Uma destas formas foi

decomposta em duas subunidades, uma ativa em 53 kDa e outra não ativa em 44 kDa. O sequenciamento *de novo* destas subunidades mostrou que a banda ativa corresponde a hialuronidase, enquanto a banda não ativa corresponde a CRISP.

A AnHyalC encontra-se em proporção maior que a AnHyalH e desta forma, é possível que o sinal da AnHyalH tenha sido suprimido, de modo que esta não foi visualizada na análise por MALDI-TOF.

A estrutura secundária da AnHyal foi compatível com aquela apresentada para outras proteínas CRISP, contendo 36,15% de α -hélice e 15,5% de folha β . A AnHyal sofre um processo gradativo de desnaturação, sendo que a temperatura de transição ($T_{melting}$) ocorre em 46,4 °C e a desnaturação total em 65 °C.

A AnHyal apresentou atividade máxima em uma ampla faixa de pH (4,0-6,0) e temperatura (30-60 °C), com uma atividade residual de 85% a 60 °C, sendo que esta pode ter sido favorecida pela associação entre a hialuronidase e CRISP.

A AnHyal apresentou especificidade pelo substrato ácido hialurônico e um valor de K_M de 617,9 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo uma baixa afinidade por seu substrato.

Este trabalho permitiu pela primeira vez, a identificação de um complexo enzimaticamente ativo entre as proteínas hialuronidase e CRISP. Estudos adicionais devem ser realizados para identificar a função da proteína CRISP na peçonha de *A. natalensis*, que poderá ajudar a elucidar a possível relação entre as duas proteínas. A descoberta e caracterização de novos tipos de hialuronidases pode expandir ainda mais as possibilidades de aplicações biotecnológicas dessas enzimas.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, M.; BEDOYA, L.; BERMEJO, P. Natural marine anti-inflammatory products. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 8, n. 8, p. 740–754, 2008.
- ALIA, O.; LAILA, M.; AL-DAOUDEANTONIOUS. Honeybee (*Apis mellifera*) Venom and its Wound Healing Potential. *International Journal Pharmacology Science Review Research*, v. 21, n. 1, p. 318–324, 2013.
- ANKLESARIA, J. H.; PANDYA, R. R.; PATHAK, B. R.; MAHALE, S. D. Purification and characterization of CRISP-3 from human seminal plasma and its real-time binding kinetics with PSP94. *Journal of Chromatography B*, v. 1039, p. 59–65, 2016.
- BALDWIN, M. A. Protein Identification by Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2004.
- BARRETO, R. D. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: Propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Quimica Nova*, v. 28, n. 6, p. 1046–1054, 2005.
- BATISTA, C. V. F.; ROMÁN-GONZÁLEZ, S. A.; SALAS-CASTILLO, S. P.; ZAMUDIO, F. Z.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L. D. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 146, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 147–157, 2007.
- BINER, O.; TRACHSEL, C.; MOSER, A.; KOPP, L.; LANGENEGGER, N.; KÄMPFER, U.; BALLMOOS, C. VON; NENTWIG, W.; SCHÜRCH, S.; SCHALLER, J.; KUHN-NENTWIG, L. Isolation, N-glycosylations and function of a hyaluronidase-like enzyme from the venom of the spider *Cupiennius salei*. *PLoS ONE*, v. 10, n. 12, p. 1–32, 2015.
- BÖHM, G. CDNN: CD spectra deconvolution software version 2.1. University of Halle-Wittenberg, Halle, Germany, 1997.
- BORDON, K. C. F.; PERINO, M. G.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochimie*, v. 94, n. 12, p. 2740–2748, 2012.
- BORDON, K. C. F.; WIEZEL, G. A.; AMORIM, F. G.; ARANTES, E. C. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 21, n. 1, p. 43, 22 dez. 2015.
- BORGES, M. H.; FIGUEIREDO, S. G.; LEPREVOST, F. V.; LIMA, M. E. DE; CORDEIRO,

- M. DO N.; DINIZ, M. R. V.; MORESCO, J.; CARVALHO, P. C.; YATES, J. R. Venomous extract protein profile of Brazilian tarantula *Grammostola iheringi*: Searching for potential biotechnological applications. *Journal of Proteomics*, v. 136, p. 35–47, 2016.
- BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.-L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 23, n. 4, p. 329–344, 1999.
- CASELLA-MARTINS, A.; AYRES, L. R.; BURIN, S. M.; MORAIS, F. R.; PEREIRA, J. C.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; CASTRO, F. A.; PEREIRA-CROTT, L. S. Immunomodulatory activity of *Tityus serrulatus* scorpion venom on human T lymphocytes. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 21, n. 1, p. 46, 2015.
- ČERNÁ, P.; MIKEŠ, L.; VOLF, P. Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, n. 12, p. 1691–1697, 2002.
- CHESNOV, S.; BIGLER, L.; HESSE, M. The Acylpolyamines from the venom of the spider *Agelenopsis aperta*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 84, n. 8, p. 2178–2197, 2001.
- CHOUDHARI, S. K.; CHAUDHARY, M.; BAGDE, S.; GADBAIL, A. R.; JOSHI, V. Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*, v. 11, n. 1, p. 118, 2013.
- CHRISTEN, G. L.; MARSHALL, R. T. Selected Properties of Lipase and Protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 Produced in Four Media. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 8, p. 1680–1687, 6 ago. 1984.
- CLEMENT, H.; OLVERA, A.; RODRÍGUEZ, M.; ZAMUDIO, F.; PALOMARES, L. A.; POSSANI, L. D.; ODELL, G. V.; ALAGÓN, A.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, R. Identification, cDNA cloning and heterologous expression of a hyaluronidase from the tarantula *Brachypelma vagans* venom. *Toxicon*, v. 60, n. 7, p. 1223–1227, 2012.
- CODDINGTON, J. A.; LEVI, H. W. Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 22, n. 1, p. 565–592, 1991.
- COHEN, D. J.; MALDERA, J. A.; MUÑOZ, M. W.; ERNESTO, J. I.; VASEN, G.; CUASNICUL, P. S. Cysteine-rich secretory proteins (CRISP) and their role in mammalian fertilization. *Biological Research*, v. 44, n. 2, p. 135–138, 2011.
- COHEN, E.; QUISTAD, G. B. Cytotoxic effects of arthropod venoms on various cultured cells. *Toxicon*, v. 36, n. 2, p. 353–358, 1998.

- COOPER, A. M.; NELSEN, D. R.; HAYES, W. K. The strategic use of venom by spiders. *In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; MALHOTRA, A. (Eds.). Evolution of venomous animals and their toxins. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. p. 1–18.*
- CORZO, G.; VILLEGAS, E.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L. D.; BELOKONEVA, O. S.; 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. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 26, p. 23627–23637, 2002.
- CRUZ, A. H.; MENDONÇA, R. Z.; PETRICEVICH, V. L. *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. *Mediators of Inflammation*, v. 2005, n. 6, p. 349–359, 2005.
- CSOKA, A. B.; STERN, R. Hypotheses on the evolution of hyaluronan: A highly ironic acid. *Glycobiology*, v. 23, n. 4, p. 398–411, 2013.
- DANNEELS, E. L.; GERLO, S.; HEYNINCK, K.; CRAENENBROECK, K. VAN; BOSSCHER, K. DE; HAEGEMAN, G.; GRAAF, D. C. DE. How the venom from the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* exhibits anti-inflammatory properties on mammalian cell lines. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, p. 1–13, 2014.
- DESAI, A.; LANKFORD, H. A.; WARREN, J. S. *Loxosceles deserta* spider venom induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in keratinocytes. *Inflammation*, v. 24, n. 1, p. 1–9, 2000.
- DI-FERRANTE, N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 220, n. 1, p. 303–306, 1956.
- ELDEFRAWI, A. T.; ELDEFRAWI, M. E.; KONNO, K.; MANSOUR, N. A.; NAKANISHIT, K.; OLTZT, E.; USHERWOOD, P. N. R.; NAKANISHI, K.; OLTZ, E. Structure and synthesis of a potent glutamate receptor antagonist in wasp venom. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 85, n. July, p. 4910–4913, 1988.
- ESTRADA-GOMEZ, S.; MUÑOZ, L. J. V.; QUINTANA, J. C. Extraction and partial characterization of venom from the Colombian spider *Pamphobeteus aff. nigricolor* (Aranae:Theraphosidae). *Toxicon*, v. 76, p. 301–309, 2013.
- ESTRADA, G.; VILLEGAS, E.; CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Nat. Prod. Rep.*, v. 24, n. 1, p. 145–161, 2007.

- FARSKY, S. H. P.; ANTUNES, E.; MELLO, S. B. V. Pro and antiinflammatory properties of toxins from animal venoms. *Current drug targets. Inflammation and Allergy*, v. 4, n. 3, p. 401–411, 2005.
- FERREIRA, A. S.; SILVA, A. D. O.; CONCEIÇÃO, B. M. DA; CARDOSO, D. D. S.; SANTOS, P. Predation on *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata: Tropiduridae) by *Acanthoscurria natalensis* (Aranea: Theraphosidae) in the semiarid Caatinga region of northeastern Brazil. *Herpetology Notes*, v. 7, p. 501–503, 2014.
- FERREIRA, F. R. B. *et al.* Evaluation of antimicrobial, cytotoxic, and hemolytic activities from venom of the spider *Lasiodora* sp. *Toxicon*, v. 122, p. 119–126, 2016.
- FERREIRA, I. L. C.; SILVA JUNIOR, P. I. Acilpoliaminas do veneno da aranha brasileira *Nephilengys cruentata*: antigos neuromoduladores como uma nova alternativa no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos. *In: UNESCO:BRASILIA/RECYT/CNPQ/MBC/CGEE (Ed.). Inovação tecnológica na saúde: edição 2012 do Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia. 1a. ed. Brasília: UNESCO, 2012. p. 37–60.*
- FERRER, V. P.; MARI, T. L. DE; GREMSKI, L. H.; TREVISAN SILVA, D.; SILVEIRA, R. B. DA; GREMSKI, W.; CHAIM, O. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2013.
- FISZER-SZAFARZ, B.; LITYNSKA, A.; ZOU, L. Human hyaluronidases: Electrophoretic multiple forms in somatic tissues and body fluids: Evidence for conserved hyaluronidase potential N- glycosylation sites in different mammalian species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 45, n. 2, p. 103–116, 2000.
- FROST, G. I.; CSÓKA, T.; STERN, R. The Hyaluronidases : A Chemical , Biological and Clinical. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, v. 8, n. 44, p. 419–434, 1996.
- FUJITA, T.; ITAGAKI, Y.; NAOKI, H.; NAKAJIMA, T.; HAGIWARA, K. Structural characterization of glutaminergic blocker spider toxins by high-energy collision charge-remote fragmentations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 9, n. 5, p. 365–371, 1995.
- FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, v. 4, n. 3, p. 281–286, 2005.
- GAO, L.; SHAN, B.; CHEN, J.; LIU, J.; SONG, D.; ZHU, B. Effects of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells. *Acta Pharmacologica*

- Sinica, v. 26, p. 369–376, 2005.
- GAO, L.; YU, S.; WU, Y.; SHAN, B. Effect of spider venom on cell apoptosis and necrosis rates in MCF-7 cells. *DNA and cell biology*, v. 26, n. 7, p. 485–489, 2007.
- GARCÍA-ARREDONDO, A.; RODRÍGUEZ-RIOS, L.; DÍAZ-PEÑA, L. F.; VEGA-ÁNGELES, R. 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*, v. 21, p. 15, 2015.
- GENTZ, M. C.; JONES, A.; CLEMENT, H.; KING, G. F. Comparison of the peptidome and insecticidal activity of venom from a taxonomically diverse group of Theraphosid spiders. *Toxicon*, v. 53, n. 5, p. 496–502, 2009.
- GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic α helical antimicrobial peptides. *European Journal of Biochemistry*, v. 268, n. 21, p. 5589–5600, 2001.
- GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. A low molecular weight isoform of hyaluronidase: Purification from Indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization. *Biochemistry (Moscow)*, v. 70, n. 6, p. 708–712, 2005.
- GRISHAM, M. B.; JOURD'HEUIL, D.; WINK, D. A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *The American journal of physiology*, v. 276, n. 2 Pt 1, p. G315–G321, 1999.
- GRISHIN, E. V.; VOLKOVA, T. M.; ARSENIIEV, A. S. Isolation and structure analysis of components from venom of the spider *Argiope lobata*. *Toxicon*, v. 27, n. 5, p. 541–549, 1989.
- HANEY, E. F.; HANCOCK, R. E. W. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Biopolymers*, v. 100, n. 6, p. 572–583, 2014.
- HANEY, R. A.; AYOUB, N. A.; CLARKE, T. H.; HAYASHI, C. Y.; GARB, J. E. Dramatic expansion of the black widow toxin arsenal uncovered by multi-tissue transcriptomics and venom proteomics. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 366, 2014.
- HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. *Toxicon*, v. 92, p. 193–200, 2014.
- HEINEN, T. E.; VEIGA, A. B. G. Arthropod venoms and cancer. *Toxicon*, v. 57, n. 4, p. 497–511, 2011.
- HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 157, n. 1, p. 87–94, 1988.
- HISADA, M.; FUJITA, T.; NAOKI, H.; ITAGAKI, Y.; IRIE, H.; MIYASHITA, M.; NAKAJIMA, T. Structures of spider toxins: Hydroxyindole-3-acetyl polyamines and a new generalized

- structure of type-E compounds obtained from the venom of the Joro spider, *Nephila clavata*. *Toxicon*, v. 36, n. 8, p. 1115–1125, 1998.
- HORTA, C. C. R.; MAGALHÃES, B. F. DE; OLIVEIRA-MENDES, B. B. R.; CARMO, A. O. DO; DUARTE, C. G.; FELICORI, L. F.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 2, p. e2693, 2014.
- HUANG, H. N.; PAN, C. Y.; CHAN, Y. L.; CHEN, J. Y.; WU, C. J. Use of the antimicrobial peptide pardaxin (GE33) to protect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice with skin injuries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 3, p. 1538–1545, 2014.
- ITAGAKI, Y.; FUJITA, T.; NAOKI, H.; YASUHARA, T.; ANDRIANTSIFERANA, M.; NAKAJIMA, T. Detection of new spider toxins from a *Nephilengys borbonica* venom gland using on-line mu-column HPLC continuous flow (FRIT) FAB LC/MS and MS/MS. *Natural toxins*, v. 5, n. 1, p. 1–13, 1997.
- JAMES, K. J.; FUREY, A. Neurotoxins: Chromatography. *In: Encyclopedia of Separation Science*. [s.l.] Elsevier, 2000. p. 3482–3490.
- KASTIN, A. Handbook of Biologically Active Peptides. [s.l.] Elsevier Science, 2013.
- KEMENY, D. M.; DALTON, N.; LAWRENCE, A. J.; PEARCE, F. L.; VERNON, C. A. The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 139, n. 2, p. 217–223, 1984.
- KENNY, P. T. M.; GOODNOW JR, R. A.; KONNO, K.; NAKANISHI, K. Philanthotoxins. A mass spectrometric investigation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 3, n. 9, p. 295–297, 1989.
- KOZLOV, S. A.; VASSILEVSKI, A. A.; FEOFANOV, A. V.; SUROVOY, A. Y.; KARPUNIN, D. V.; GRISHIN, E. V. Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 30, p. 20983–20992, 2006.
- KRÄTZSCHMAR, J.; HAENDLER, B.; EBERSPAECHER, U.; ROOSTERMAN, D.; DONNER, P.; SCHLEUNING, W.-D. The Human Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) Family. *European Journal of Biochemistry*, v. 236, n. 3, p. 827–836, 1996.
- KUHN-NENTWIG, L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 60, n. 12, p. 2651–2668, 2003.
- KUHN-NENTWIG, L.; MÜLLER, 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). *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 13, p. 11208–11216, 2002.
- KUHN-NENTWIG, L.; SCHALLER, J.; NENTWIG, W. Purification of toxic peptides and the amino acid sequence of CSTX-1 from the multicomponent venom of *Cupiennius salei* (Araneae:Ctenidae). *Toxicon*, v. 32, n. 3, p. 287–302, 1994.
- KUHN-NENTWIG, L.; STÖCKLIN, R.; NENTWIG, W. Venom composition and strategies in spiders. is everything possible? [s.l: s.n.]. v. 40
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LODOVICHIO, M. E. *et al.* Investigating possible biological targets of Bj-CRP, the first cysteine-rich secretory protein (CRISP) isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicology Letters*, v. 265, p. 156–169, 2017.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 2008.
- LORENZINI, D. M.; SILVA, P. I. DA; FOGAÇA, A. C.; BULET, P.; DAFFRE, S. Acanthoscurrin: A novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 27, n. 9, p. 781–791, 2003.
- LUCAS, S. M.; GONZALEZ FILHO, H. M. O.; PAULA, F. D. S.; GABRIEL, R.; BRESCOVIT, A. D. Redescription and new distribution records of *Acanthoscurria natalensis* (Araneae: Mygalomorphae: Theraphosidae). *Zoologia*, v. 28, n. 4, p. 525–530, 2011.
- MAFRA, D. G.; SILVA, P. I. DA; GALHARDO, C. S.; NASSAR, R.; DAFFRE, S.; SATO, M. N.; BORGES, M. M. The spider acylpolyamine Mygalin is a potent modulator of innate immune responses. *Cellular Immunology*, v. 275, n. 1–2, p. 5–11, 2012.
- MALAUQUE; ORI; SANTOS; ANDRADE. Production of TNF-alpha by primary cultures of human keratinocytes challenged with *Loxosceles gaucho* venom. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 41, n. 3, p. 179–82, 1999.
- MALVE, H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, v. 8, n. 2, p. 83–91, 2016.
- MANOV, N.; TZOUROS, M.; BIGLER, L.; BIENZ, S. Solid-phase synthesis of ¹⁵N-labeled acylpentamines as reference compounds for the MS/MS investigation of spider toxins. *Tetrahedron*, v. 60, n. 10, p. 2387–2391, 2004.

- MARCO ALMEIDA, F.; MONTEIRO DE CASTRO PIMENTA, A.; CRISTINA OLIVEIRA, M.; ELENA DE LIMA, M. Venoms, toxins and derivatives from the Brazilian fauna: valuable sources for drug discovery. *Acta Physiologica Sinica*, v. 67, n. 3, p. 261–270, 2015.
- MARINETTI, G. V. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, v. 98, n. 3, p. 554–565, 1965.
- MATAVEL, A.; ESTRADA, G.; MARCO ALMEIDA, F. Spider Venom and Drug Discovery: A Review. *In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; CORZO, G. A.; DIEGO-GARCIA, E.; LIMA, M. E. DE (Eds.). . Spider Venoms*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016. p. 273–292.
- MCCORMICK, S.; POLIS, G. A. Arthropods that prey on vertebrates. *Biological Reviews*, v. 57, n. 1, p. 29–58, 1982.
- MEDEIROS, G. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1475, n. 3, p. 287–294, 2000.
- MILNE, T. J.; ABBENANTE, G.; TYNDALL, J. D. A.; HALLIDAY, J.; LEWIS, R. J. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 33, p. 31105–31110, 2003.
- MIURA, R. O.; YAMAGATA, S.; MIURA, Y.; HARADA, T.; YAMAGATA, T. Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). *Analytical Biochemistry*, v. 225, n. 2, p. 333–340, mar. 1995.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 21, n. 4, p. 361–374, 1991.
- MOON, D. O.; PARK, S. Y.; LEE, K. J.; HEO, M. S.; KIM, K. C.; KIM, M. O.; LEE, J. D.; CHOI, Y. H.; KIM, G. Y. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *International Immunopharmacology*, v. 7, n. 8, p. 1092–1101, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MOURÃO, C. B. F.; HEGHINIAN, M. D.; BARBOSA, E. A.; MARÍ, F.; BLOCH, C.; RESTANO-CASSULINI, R.; POSSANI, L. D.; SCHWARTZ, E. F. Characterization of a novel peptide toxin from *Acanthoscurria paulensis* spider venom: A distinct cysteine assignment to the HWTX-II family. *Biochemistry*, v. 52, n. 14, p. 2440–2452, 2013.
- MÖLLER, C.; CLARK, E.; SAFAVI-HEMAMI, H.; DECAPRIO, A.; MARÍ, F. Isolation and

- characterization of Conohyal-P1, a hyaluronidase from the injected venom of *Conus purpurascens*. *Journal of Proteomics*, v. 164, p. 73–84, 2017.
- NAGARAJU, S.; DEVARAJA, S.; KEMPARAJU, K. Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. *Toxicon*, v. 50, n. 3, p. 383–393, 2007.
- NAGARAJU, S.; MAHADESWARASWAMY, Y. H.; GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. Venom from spiders of the genus *Hippasa*: Biochemical and pharmacological studies. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 144, n. 1, p. 1–9, 2006.
- NAKANISHI, K.; GOODNOW, R.; KONNO, K.; NIWA, M.; BUKOWNIK, R.; KALLIMOPOULOS, T. A.; USHERWOOD, P.; ELDEFRAWI, A. T.; ELDEFRAWI, M. E. Philanthotoxin-433 (PhTx-433), a non-competitive glutamate receptor inhibitor. *Pure and Applied Chemistry*, v. 62, n. 7, p. 1223–1230, 1990.
- NENTWIG, W. *Spider Ecophysiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- NESTERENKO, M. V.; TILLEY, M.; UPTON, S. J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 28, n. 3, p. 239–242, 1994.
- NUNES, K. P.; COSTA-GONÇALVES, A.; LANZA, L. F.; CORTES, S. F.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, A. M. C.; WEBB, R. C.; LEITE, R.; LIMA, M. E. DE. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. *Toxicon*, v. 51, n. 7, p. 1197–1206, 2008.
- PACE, C. N.; SHIRLEY, B. A.; THOMSON, J. A. Measuring the conformational stability of a protein. *In: Protein structure: A practical approach*. [s.l.] IRL Press, Oxford, 1989. p. 311–330.
- PALMA, M. S. The Acylpolyamines from Spider Venoms. *In: Studies in Natural Products Chemistry*. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2012. v. 36p. 27–42.
- PALMA, M. S.; NAKAJIMA, T. a Natural Combinatorial Chemistry Strategy in Acylpolyamine Toxins From Nephilinae Orb-Web Spiders. *Toxin Reviews*, v. 24, n. 2, p. 209–234, 2005.
- PEREIRA, L. S.; SILVA, P. I.; MIRANDA, M. T. M.; ALMEIDA, I. C.; NAOKI, H.; KONNO, K.; DAFFRE, S. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 352, n. 4, p. 953–959,

- 2007.
- PÉREZ-MILES, F.; LUCAS, S.; SILVA JUNIOR, P. DA; BERTANI, R. Systematic revision and cladistic analysis of Theraphosinae (Araneae: Theraphosidae). [s.l: s.n.]. v. 1
- PETRICEVICH, V. L. Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, v. 3, n. 3, p. 325–332, 2004.
- PETRICEVICH, V. L. Scorpion Venom and the Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation*, v. 2010, p. 1–16, 2010.
- PINTO, J. R. A. D. S.; SANTOS, L. D. DOS; ARCURI, H. A.; DIAS, N. B.; PALMA, M. S. Proteomic characterization of the hyaluronidase (E.C. 3.2.1.35) from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Protein and peptide letters*, v. 19, n. 6, p. 625–635, 2012.
- PLATNICK, N. I. The World Spider Catalog, version 18.5. New York: Natural History Museum Bern. Disponível em: <<http://wsc.nmbe.ch>>. Acesso em: 24 jul. 2017.
- PUKALA, T. L.; DOYLE, J. R.; LLEWELLYN, L. E.; KUHN-NENTWIG, L.; APPONYI, M. A.; SEPAROVIC, F.; BOWIE, J. H. Cupiennin 1a, an antimicrobial peptide from the venom of the neotropical wandering spider *Cupiennius salei*, also inhibits the formation of nitric oxide by neuronal nitric oxide synthase. *FEBS Journal*, v. 274, n. 7, p. 1778–1784, 2007.
- QUISTAD, G. B.; SUWANRUMPHA, S.; JAREMA, M. A.; SHAPIRO, M. J.; SKINNER, W. S.; JAMIESON, G. C.; LUI, A. Structures of paralytic acypolyamines from the spider *Agelenopsis aperta*. *Biochemical and Biophysical research Communications*, v. 169, n. 1, p. 51–56, 1990.
- RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon*, v. 44, n. 1, p. 1–17, 2004.
- RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*, v. 2, n. 8, p. 1896–1906, 1 ago. 2007.
- RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, v. 40, n. 3, p. 225–254, mar. 2002.
- RATES, B.; PRATES, M. V.; VERANO-BRAGA, T.; ROCHA, Â. P. DA; ROEPSTORFF, P.; BORGES, C. L.; LAPIED, B.; MURILLO, L.; PIMENTA, A. M. C.; BIONDI, I.; LIMA, M. E. DE. μ -Theraphotoxin-An1a: Primary structure determination and assessment of the pharmacological activity of a promiscuous anti-insect toxin from the venom of the tarantula *Acanthoscurria natalensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae). *Toxicon*, v. 70, p. 123–134, 2013.

- RICHARDSON, M. *et al.* Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 142, n. 3–4 SPEC. ISS., p. 173–187, 2006.
- ROCHA-E-SILVA, T. A. A.; ROSTELATO-FERREIRA, S.; LEITE, G. B.; SILVA, P. I. DA; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. VdTX-1, a reversible nicotinic receptor antagonist isolated from venom of the spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon*, v. 70, n. May 2013, p. 135–141, ago. 2013.
- ROCHA-E-SILVA, T. A. A.; SUTTI, R.; HYSLOP, S. Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon*, v. 53, n. 1, p. 153–161, 2009.
- RODRÍGUEZ-RIOS, L.; DÍAZ-PEÑA, L. F.; 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*, v. 136, p. 34–43, 2017.
- SAEZ, N. J.; SENFF, S.; JENSEN, J. E.; ER, S. Y.; HERZIG, V.; RASH, L. D.; KING, G. F. Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins*, v. 2, n. 12, p. 2851–2871, 2010.
- SAMY, R. P.; KANDASAMY, M.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; STILES, B. G.; ROWAN, E. G.; BECKER, D.; SHANMUGAM, M. K.; SETHI, G.; CHOW, V. T. K. Wound healing activity and mechanisms of action of an antibacterial protein from the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. e80199, 14 fev. 2014.
- SANGGAARD, K. W. *et al.* Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk. *Nature Communications*, v. 5, n. May, p. 3765, 2014.
- SANNANINGAIAH, D.; SUBBAIAH, G. K.; KEMPAIAH, K. Pharmacology of spider venom toxins. *Toxin Reviews*, v. 33, n. 4, p. 206–220, 2014.
- SANTOS, S. D.; CAHÚ, T. B.; FIRMINO, G. O.; CASTRO, C. C. M. B. DE; CARVALHO JR., L. B.; BEZERRA, R. S.; FILHO, J. L. L. Shrimp waste extract and astaxanthin: rat alveolar macrophage, oxidative stress and inflammation. *Journal of Food Science*, v. 77, n. 7, p. H141–H146, jul. 2012.
- SAROJ, P.; VERMA, M.; K JHA, K.; PAL, M. An overview on immunomodulation. *J Adv Sci Res*, v. 3, n. 1, p. 7–12, 2012.
- SATO, A. C.; BOSCH, R. V.; WILL, S. E. A.; ALVAREZ-FLORES, M. P.; GOLDFEDER, M. B.; PASQUALOTO, K. F. M.; SILVA, B. A. V. G. DA; ANDRADE, S. A. DE; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Exploring the in vivo wound healing effects of a

- recombinant hemolin from the caterpillar *Lonomia obliqua*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 22, n. 1, p. 36, 2016.
- SCHÄFER, A.; BENZ, H.; FIEDLER, W.; GUGGISBERG, A.; BIENZ, S.; HESSE, M. Polyamine toxins from spiders and wasps. *Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, v. 45, n. C, p. 1–125, 1994.
- SCHAGGER, H.; CRAMER, W. A.; VONJAGOW, G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v. 217, n. 2, p. 220–230, 1994.
- SCHANBACHER, F. L.; LEE, C. K.; WILSON, I. B.; HOWELL, D. E.; ODELL, G. V. Purification and characterization of tarantula, *Dugesiella hentzi* (girard) venom Hyaluronidase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 44, n. 2, p. 389–396, fev. 1973.
- SENF-FRIBREIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 3, p. 210–218, 2008.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.
- SHRIDAS, P.; WEBB, N. R. Diverse functions of secretory Phospholipases A 2. *Advances in Vascular Medicine*, v. 2014, n. 859, p. 1–11, 2014.
- SILVA, P. I.; DAFFRE, S.; BULET, P. 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*, v. 275, n. 43, p. 33464–33470, 2000.
- SILVEIRA, R. B. DA; CHAIM, O. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- β -N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon*, v. 49, n. 6, p. 758–768, maio 2007.
- SKINNER, W. S.; ADAMS, M. E.; QUISTAD, G. B.; KATAOKA, H.; CESARIN, B. J.; ENDERLIN, F. E.; SCHOOLEY, D. A. Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Journal of Biological*

- Chemistry, v. 264, n. 4, p. 2150–2155, 1989.
- SKINNER, W. S.; DENNIS, P. A.; LUI, A.; CARNEY, R. L.; QUISTAD, G. B. Chemical characterization of acylpolyamine toxins from venom of a trap-door spider and two tarantulas. *Toxicon*, v. 28, n. 5, p. 541–546, 1990.
- SORU, E.; ZAHARIA, O. Presence of N-acetyl group in hyaluronidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 119, n. 11, p. 498–500, 1967.
- SUTTI, R.; ROSA, B. B.; WUNDERLICH, B.; SILVA JUNIOR, P. I. DA; ROCHA E SILVA, T. A. A. DA. Antimicrobial activity of the toxin VdTX-I from the spider *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae). *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 4, p. 324–328, 2015.
- SUTTI, R.; TAMASCIA, M.; HYSLOP, S.; ROCHA-E-SILVA, T. A. Purification and characterization of a hyaluronidase from venom of the spider *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 20, n. 1, p. 2, 2014.
- TAKAKI, H.; KOGANEMARU, R.; IWAKAWA, Y.; HIGUCHI, R.; MIYAMOTO, T. Inhibitory effect of norditerpenes on LPS-induced TNF- α production from the Okinawan soft coral, *Sinularia* sp. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 26, n. 3, p. 380–382, 2003.
- TAMBOURGI, D. V.; PETRICEVICH, V. L.; MAGNOLI, F. C.; ASSAF, S. L. M. ; JANCAR, S.; DIAS DA SILVA, W. Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators. *Toxicon*, v. 36, n. 2, p. 391–403, 1998.
- TOKI, T.; MIWA, A.; KAWAI, N.; HAGIWARA, K.; NAKAJIMA, T. Paralytic effect of spider toxin-related compounds on german cockroach, *Blattella germanica*. *Biomedical Research*, v. 13, n. 1, p. 53–58, 1992.
- UDBY, L.; CALAFAT, J.; SØRENSEN, O. E.; BORREGAARD, N.; KJELDEN, 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. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 72, n. 3, p. 462–469, 2002.
- UDBY, L.; LUNDWALL, Å.; JOHNSEN, A. H.; FERNLUND, P.; VALTONEN-ANDRÉ, C.; BLOM, A. M.; LILJA, H.; BORREGAARD, N.; KJELDEN, L.; BJARTELL, A. β -Microseminoprotein binds CRISP-3 in human seminal plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 333, n. 2, p. 555–561, 2005.
- UDBY, L.; SØRENSEN, O. E.; PASS, J.; JOHNSEN, A. H.; BEHRENDT, N.; BORREGAARD, N.; KJELDEN, L. Cysteine-rich secretory protein 3 is a ligand of

- alpha1B-glycoprotein in human plasma. *Biochemistry*, v. 43, n. 40, p. 12877–86, 2004.
- UNDHEIM, E. A. B. *et al.* A Proteomics and Transcriptomics investigation of the venom from the Barychelid spider *Trittame loki* (brush-foot trapdoor). *Toxins*, v. 5, n. 12, p. 2488–2503, 2013.
- UTKIN, Y. N. Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World Journal of Biological Chemistry*, v. 6, n. 2, p. 28–33, 2015.
- VASSILEVSKI, A. A.; GRISHIN, E. V. Novel active principles from spider venom. *Acta Chim Slov*, v. 58, p. 717–723, 2011.
- VASSILEVSKI, A A; KOZLOV, S. A; GRISHIN, E. V. Molecular Diversity of Spider Venom. *Biochemistry (Moscow)*, v. 74, n. 13, p. 1505–1534, 2009.
- VINES, C. M.; BILL, C. A. Phospholipases. *In: eLS*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–9.
- VOLFOVA, V.; HOSTOMSKA, J.; CERNY, M.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on leishmania infection in mice. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 2, n. 9, p. e294, 2008.
- WANG, X.; WANG, G. Insights into Antimicrobial Peptides from Spiders and Scorpions. *Protein and peptide letters*, v. 23, n. 8, p. 707–721, 2016.
- WANG, Y. L.; KUO, J. H.; LEE, S. C.; LIU, J. S.; HSIEH, Y. C.; SHIH, Y. T.; CHEN, C. J.; CHIU, J. J.; WU, W. G. Cobra CRISP functions as an inflammatory modulator via a novel Zn²⁺- and heparan sulfate-dependent transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 48, p. 37872–37883, 2010.
- WIEGAND, C.; BAUER, M.; HIPLER, U.-C.; FISCHER, D. Poly(ethyleneimines) in dermal applications: Biocompatibility and antimicrobial effects. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 456, n. 1, p. 165–174, 2013.
- WILSON, D.; BOYLE, G. M.; MCINTYRE, L.; NOLAN, M. J.; PARSONS, P. G.; SMITH, J. J.; TRIBOLET, L.; LOUKAS, A.; LIDDELL, M. J.; RASH, L. D.; DALY, N. L. The aromatic head group of spider toxin polyamines influences toxicity to cancer cells. *Toxins*, v. 9, n. 11, p. 1–13, 2017.
- WITTIG, I.; BRAUN, H.-P.; SCHÄGGER, H. Blue native PAGE. *Nature Protocols*, v. 1, p. 418–428, 2006.
- WRIGHT, R. P.; ELGERT, K. D.; CAMPBELL, B. J.; BARRETT, J. T. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 159, n. 1, p. 415–426, 1973.

- YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*, v. 44, n. 3, p. 227–231, 2004.
- YAN, L.; ADAMS, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 4, p. 2059–2066, 1998.
- ZHANG, K.; NI, Y. Tyrosine decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: Soluble expression and characterization. *Protein Expression and Purification*, v. 94, n. Supplement C, p. 33–39, 2014.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Anexo I. Licença SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 51803-2	Data da Emissão: 02/12/2016 10:33	Data para Revalidação*: 01/01/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Tania Barth	CPF: 902.748.229-20
Título do Projeto: Investigação e caracterização química e biológica de compostos isolados da peçonha da aranha caranguejeira <i>Acanthoscurria natalensis</i> Chamberlin, 1917	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	
CNPJ: 00.038.174/0001-43	

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Acanthoscurria natalensis</i>
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Acanthoscurria natalensis</i>
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Acanthoscurria natalensis</i>
4	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Acanthoscurria natalensis</i> (*Qtd: 30)
5	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	<i>Acanthoscurria natalensis</i>

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Secreção
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	

Anexo II. Autorização CEUA



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 11 de maio de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**Investigação e caracterização química e biológica de compostos isolados da peçonha da aranha caranguejeira Acanthoscurria natalensis Chamberlin, 1917**”, Protocolo n.º 44/2017, sob responsabilidade do Professor Osmino Rodrigues Pires Júnior foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (3) e *Acanthoscurria natalensis* (30 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 5/6/2017 a 28/02/2018.



Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Anexo III. Artigo científico publicado durante o período do doutorado

Marine Depsipeptides as Promising Pharmacotherapeutic Agents

Marisa Rangel, Carlos José Correia de Santana, Andréia Pinheiro, Lilian dos Anjos, Tania Barth, Osmino Rodrigues Pires Júnior, Wagner Fontes e Mariana S. Castro

Current Protein and Peptide Science, 2017, 18, 72-91