

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA
DOUTORADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
VENENO DA ARANHA BRASILEIRA LASIODORA sp
(ARANAE:THERAPHOSIDAE)**

FELIPE ROBERTO BORBA FERREIRA

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a RUSSOLINA BENEDETA ZINGALI
CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA

RECIFE, 2015

FELIPE ROBERTO BORBA FERREIRA

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
VENENO DA ARANHA BRASILEIRA LASIODORA sp
(ARANAE:THERAPHOSIDAE)

Tese apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Doutor
em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco

Aprovado por:

Profª Drª Russolina Benedeta Zingali (Orientadora)
(Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

Profº Drº Tiago Henrique Napoleão (Titular Interno)
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Profª Drª Luana Cassandra B. B. Coelho (Titular Interno)
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Profº Drº Silas Pessini Rodrigues (Titular Externo)
(Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ)

Profº Drº Emmanuel Viana Pontual (Titular Externo)
(Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE)

Data: 28/ 04 /2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Ferreira, Felipe Roberto Borba

Caracterização parcial e atividades biológicas do veneno da aranha brasileira *Lasiodora* sp (Aranae: Theraphosidae)./ Felipe Roberto Borba Ferreira. – Recife: O Autor, 2015.

89 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Russolina Benedeta Zingali

Coorientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui referências.

1. Aranhas- veneno 2. Bactericidas 3. Peptídeos I. Zingali, Russolina Benedeta (orient.) II. Paiva, patrícia Maria Guedes (coorient.) III. Título

615.942

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-302

Dedico esta Tese aos meus pais Roberto e Marineide, Tia Mana, Mayara e Cintia, pelo apoio
nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me conceder esta oportunidade de concluir mais este projeto na minha vida e poder desta forma crescer e evoluir profissional e moralmente. Pois Ele é a causa primeira de todas as coisas.

Em segundo lugar agradeço a minha mãe Marineide e ao meu Pai Roberto. Sou fruto da dedicação, carinho e amor incondicional de vocês. Aos meus irmãos Carlos e Jéssica, obrigado.

A minha orientadora e amiga, Lina, por ter me acolhido de forma tão calorosa desde o primeiro instante em que nos conhecemos e me proporcionar experiências únicas de conhecimento dentro e fora do laboratório. Muito obrigado por todas as oportunidades proporcionadas, pelo carinho, atenção, dedicação, preocupação e principalmente por acreditar em mim. Sou um privilegiado em ser seu orientando.

A minha co-orientadora Patrícia Paiva, pela oportunidade e confiança depositados em mim nesta etapa. Grato pelo carinho, atenção e incentivo para poder seguir em frente nesta jornada.

A minha eterna orientadora, Professora Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti, pois sem ela nunca teria chegado aonde cheguei. Obrigado por toda força dada em cada segundo desta jornada. Não tenho palavras para agradecer a confiança depositada, desde o primeiro momento que a procurei para fazer pesquisa.

A minha amiga Tatiana Soares, que esta comigo desde o início de todos os trabalhos. Obrigado pelo companheirismo, dedicação, paciência e apoio dado em nesta jornada.

A minha amiga Larissa, pela paciência, carinho, atenção, companheirismo, força e dedicação durante os experimentos e fora deles, você é um anjo, muito obrigado por tudo.

A minha querida tia Mana, por toda a dedicação, ajuda, conversas e conselhos dados. Obrigado por acreditar e não desistir de mim... não tenho palavras para expressar minha eterna gratidão por tudo.

Aos amigos da NAV Treinamentos, Marcelo Magalhães pelo incentivo de todos os dias para seguir em frente nesta jornada e Mônica Alves pela força e estímulos dados. Ana Gisely,

Faby Holanda, Silva Filho, Sidvan Gomes, Scanoni, Simone, Victor e Eric pela força e estímulo de sempre para eu concluir este projeto.

Aos bons companheiros e amigos feitos na UFRJ, pelas risadas, lamúrias e discussões: Larrisa, Marjolly, Aninha, Augusto, Sandra, Silas, Luciana, Vanessa, Bárbara, Flávia, Hellen, Jéssica, Nola, Rosane, Maria Clara, Taíssa, Victor, Ricardo, Carlos, Rafael, Dani, Carol, Fausto, Dione, Dário e Denise. Todos vocês foram de importância ímpar para minha formação.

Aos companheiros da UFPE que fazem parte do laboratório de Glicoproteínas: Tiago, Tati, Mano, Raiana, Michelly, Ana Patrícia, Thâmarah, Carlos, Leide, Nataly, Tamara, muito obrigado pela força e convivência.

Agradeço as agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPq pelo incentivo a pesquisa e educação.

Um agradecimento especial às pessoas me ajudaram realmente a não desistir desta jornada tão dura. Mayara Estephane e Cintia Nery Albuquerque essa Tese é para vocês...

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."

Chico Xavier

RESUMO

A aranha brasileira *Lasiodora* (Mygalomorphae, Theraphosidae), conhecida popularmente como, é amplamente distribuída na região Nordeste do Brasil, na Zona da Mata. Os venenos de Theraphosídeos podem ser uma rica fonte de importantes ferramentas farmacológicas.

O presente estudo realizou a venômica parcial, extração e atividade antimicrobiana do veneno da tarântula brasileira *Lasiodora* sp contra bactérias e fungos patogênicos importantes. Após o processo de extração, um veneno incolor foi obtido sem contaminação de fluidos gástricos. Este mostrou conter uma concentração $\sim 4,53 \pm 0,38$ ug / μ L de proteína e um pH de 5,5. O Perfil eletroforético mostrou uma baixa massa molecular variando de 2 kDa a 10 kDa e uma variedade de faixas com massas moleculares de 30 kDa a 250 kDa. O perfil do veneno por RP-HPLC junto com SDS-PAGE não revelou uma diferença significativa entre venenos de macho e fêmea. Após separação cromatográfica, as frações do veneno, foram digeridas em gel e analisada por espectrometria de massa. Quatro peptídeos, U1-theraphotoxin-Lp1a (Lasitoxin-1), U1-theraphotoxin-Lp1b (Lasitoxin-2) e U3-theraphotoxin-Lsp1a (LTx5) e ω -theraphotoxin-Asp3a, foram identificados. Estes peptídeos mostraram uma elevada homologia com outros peptídeos encontrados em *Lasiodora* sp. e em outros Theraphosídeos. Foram identificadas duas proteínas: PLA₂ e hialuronidase. ω -theraphotoxin-Asp3a, PLA₂ e hialuronidase estão sendo descritas pela primeira vez compondo o veneno de *Lasiodora* sp.

O veneno inibiu o crescimento e matou todos os microrganismos testados, com inibição mínima (MIC), mínima bactericida (CBM) e mínima fungicida (MFC) em concentrações que variam de 3,9 a 500 ug / ml. O veneno de *Lasiodora* sp. pode ser classificado como um agente bactericida (MBC / MIC = 1) contra as bactérias Gram-positivos *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* e a bactéria Gram-negativas *Aeromonas* sp. Além disso, ele pode ser classificado como um agente fungicida contra *Candida parapsilosis* (MFC / MIC = 1) e *Candida albicans* (MFC / MIC = 2). O veneno agiu como um fármaco bacteriostático contra a espécie gram-positiva *Staphylococcus aureus* (MBC / MIC = 64), e bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (MBC / MIC = 8) e *Klebsiella pneumoniae* (MBC / MIC = 16), bem como agente fungistático sobre as leveduras *Candida tropicalis* (MFC / MIC = 16,02) e *Candida krusei* (MFC / MIC = 8). Em conclusão, o veneno de *Lasiodora* sp. foi parcialmente caracterizado e é fonte de agentes antimicrobianos com relevância clínica e o estudo contribui para a caracterização do gênero.

Palavras-chave: *Lasiodora*. Veneno de Aranha. Venômica. Tarântula. Toxina. Extração.

ABSTRACT

The Brazilian spider *Lasiodora* (Mygalomorphae, Theraphosidae), whose trivial names are “caranguejeira” or tarantula, is widely distributed in Northeastern Brazil, in the rainforest. The theraphosid venoms may be a rich source of important pharmacological tools.

In the present study we conducted the partial venomic, extraction and antimicrobial activity against medically important bacteria and fungi from the venom of the Brazilian tarantula *Lasiodora* sp. After extraction process, a colorless venom was obtained without contamination with gastric fluids. This venom showed a contained 4.53 ± 0.38 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of protein and a pH of 5.5. Electrophoretic profile showed a low molecular mass ranging from 2 kDa to 10 kDa and a variety of bands with molecular masses from 30 kDa to 250 kDa. RP-HPLC venom profile together SDS-PAGE did not reveal a difference among male and female venom's. After chromatographic separation fractions of venoms were in gel digestion and analyzed by mass spectrometry. Four peptides, U₁-theraphotoxin-Lp1a (Lasiotoxin-1), U₁-theraphotoxin-Lp1b (Lasiotoxin-2) and U₃-theraphotoxin-Lsp1a (LTx5), ω -theraphotoxin-Asp3a. were identified. These peptides showed a high identity with other peptides found in *Lasiodora* and other Theraphosides. Two proteins were identified: PLA₂ and hyaluronidase. ω -theraphotoxin-Asp3a, PLA₂ and hyaluronidase are describe for first time composing the venom of *Lasiodora* sp.

The venom inhibited the growth and killed all tested microorganisms, with minimal inhibitory (MIC), minimal bactericide (MBC) and minimal fungicide (MFC) concentrations ranging from 3.9 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The *Lasiodora* sp. venom can be classified as a bactericide agent (MBC/MIC = 1) against the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus* and the Gram-negative bacterium *Aeromonas* sp. Also, it can be classified as a fungicide agent on *Candida parapsilosis* (MFC/MIC = 1) and *Candida albicans* (MFC/MIC = 2). The venom acted as a bacteriostatic drug against the Gram-positive species *Staphylococcus aureus* (MBC/MIC = 64), the Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (MBC/MIC = 8) and *Klebsiella pneumoniae* (MBC/MIC = 16) as well as fungistatic agent on the yeasts *Candida tropicalis* (MFC/MIC = 16.02) and *Candida krusei* (MFC/MIC = 8). In conclusion, *Lasiodora* sp. venom was partial characterized and is source of antimicrobial agents with clinical relevance and the study contributes for the characterization of the genus.

Keywords: *Lasiodora*. Spider Venom. Venomic. Tarantula. Toxin. Venom Milking.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – micrograma
µL – microlitro
µm – micrometro
2D – segunda dimensão
ADP – Adenosina difosfato
AMP – Peptídeo Antimicrobiano
AMPs – Peptídeos Antimicrobianos
AP – Acilpoliaminas
Ca²⁺ - íons cálcio
cm – centímetro
DL – Dose letal
ESI – Eletrospray Ionization
h – hora
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance
Hz – Hertz
ICK – Inhibitory Cystine Knot
ICMbio – Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade
ISPVs – Inseticida de veneno de aranha
K⁺ - íons potássia
kDa – kiloDalton
m/z – Massa/carga
MBC – Concentração Mínima Bactericida
MFC – Concentração Mínima Fungicida
MIC – Concentração Mínima Inibitória
min – Minuto
ml - mililitro
mM – micromolar
mm –milímetro
nm – Nanometro
OD – Densidade ótica
pH – potencial de hidrogênio
pI – ponto isoelétrico
RP – Fase reversa
SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Sódio Dodecil Sulfato
SER46 – Serina 46
SNC – Sistema Nervoso Central
TFA – Ácido trifluoroacético
TOF – Tempo de voo
UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
V – Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto e esquema do aparato inoculador de peçonha

21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Algumas espécies de aranhas que tiveram o proteoma e o transcriptoma do seu veneno relatados.

36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 – ARTRÓPODES.....	17
2.2 – ARANHAS	18
2.3 – VENENOS DE ARANHAS	20
2.4 – COMPOSIÇÃO DOS VENENOS DE ARANHAS	22
2.4.1 – COMPONENTES DE BAIXA MASSA MOLECULAR (SAIS E PEQUENOS COMPOSTOS ORGÂNICOS)	22
2.4.2 – PEPTÍDEOS LINEARES.....	23
2.4.3 – PEPTÍDEOS RICOS EM PONTES DISSULFETO.....	25
2.4.4 – COMPONENTES PROTÉICOS DO VENENO	26
2.5 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE VENENOS DE ARANHAS	29
2.5.1 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE VENENOS DE ARANHAS.....	29
2.5.2 – ATIVIDADE INSETICIDA DE VENENOS DE ARANHAS	31
2.5.3 – ATIVIDADE CITOTÓXICA DE VENENOS DE ARANHAS	33
2.6 PROTEÔMICA DE VENENOS.....	34
3. OBJETIVOS	37
3.1. Geral	37
3.2. Específicos	37
4. REFERÊNCIAS	38
5. ARTIGO 1	43
Abstract	44
1. Introduction	45
2. Materials and methods	46
3. Results	48
4. Discussion	49
Acknowledgments	50
6. ARTIGO 2	55
Abstract	57
1. Introduction	58
2. Materials and methods	59

3. Results and discussion	62
Acknowledgments	63
References	64
7. ARTIGO 3	71
Abstract	72
1.Introduction	73
2. Material and Methods	74
3. Results	77
4. Discussion	79
5. Conclusions	81
6. Acknowledgments	82
7. References	83
8. CONCLUSÕES	90

1. INTRODUÇÃO

As aranhas compreendem um grupo de invertebrados terrestres extremamente diverso, sendo encontradas nos mais diferentes nichos ecológicos, com exceção do ar, mar aberto e gelo. Grande parte de seu sucesso adaptativo deve-se aos seus mecanismos de caça: a teia, que facilita a captura eficiente de presas ao custo energético mínimo; e o veneno, cujo objetivo primário é promover uma rápida subjugação da presa, através da paralisação ou morte, servindo ainda como mecanismo de defesa do animal contra predadores (RASH & HODGSON, 2002; KING & HARDY, 2013; SANGGAARD ET AL., 2014).

Os venenos são misturas complexas de compostos como: sais, moléculas de baixa massa molecular, como as acilpoliaminas (AP), aminoácidos, nucleotídeos, peptídeos tóxicos, proteínas sendo algumas neurotoxinas, enzimas, ou antimicrobianos (VASSILEVSKI, ET AL, 2009; GOMEZ ET AL, 2013; MOURÃO ET AL, 2013; UNDHEIM ET AL, 2013). Esses diferentes compostos do veneno trabalham sinergicamente, promovendo uma eficiência da ação da mistura. A composição dos venenos é espécie-específica e depende de fatores como: sexo, idade, nutrição, habitat e clima (VASSILEVSKI, ET AL, 2009). Uma vez que parte dos componentes do veneno tem natureza protéica, o veneno pode ser estudado de modo global utilizando técnicas proteômicas. (CALVETE, 2013).

O termo proteoma refere-se a um conjunto de proteínas em funcionamento de um dado ser vivo, tecido, célula ou fluido biológico incluindo as suas modificações, num determinado momento em uma condição precisa. A proteômica caracteriza-se por ser um estudo sobre um proteoma específico, incluindo informações sobre a abundância de proteínas, suas variações, modificações, funções e interações moleculares em um determinado organismo (NELSON & COX, 2011). A pesquisa utilizando a proteômica como ferramenta tem como objetivo principal realizar uma ponte entre a presença de certas proteínas e a biologia do organismo. A abordagem direcionada para venenos animais é chamada de venômica (CALVETE, 2013).

A *Lasiadora* sp é uma caranguejeira encontrada no Nordeste do Brasil, principalmente em áreas de Mata Atlântica. Estudos demonstraram que o veneno bruto de *Lasiadora* sp., possui atividade sobre canais de Na^+ , Ca^{2+} e corações isolados de ratos. Três toxinas foram clonadas: Lasiotoxina 1 (LTx1), Lasiotoxina 2 (LTx2) e Lasiotoxina 3 (LTx3), sendo que LTx2 foi caracterizada como uma neurotoxina agindo sobre canais de cálcio (KUSHMERICK ET AL., 2001; KALAPOTHAKIS ET AL., 2003; VIEIRA, ET AL., 2004; DUTRA, ET AL.,

2008). No entanto, pouco ainda se conhece sobre outros componentes do veneno. Assim, um estudo mais amplo sobre a composição da peçonha deste animal faz-se necessário.

O estudo sobre a composição de venenos têm fornecido um leque de ferramentas experimentais inestimáveis para decifrar mecanismos moleculares e seus detalhes funcionais, neste sentido, o veneno de *Lasiadora* sp. mostra-se bastante promissor na descoberta de novas moléculas e atividades biológicas ainda não demonstradas para este veneno, visando futuras aplicações biotecnológicas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 – ARTRÓPODES

Do ponto de vista adaptativo, os animais mais bem sucedidos do planeta são os artrópodes. Sua distribuição na natureza abrange praticamente todos os habitats, sendo encontrados em nichos ecológicos diversificados, apresentando, assim, uma incrível diversidade de tamanhos, formas e comportamentos, sendo desta maneira o maior agrupamento de espécies do Reino Animal (WINDLEY ET AL., 2012). Os artrópodes vão de microscópicos crustáceos como o *Polycopetta quadrispinata*, (TANAKA & TSUKAGOSHI, 2013) a grandes aranhas, como a caranguejeira da espécie *Theraphosa blondi* que habita as florestas tropicais.

O nome do grupo tem origem grega: *arthros* = articulação, *podos* = pés. A característica marcante deste filo é a particularidade da presença de apêndices articulados, que formam estruturas especializadas tais como: antenas, asas, pernas, peças bucais e órgãos reprodutivos, promovendo, assim, a adaptação requerida do ambiente. Esses animais invertebrados têm corpos segmentados e apresentam vários padrões de fusão desses segmentos para formar unidades integradas, tais como cabeças, tórax e abdômen. Eles apresentam um exoesqueleto composto por uma cutícula rígida, feita em grande parte da quitina e proteínas, que pode ou não ser ainda mais endurecido com carbonato de cálcio (BELEBONI ET AL., 2004). Estes podem ainda apresentar capacidade de metamorfose, quimiocomunicação e produção de toxinas (BELEBONI ET AL., 2004).

Os artrópodes são tradicionalmente divididos em quatro classes: Trilobita, animais pré-históricos e já extintos; Chelicerata, que tem como principais representantes aranhas e escorpiões; Crustacea que tem uma ampla gama de representantes tais como lagostas, camarões e caranguejos; e Uniramia que são representados principalmente pelos insetos.

Duas dessas classes merecem destaque devido a sua importância junto aos humanos: Chelicerata e Uniramia. Ambos os grupos figuram de forma próxima e íntima ao homem devido aos impactos médicos e econômicos que podem causar (WINDLEY ET AL., 2012).

Os Chelicerata são geralmente conhecidos como aracnídeos, no qual o grupo de destaque é o das aranhas (ordem Araneae), animais de importância médica e ecológica que surgiram provavelmente no período Devoniano há aproximadamente 400 milhões de anos atrás. As aranhas estão distribuídas em praticamente todo o planeta habitando todos os ecossistemas, com exceção do ar, gelo e mar aberto (FOELIX, 1996; HERNÁNDEZ ET AL., 2011).

2.2 – ARANHAS

As aranhas variam desde pequenas espécies com menos de 0,5 mm de comprimento até as grandes aranhas tropicais chamadas de caranguejeiras, com o comprimento corporal de 9 cm (FOELIX, 1996). Excluindo os insetos, que são suas presas primárias, as aranhas constituem o maior e mais diverso grupo de invertebrados terrestres (RASH & HODGSON, 2002). São exclusivamente predadoras, figurando desta forma entre os maiores grupos de artrópodes predadores dominantes da maioria dos ecossistemas terrestres.

Ao contrário da percepção popular, de que aranhas são “seres medonhos de coloração negra e peludas”, estes animais apresentam uma variada gama de formas e cores. São conhecidas aranhas capazes de mimetizar formigas, besouros, vespas, gastrópodes, moscas e partes de vegetação como galhos (KING, 2004). Atualmente, há 45.321 espécies descritas distribuídas em 114 famílias e 3.956 gêneros (WORLD SPIDER CATALOG, 2015), onde se acredita que a estimativa real do número de espécies esteja entre 76.000 à 170.000 (HORMIGA & GRISWOLD, 2014).

Morfologicamente, o corpo de uma aranha consiste de duas partes principais: uma porção anterior, o prossoma ou cefalotórax, e uma parte posterior, o opistossoma ou abdome, que são conectadas por uma estrutura delicada, o pedicelo .

O cefalotórax suporta quatro pares de pernas, um par de quelíceras em frente à boca e um par de pedipalpos localizados entre a quelícera e o primeiro par de pernas. Nos machos, esses pedipalpos são modificados na sua extremidade em órgãos copuladores. As quelíceras estão ligadas às glândulas de veneno. Ainda no prossoma são encontrados os olhos, que podem ser em número de dois, seis ou oito, e são de extrema importância para taxonomia do grupo. O abdome por sua vez abriga os sistemas respiratório, circulatório, digestivo e reprodutor (FOELIX, 1996).

Atualmente as aranhas são distribuídas nas sub-ordens Opisthothelae e Mesothelae (CODDINGTON & LEVI, 1991). Os Mesothelae são constituídos por uma única família, a Liphistiidae, com aranhas asiáticas que conservam vários caracteres plesiomórficos, como a segmentação externa do abdome, oito fiandeiras ventrais medianas, quelíceras paraxiais e quatro aberturas respiratórias denominadas pulmões foliáceos (CODDINGTON & LEVI, 1991; FOELIX, 1996).

Já os representantes da subordem Opisthothelae apresentam pouco ou nenhuma evidência de opistossoma segmentado e as fiandeiras se localizam mais posteriormente que nos mesothelideos. Essa sub-ordem é dividida em duas infra-ordens, Mygalomorphae e

Araneomorphae, que são denominadas aranhas primitivas e modernas respectivamente (CODDINGTON & LEVI, 1991; FOELIX, 1996). As araneomorfos compreendem cerca de 90% de todas as aranhas (FOELIX, 1996) e possuem as quelíceras perpendiculares ao eixo do corpo, movimentando-as de dentro para fora. As migalomorfos compreendem as aranhas conhecidas popularmente como caranguejeiras ou na comunidade internacional como tarântulas. Estas são caracterizadas por suas quelíceras paraxiais que estão situadas paralelamente ao corpo e se movem de cima para baixo (FOELIX, 1996).

As caranguejeiras são encontradas em todo o globo, embora haja uma tendência a serem representadas principalmente em habitats de áreas tropicais e semi-tropicais. Sua distribuição ecológica é ampla e inclui áreas secas, úmidas, savanas, desertos, florestas tropicais ou habitats semi-temperados (ESCOUBAS & RASH, 2004). Esta diversidade de nichos que habitam, associados ao comportamento de predação, está fortemente correlacionada com a diversidade de seus venenos (ESCOUBAS & RASH, 2004). Assim como outras aranhas são predadoras e alimentam-se de uma variedade de vertebrados e invertebrados. Esta habilidade de capturar presas grandes e fortes, sem ajuda de dispositivos como a teia, implica não apenas em certa força física, mas também em uma alta eficiência do veneno, que atua rapidamente e irreversivelmente no sistema nervoso central e periférico da presa (ESCOUBAS & RASH, 2004).

Com exceção da família Uloboridae e Holarachaeidae, que não possuem peçonha, todas as aranhas possuem um par de glândulas de veneno. Esse é injetado em suas presas que subsequentemente são paralisadas ou mortas, possibilitando desta forma que o animal se alimente ou escape de possíveis predadores (NENTWIG & KUHN-NENTWIG, 2013). Dada a idade evolutiva das aranhas como grupo e mudanças mínimas na sua morfologia através do tempo; é possível que o uso do veneno por estes animais tenha ocorrido muito cedo durante sua evolução (RASH & HODGSON, 2002).

Muitas aranhas adaptaram-se a viver próximas ou associadas diretamente com o homem, devido ao habitat em comum e facilidade de obter comida, tais como insetos que são atraídos pela presença humana. A maioria das aranhas não são agressivas e geralmente são inofensivas ao homem. Entretanto algumas espécies são responsáveis por mordidas dolorosas, como animais do gênero *Phoneutria* e até mesmo fatais como do gênero *Latrodectus*. Quando a mordida ocorre, elas são geralmente acidentais ou por defesa, desta forma instalando-se um quadro de envenenamento aracnídico (RASH & HODGSON, 2002).

2.3 – VENENOS DE ARANHAS

O termo veneno pode ser amplamente definido como uma secreção produzida por uma glândula especializada, na qual haja moléculas que perturbem a fisiologia ou processos bioquímicos, de modo a facilitar a alimentação ou defender o animal. Quando estes animais possuem aparatos especializados, tais como dentes e ferrões, que injetam o veneno de forma eficiente em seus alvos, estes são chamados peçonhentos. Aranhas são animais peçonhentos de grande sucesso evolutivo, fato observado pelos diversos ambientes terrestres onde são encontradas. O objetivo primário do veneno é promover uma rápida subjugação da presa, através da paralisação ou morte, desempenhando em alguns casos papel na pré-digestão da refeição, e servindo ainda como mecanismo de defesa do animal contra predadores (RASH & HODGSON, 2002; CASEWELL ET AL., 2013; KING & HARDY, 2013).

Os venenos são misturas complexas de compostos biologicamente ativos de diferente natureza química, entre eles: sais, moléculas de baixa massa molecular, como as acilpoliaminas (AP); peptídeos tóxicos, neurotoxinas, enzimas, aminoácidos, nucleotídeos, proteínas e antimicrobianos (VASSILEVSKI, ET AL., 2009; GOMEZ ET AL., 2013; MOURÃO ET AL., 2013; UNDHEIM ET AL., 2013). Esses diferentes compostos do veneno trabalham sinergicamente, promovendo uma eficiência da ação da mistura. A composição dos venenos é altamente espécie-específica e depende de fatores como: sexo, idade, nutrição, habitat e clima (VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

Um par de glândulas de veneno, que ficam localizadas dentro do segmento basal das quelíceras, é responsável pela produção do veneno. Um ducto originado de cada uma das glândulas conduz a uma pequena abertura na ponta das suas respectivas quelíceras. A compressão de músculos que circundam cada uma dessas glândulas, força o veneno através do ducto até a abertura na ponta da quelícera. Devido a essas características, o aparato inoculador de veneno destes animais funciona como uma agulha hipodérmica pressurizada, capaz de injetar doses controladas de microlitros de veneno em suas presas (Figura 1) (KING & HARDY, 2013).

A diversidade de nichos ecológicos associados ao comportamento predatório das aranhas ao longo da evolução favoreceu o recrutamento de componentes do veneno que incapacitam rapidamente o sistema nervoso de suas presas, permitindo que até mesmo presas de grande porte, em relação à aranha, possam ser rapidamente imobilizadas sem perigo para o animal (KING & HARDY, 2013).

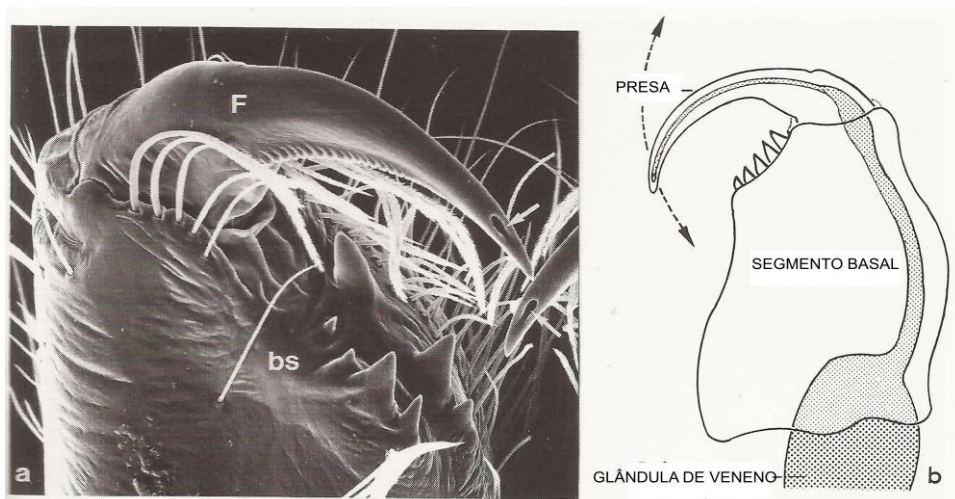


Figura 1. Foto e esquema do aparato inoculador de peçonha. a - dente móvel da quelícera (F) e segmento basal (bs). As setas indicam por onde o veneno sai. b – desenho esquemático da quelícera. As setas indicam o possível movimento do dente móvel da quelícera. Fonte: adaptado FOELIX (1996).

A habilidade de capturar presas relativamente maiores e mais fortes é ainda mais evidente nas aranhas caranguejeiras, pois essas não caçam utilizando a teia, o que implica não somente a força física do animal durante a caçada, mas também um alto grau de eficiência do envenenamento de sua presa (ESCOUBAS & RASH, 2004).

Analizando estas características, o estudo aprofundado do veneno fornece modelos inigualáveis para melhor compreensão das relações entre predadores e presas, da influência da seleção natural, evolução molecular e funcionalização das proteínas do mesmo (CASEWELL ET AL., 2013).

Vassileski et al (2009) citam em sua revisão que venenos de aranhas são fontes de substâncias que afetam diferentes sistemas de transporte da membrana celular, tais como canais iônicos e receptores. Estas substâncias são instrumentos indispensáveis em estudos de sistemas de membrana e são usados amplamente em estudos de neurobiologia moderna. Devido ao grande número de espécies de aranhas e a composição complexa de seus venenos, moduladores específicos de praticamente qualquer sistema de transporte de membrana podem ser encontrados não só para utilização como ferramentas em investigações fundamentais, mas também no tratamento de doenças.

Analisando essas características, é possível afirmar que há uma extrema diversidade molecular nos venenos de aranhas, que dessa forma tornam-se uma rica fonte de bioprospecção.

2.4 – COMPOSIÇÃO DOS VENENOS DE ARANHAS

Dois grandes grupos de venenos de aranhas são distinguidos pelas suas características de ação: neurotóxico e necrótico (ação citolítica), embora esses efeitos possam ser exibidos simultaneamente (VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

Estes venenos incluem substâncias de diferentes naturezas químicas que podem ser divididas em três grupos pela sua massa molecular: I – substâncias de baixa massa molecular (<1kDa) de várias estruturas; II – peptídeos (1 – 10kDa), com duas principais estruturas funcionais; sendo distinguidas neste neurotoxinas contendo grupos dissulfeto e peptídeos citolíticos lineares; III – substâncias de alta massa molecular (>10kDa), diferentes proteínas, incluindo enzimas e neurotoxinas (VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

A complexidade química dos venenos de aranha é extraordinária, variando de sais a grandes neurotoxinas pré-sinápticas como as encontradas no veneno da viúva-negra (*Latrodectus* spp.). Estes compostos de veneno podem ser amplamente agrupados em cinco classes com base na sua estrutura química e mecanismo de ação (KING & HARDY, 2013).

2.4.1 – COMPONENTES DE BAIXA MASSA MOLECULAR (SAIS E PEQUENOS COMPOSTOS ORGÂNICOS)

Compostos de baixa massa molecular de diferentes classes de substâncias orgânicas e inorgânicas são achados em venenos de aranha, tais como: sais, carboidratos, aminoácidos, aminas biogênicas, acilpoliaminas. Os poucos dados disponíveis sobre a composição iônica de venenos de aranha indicam que há uma baixa concentração de Na^+ (~10mM), Ca^{2+} (~1mM) e uma alta concentração de K^+ (70-200mM). A alta concentração de íons K^+ pode contribuir para toxicidade do veneno, pois nesta concentração eles são capazes de causar paralisia da vítima devido à despolarização das fibras axonais na proximidade do local de injeção veneno (VASSILEVSKI, ET AL., 2009; KING & HARDY, 2013). Juntamente com os íons K^+ , foi observado um sinergismo com peptídeos neurotóxicos, que se ligam a canais iônicos alvo, desta forma potencializando o efeito da peçonha sobre o organismo.

Uma grande variedade de pequenos compostos orgânicos (<1 kDa) são encontrados nos venenos de aranha, incluindo aminoácidos (GABA, glutamato, e taurina), acilpoliaminas, aminas biogênicas (histamina e octopamina), neurotransmissores (acetilcolina), nucleosídeos (adenosina), e nucleotídeos (ATP) (KING & HARDY, 2013).

Aminas biogênicas, como a histamina, e aminoácidos, como o glutamato e taurina são conhecidos como neuromediadores ou neuromoduladores no sistema nervoso dos insetos. A função desses compostos no veneno é exatamente promover um desequilíbrio fisiológico celular. Em alguns casos há sinergismo entre a ação de neurotoxinas com estes compostos, cujo efeito é, provavelmente, semelhante a aquele observado com os íons de potássio, que é promover a paralisia da presa. Algumas aminas são conhecidas por causarem dor; o que pode ser à base da ação protetora do veneno contra predadores. Estas moléculas também aumentam a permeabilidade e fluxo sanguíneo local, desta forma contribuindo para o espalhamento de diferentes toxinas do veneno pelo corpo da vítima (VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

As acilpoliaminas são toxinas de baixa massa molecular (<1kDa) que aparentam estar especificamente envolvidas em provocar uma rápida paralisação, pois são bloqueadores específicos de canais iônicos e receptores. Na sua estrutura, são complexas, compostas por uma cadeia de poliamina, com um amino primário ou um grupo guanidina de um lado, e de um anel aromático do outro. Interagem com múltiplos alvos no sistema nervoso central (SNC) e periférico de insetos e também no SNC de mamíferos (MOURÃO, ET AL., 2013).

Argiopina, molécula encontrada no veneno da aranha *Argiope lobata* foi o primeiro membro descoberto da classe das acilpoliaminas de venenos de aranha em experimentos tendo como modelo experimental larvas de moscas e rãs, e em concentrações de aproximadamente 10^{-8} – 10^{-6} demonstraram bloquear canais iônicos ativados por glutamato (VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

2.4.2 – PEPTÍDEOS LINEARES

Peptídeos lineares são definidos como moléculas semelhantes a proteínas, que compõem-se de polímeros de aminoácidos e que são menores que 10 kDa, livres de pontes dissulfeto e são os componentes dominantes da maioria dos venenos de aranha e a fonte primária da sua diversidade farmacológica (VASSILEVSKI ET AL., 2009; KING & HARDY, 2013).

Como citado por Hormiga & Griswold (2014), há uma estimativa de que o número de espécies de aranhas esteja entre 76.000 à 170.000, sendo os peptídeos moléculas bastante

frequentes na peçonha desses animais. Segundo Saez *et al.* (2010) e King & Hardy (2013), venenos de aranhas podem conter até 20 milhões de peptídeos bioativos com base em uma estimativa conservadora de 200 peptídeos únicos por veneno e 100.000 espécies existentes. Esta incrível diversidade química é uma das razões por que os venenos de aranhas são amplamente utilizados como fontes naturais em programas de descoberta de drogas.

A maioria dos estudos com venenos revelaram uma distribuição bimodal de massas peptídicas. A maioria dos peptídeos do veneno da aranha tem uma massa de 3,0 a 4,5 kDa (compostas por 25 a 40 resíduos de aminoácidos), entretanto, há uma fração significativa com uma massa de 6,5 e 8,5 kDa (composto entre 58 e 76 resíduos) (KING & HARDY, 2013).

Esses peptídeos são reconhecidos pelas seguintes características: são curtos, com exceção das M-zodatoxinas (cito-insectotoxinas) isoladas da aranha *Lachesana tarabaei*, são altamente catiônicos (pI ~10-11), anfipáticos e com afinidade por bicamadas lipídicas. Quando em solução aquosa, apresentam um arcabouço desordenado, adotando a conformação de α -hélice na presença de membranas contendo lipídeos negativamente carregados (VASSILEVSKI, ET AL., 2009; KING & HARDY, 2013).

Devido às características particulares já citadas desses peptídeos, em especial a sua afinidade por bicamadas lipídicas, as membranas citoplasmáticas servem como alvo para a ação destes. Devido à diferença de cargas entre o peptídeo e a membrana, há o favorecimento para a ligação eletrostática desta molécula à superfície da bicamada. Isto permite que os peptídeos incorporem-se na bicamada, dessa forma realizando uma perturbação da integridade da membrana celular e conseqüentemente ocorrendo a morte celular, sendo estas moléculas denominadas peptídeos citolíticos (VASSILEVSKI, ET AL., 2009; KING & HARDY, 2013). Estes peptídeos entretanto são relatados apenas em araneomorfos ou aranhas modernas e não foram relatados a partir dos venenos de caranguejeiras. Não é sabido se esta ausência é devido à amostragem taxonômica limitada de venenos ou se esses peptídeos são uma inovação específica e evolutiva das araneomorfos (KING & HARDY, 2013).

Há uma série de propostas para a função biológica desses peptídeos nos venenos de aranhas. O objetivo primário dessas moléculas parece ser a abertura de uma via de facilitação para ação de outras toxinas presentes no veneno, como as neurotoxinas, desta forma destacando o sinergismo com que essas moléculas trabalham. Isto é alcançado através da destruição de barreiras anatômicas, dissipação de gradiente dos íons trans membrana e perturbação do potencial de membrana (VASSILEVSKI, ET AL., 2009; KING & HARDY, 2013). A base molecular de sinergismo entre peptídeos e neurotoxinas não é clara; é proposto que estes sirvam como "guias", ou "fatores de difusão" para neurotoxinas, devido às suas

propriedades citolíticas e desta forma sinalizam o caminho para os neurônios através das barreiras celulares protetoras (VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

Outras funções citadas para presença desses peptídeos em venenos estão ligadas a natureza antimicrobiana que os mesmos podem adotar. Pelo fato de desestabilizar a membrana, muitos desses peptídeos são conferidos como antimicrobianos. Sendo assim outra função dessas moléculas, seria a de promover assepsia, da forma que, como as aranhas alimentam-se de artrópodes, que em algumas ocasiões, provêm de ambientes extremamente contaminados por bactérias e fungos, a mesma não se contamine ao se alimentar com sua presa (VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

Por fim, essas moléculas com suas propriedades antimicrobianas parecem também desempenhar um importante papel fisiológico diretamente para o animal. Este seria a proteção das glândulas de veneno contra infecções. O fato dessa proteção é de vital importância, já que o grande sucesso evolutivo e ecológico das aranhas, esta diretamente ligado ao seu veneno (SAEZ ET AL., 2010).

2.4.3 – PEPTÍDEOS RICOS EM PONTES DISSULFETO

Entre os compostos dominantes em venenos de aranha, além dos peptídeos lineares, destacamos os peptídeos ricos em pontes dissulfeto. Apenas alguns venenos de aranha atípicos desafiam esse paradigma, como observado em estudos com a aranha viúva-negra (*Latrodectus* spp.), que contém uma grande proporção de grandes moléculas como neurotoxinas pré-sinápticas (ROHOU ET AL., 2007). Por exemplo, na aranha *Tegenaria agrestis*, nucleosídeos sulfatados constituem aproximadamente 50% do peso seco do veneno (KUHN-NENTWING ET AL., 2011). No entanto, mesmo os venenos de aranhas da família Sicariidae, a qual um dos principais representantes é a aranha-marrom (*Loxosceles* sp), que são bastantes conhecidas para conter esfingomielisanes e causarem lesões dermonecroticas em seres humanos, são ricamente preenchidos com peptídeos ricos em pontes dissulfeto (KING & HARDY, 2013).

As neurotoxinas são uma das classes de moléculas que incluem estes peptídeos. Tem como forte característica o poder de atuar sobre seus alvos em concentrações na faixa de nanomolar e grande especificidade, agindo diretamente em um sítio de ação específico, tais como: canais iônicos pré-sinápticos ou pós-sinápticos e junções neuromusculares periféricas. No entanto, o efeito global induzido por estas neurotoxinas é complexo e envolve grupos de toxinas que agem em diferentes momentos e em diferentes locais anatômicos, seguindo o envenenamento. Observando a especificidade de neurotoxinas, em termos de atividade

inseticida, estas são tipicamente, pelo menos, dez vezes mais potentes do que a maioria das toxinas oriundas de peptídeos lineares e que tem características citolíticas (VASSILEVSKI, ET AL., 2009; KING & HARDY, 2013).

O banco de dados de toxinas de aranhas, Arachnoserver, conta atualmente com 1.464 toxinas cadastradas, de 92 espécies, onde a maioria de suas moléculas são peptídeos (ver <http://www.arachnoserver.org/>). Durante pesquisas recentes com venenos de aranhas, notou-se que estes são bem mais complexos do que se imaginava, com alguns venenos contendo que de 1.000 peptídeos distintos (WINDLEY ET AL., 2012). No entanto, o nosso conhecimento sobre a diversidade de peptídeos provenientes desses venenos é rudimentar, com menos do que 0,01% destes tendo sido isolados e estudados (SAEZ ET AL., 2010; WINDLEY ET AL., 2012).

Embora apenas um pequeno número dessas moléculas do veneno tenha sido caracterizadas farmacologicamente, a gama de atividades biológicas conhecidas é impressionante. Em adição aos efeitos neurotóxicos bem conhecidos, são descritos efeitos antimicrobianos, analgésicos, antiparasitários, citolítico, hemolítico, antiarrítmico, atividade inibidora de enzimas e antitumoral (SAEZ ET AL., 2010).

A variabilidade de alvos de peptídeos de venenos de aranha não é restrito aos sistemas de transporte iônicos. O peptídeo “lectina-like” Huwenlectin-1 (SHPL-I), que causa a aglutinação de eritrócitos, foi isolado a partir do veneno de *Haplopelma schmidtii*. Dois peptídeos psalmopeotoxinas I e II isolados do veneno da aranha *Psalmopoeus cambridgei*, exibiram propriedades anti-malária (VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

Desta forma, peptídeos provenientes de toxinas de venenos de aranha, apresentam-se como ferramentas inestimáveis para estudos fisiológicos e farmacológicos, tendo um importante papel no entendimento de vários processos bioquímicos no corpo e de futuros medicamentos que possam vir a ser desenvolvidos com bases nestes.

2.4.4 – COMPONENTES PROTÉICOS DO VENENO

Assim como os peptídeos, que se compõem de polímeros de aminoácidos, as proteínas apresentam uma forma molecular bastante semelhante. O ponto onde essas duas moléculas divergem refere-se ao tamanho, onde proteínas ou polipeptídeos são maiores que 10 kDa, e como estas organizam-se no espaço e interagem com outras moléculas (VASSILEVSKI, ET AL., 2009)..

As proteínas são moléculas dinâmicas cujas funções dependem de modo quase invariável de interações com outros compostos, e estas interações são afetadas de forma

fisiológica importante, por mudanças sutis ou súbitas na sua conformação e/ou associação a estes compostos. Várias proteínas são normalmente encontradas no veneno, no entanto, frente a essa diversidade, poucas aranhas foram estudadas utilizando-se de técnicas específicas como a proteômica e a genômica (VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

Entre as proteínas de veneno para as quais foram encontradas sequências homologas no banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>), estão várias enzimas, proteínas de transporte, reguladoras e estruturais, sendo algumas dessas caracterizadas pela localização e realizações de certas funções intracelulares. O aparecimento dessas proteínas no veneno pode estar associado com a particularidade da sua secreção a partir da glândula, ora sendo holócrinas, onde as células que produzem a secreção acumulam o material no citoplasma e em seguida se desintegram (desta forma fazendo parte da constituição do próprio produto secretado) ou apócrinas, onde a célula produtora da secreção elimina parte do citoplasma junto com o material excretado. Há também a possibilidade de contaminação do veneno com fluidos gástricos do animal, durante a coleta para pesquisa (VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

A função dessas proteínas “celulares” no veneno ainda não é muito bem compreendida. À maioria destas proteínas não pode ser atribuída certas funções ou não há sequências homólogas. No entanto, esta lacuna pode ser devido à sensibilidade das técnicas de identificação atuais (VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

Dentre as proteínas dos venenos de aranhas, as enzimas são uns dos componentes mais importantes e comuns, apresentando um amplo espectro de atividades (RASH & HODGSON, 2002). Um número de enzimas, incluindo a collagenase, hialuronidase, fosfolipase A₂, e várias proteases, encontram-se presentes nos venenos de aranhas. Tem sido proposto que a sua principal função no veneno seja de degradar a matriz extracelular (collagenase, hialuronidase, proteases) e a membrana plasmática (fosfolipase A₂). Durante o envenenamento da presa, essas enzimas são fatores de espalhamento de toxinas, porque facilitam a difusão para os tecidos facilitando a propagação de peptídeos neurotóxicos (KING & HARDY, 2013).

Dentre as enzimas mais amplamente estudadas, está a hialuronidase. A hialuronidase é uma enzima envolvida na degradação de glicosaminoglicanos (hialuronato, sulfato de condroitina A, B e C) (CLEMENT ET AL., 2012). O hialuronato ou ácido hialurônico é um polissacarídeo de elevado peso molecular encontrado na matriz extracelular. A hialuronidase por si só não apresenta toxicidade, mas em venenos torna-se fator de espalhamento para as toxinas, porque facilita a difusão para os tecidos da presa (PESSINI, ET AL., 2001), sendo também atribuída a esta molécula um potencial alergênico, o que poderia contribuir no veneno como uma arma de defesa (KING & HARDY, 2013; SUTTI ET AL., 2014).

Entre os Theraphosideos, o primeiro relato de hialuronidase, foi feito para caranguejeira *Dugesia hentzi*, quando foi identificado que esta molécula era o principal componente do veneno (SCHANBACHER ET AL., 1973). Mais recentemente outros representantes deste grupo como a *Brachypelma vagans* e *Vitalius dubius* tiveram hialuronidasas estudadas e caracterizadas (CLEMENT ET AL, 2012; SUTTI ET AL, 2014), corroborando a importância desta enzima como fator contribuinte no envenenamento.

Outras enzimas presentes em venenos são as proteases, que são, de forma geral, moléculas capazes de clivar ou modificar ligações peptídicas, tendo importância vital no veneno para sua toxicidade. A presença da enzima peptidil-isomerase no veneno de *Agelenopsis aperta*, é um exemplo claro. Esta enzima catalisa o passo final da biossíntese da ω – Agatoxina IVB, mudando a quiralidade da Ser46 desta molécula, tornando-a ativa. A agatoxina é um potente bloqueador de canais de cálcio tipo – P, não apresentando esta propriedade para canais de cálcio tipo -T, -L,-N, tornando-a uma potente ferramenta molecular nos estudos de canais tipo P. Essa especificidade parece estar intimamente ligada com sua conformação molecular adquirida após a ação da peptidil-isomerase (ADAMS ET AL., 1993; HECK ET AL., 1994; VASSILEVSKI, ET AL., 2009). Essas funções auxiliares, como a da peptidil-isomerase, que torna a ω -Agatoxina IVB inativa em ativa são as tarefas mais frequentemente atribuídas aos componentes protéicos da maioria dos venenos de aranha. Entretanto, aranhas do gênero *Loxosceles* (família Sicariidae), conhecidas como aranha-marrom e gênero *Lactrodectus* (família Theridiidae), conhecidas como viúva-negra, tem composições proteicas bem particulares em seus venenos (RASH & HODGSON, 2002; VASSILEVSKI, ET AL., 2009; KING & HARDY, 2013).

As aranhas-marrom contém em seu veneno um grande número de diversas enzimas diferentes: fosfatases, hialuronidasas, fosfolipases e proteases. Este conjunto de moléculas presentes no veneno confere uma característica necrótica ao mesmo. Em aspectos bioquímicos, as proteínas presentes no veneno da aranha-marrom melhor estudadas são: fosfolipases D (esfingomielinase D), que apresentam atividades contra esfingomielina, fosfolípido presente na membrana celular de hemácias; metalo-proteases com atividades fibrinogenolítica, fibronectinolítica e gelatinolítica e serino-proteases com atividade gelatinolítica, que estão na forma de zimogênios e podem ser ativadas por proteases do tecido e podem atuar sinergicamente com outros componentes do veneno induzindo a necrose (RASH & HODGSON, 2002; VASSILEVSKI, ET AL., 2009).

O veneno da aranha viúva-negra (*Lactrodectus* sp.), caracteriza-se principalmente por sua ação neurotóxica. As proteínas que compõem a peçonha são de elevado peso molecular;

conhecidas como latrotoxinas. Estas grandes moléculas exibem massa entre 110 kDa a 140 kDa e arquitetura peculiar, pois têm notavelmente seletividade por filos. *Latrodectus tredecimguttatus*, uma espécie que ocorre na Europa, contém uma α -latrotoxina específica de vertebrado, uma α -latrocrustatoxina específica de crustáceos, e algumas inseto-específicas α -, β -, γ -, δ -, e ε - latroinsetotoxinas (KING & HARDY, 2013).

A α -latrotoxina é a molécula mais bem estudada no veneno do gênero *Latrodectus* por ser bastante ativa em vertebrados. Pensa-se ser o componente principal responsável pelos efeitos potencialmente fatais de envenenamento. A α -latrotoxina liga-se a receptores específicos dos neurônios pré-sinápticos, o que lhe permite posteriormente se inserir na membrana destes para formar um canal de cátions não seletivo. Isto causa uma exocitose maciça das vesículas sinápticas por um complexo conjunto de vias cálcio-dependente e independente, que ainda não foram completamente elucidadas, resultando no bloqueio da transmissão do sinal nervoso (VASSILEVSKI, ET AL., 2009; SAEZ ET AL., 2010; KING & HARDY, 2013).

2.5 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE VENENOS DE ARANHAS

Visto que os venenos de aranhas são misturas complexas de moléculas, tendo em sua composição peptídeos e proteínas principalmente, estes apresentam potencial de alta afinidade e seletividade ideal para a descoberta de novas moléculas bioativas.

Nas duas últimas décadas, tem havido um aumento em projetos de exploração da extraordinária diversidade biológica e potência dos componentes do veneno para desenvolver novas drogas, diagnósticos para doenças humanas e sondas para o estudo de células, receptores ou vias fisiológicas (CASEWELL ET AL., 2013).

Dentre as atividades biológicas promissoras, destacamos as atividades antimicrobiana, inseticida e citotóxica.

2.5.1 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE VENENOS DE ARANHAS

No início do século XX, patologias em decorrência de microrganismos eram um sério problema de saúde pública. Com a introdução dos antibióticos na década de 1930 e 1940, houve finalmente um controle mais eficaz dessas doenças, sendo os agentes antimicrobianos em grande parte, responsáveis pela dramática queda na taxa de mortalidade por doenças transmissíveis nos países desenvolvidos. No entanto, microrganismos são notavelmente proficientes na adaptação ao estresse ambiental, e desde então vem evoluído desenvolvendo mecanismos de resistência (SAEZ ET AL., 2010).

O recente surgimento generalizado de resistência a antibióticos em bactérias patogênicas clinicamente importantes como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, e *Enterococcus faecalis*, combinado com uma diminuição drástica na taxa de desenvolvimento de novos antibióticos, vem tornando-se um sério problema (SAEZ ET AL., 2010). Sendo detectado isto, tornou-se evidente uma necessidade urgente de desenvolver novos agentes antimicrobianos com novos mecanismos de ação.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são parte integrante de qualquer organismo, e desempenham um papel de armas ofensivas e defensivas naturais. Atualmente são conhecidas várias centenas ou mesmo milhares de AMPs de plantas e animais de diferentes classes. Estes peptídeos são produzidos por diversas células e tecidos e geralmente resultam da transformação de precursores maiores (LAZAREV ET AL., 2013).

Devido à sua seletividade para membranas de procariotos e seu mecanismo de promover a ruptura da mesma, associado a pouca resistência natural dos microrganismos, o centro das atenções nos últimos anos tem se voltado para o desenvolvimento de novos antibióticos a partir desses peptídeos (HARRISON ET AL., 2014).

Peptídeos antimicrobianos são considerados como potenciais novos agentes antibacterianos, antifúngicos, e até mesmo remédios antivirais. Algumas vantagens dos AMPs sobre os antibióticos convencionais são: um amplo espectro de ação, limitada probabilidade de induzir resistência do patógeno, e possibilidade de produzir análogos de peptídeos naturais com propriedades biológicas modificadas via síntese química ou biológica (LAZAREV ET AL., 2013).

A capacidade limitada dos AMPs para induzir resistência bacteriana é explicada pelo seu mecanismo de ação, que implica na desestabilização da membrana celular do microrganismo. No entanto, AMPs são frequentemente caracterizados por possuírem atividade citotóxica pronunciada contra células eucarióticas, incluindo as dos mamíferos. Em combinação com os altos custos de produção, este é o principal fator limitante da aplicação AMPs na prática médica, ainda (LAZAREV ET AL., 2013).

Os peptídeos são os componentes dominantes da maioria dos venenos de aranha e a fonte primária da sua diversidade farmacológica e potencial biotecnológico (KING & HARDY, 2013). Estes podem ser divididos em dois grandes grupos: peptídeos citolíticos lineares e peptídeos ricos em pontes dissulfeto, ambos promovendo atividade antimicrobiana (LAZAREV ET AL., 2013).

Os peptídeos citolíticos lineares são geralmente anfipáticos e apresentam-se estruturalmente desordenados em solução aquosa, adotando normalmente uma conformação

de α - hélice na presença de membranas que contêm lipídeos carregados negativamente. Com estas características, essas moléculas interagem com a membrana celular de microrganismos promovendo a sua desestruturação. Nenhum peptídeo citolítico foi relatado a partir dos venenos de aranhas migalomorfas. Não é sabido se esta ausência é simplesmente devido à amostragem taxonômica limitada de venenos estudados ou se estas moléculas são uma inovação específica de araneomorfas. (KING & HARDY, 2013).

Entre os peptídeos ricos em pontes dissulfeto, os que exibem o motivo ICK (Inhibitory Cystine Knot) exibem grande potencial para desenvolvimentos de antimicrobianos (AYROZA ET AL., 2012). Esses peptídeos apresentam um padrão estrutural formado por uma folha β antiparalela estabilizada por um nó (ponto de ancoramento) de cistina. Esta organização estrutural fornece a esses pequenos peptídeos excepcional estabilidade química, resistência a condições extremas de pH, solventes orgânicos e temperaturas elevadas. Do ponto de vista biológico, a sua propriedade mais importante é a resistência às proteases. Estes peptídeos geralmente são estáveis na hemolinfa de insetos durante vários dias e tem uma meia-vida de mais de 12 horas em fluido gástrico. Como resultado, estes têm se proliferado em venenos de aranha através de um processo de duplicação maciça de genes e diversificação de forma que, eles agora dominam a maioria dos peptidomas de venenos de aranha (KING & HARDY, 2013).

Foi proposto que as toxinas ICK de veneno de aranha evoluíram de duplicação gênica de β -defensina. Defensinas estão entre os peptídeos antimicrobianos mais amplamente distribuídos relacionados com a imunidade inata. Uma análise estrutural dessas moléculas revelam uma potente atividade antimicrobiana e alta especificidade (AYROZA ET AL., 2012). Desta forma, a complexidade química dos venenos de aranhas revela um enorme potencial para pesquisa de moléculas bioativas contra microrganismos patogênicos.

2.5.2 – ATIVIDADE INSETICIDA DE VENENOS DE ARANHAS

As presas naturais da maioria das aranhas são invertebrados, principalmente insetos, embora outros aracnídeos, como ácaros, opiliões e até mesmo outras aranhas, possam fazer parte da sua dieta. Como a maioria das aranhas são polípagas (isto é, elas não se alimentam de um tipo exclusivo de presa), seus venenos evoluíram para conter uma série de compostos que têm como alvo uma vasta gama de insetos. Embora algumas grandes aranhas possam consumir pequenos vertebrados, muito poucos componentes do veneno são tóxicos para os seres humanos. A principal razão para a investigação de venenos de aranha como fontes em potencial de bioinseticidas, é que seus venenos há uma ampla variedade de peptídeos

inseticidas que na sua maioria têm pouca ou nenhuma atividade sobre mamíferos (KING & HARDY, 2013).

Até o momento, mais de 200 peptídeos inseticidas de veneno de aranha (ISVPs) foram sequenciados. Variam em tamanho de 3,3-9,0 kDa e contêm de 3 a 6 ligações dissulfeto. No entanto, apenas algumas dezenas destes peptídeos são suficientemente potentes (Apresentando uma dose letal menor que 1500 pmol g^{-1}) para serem reconhecidos como bioinseticidas (KING & HARDY, 2013). Entre os peptídeos do veneno de aranha, os que apresentam o motivo ICK apresentam-se evolutivamente conservados e são relativamente abundantes na peçonha. É sabido que peptídeos ICK também são inseto-seletivos, tendo como alvo canais de Na_v , canais Ca_v , canais de potássio cálcio-ativados Maxi-K (BK_{ca}), e subtipo de receptores de glutamato NMDA (KING & HARDY, 2013; SMITH ET AL., 2013).

Canais Na_v são proteínas transmembranares essenciais que medeiam o influxo intracelular de íons de sódio durante a iniciação e propagação do potencial de ação. Embora o canal de Na_v seja o alvo de inseticidas bem estudados, tais como os piretróides, di-hidropirazole e oxadiazinas, ainda existe um potencial significativo para o desenvolvimento de bioinseticidas que agem sobre estes. Peptídeos ICK do veneno de aranha, o qual tem como alvo o canal de Na_v , poderiam ser úteis em situações onde uma população de insetos possa ter desenvolvido resistência aos inseticidas tradicionais que agem sobre ele (SMITH ET AL., 2013). Desta forma, toxinas isoladas de veneno de aranha demonstram um grande potencial para o desenvolvimento de bioinseticidas naturais e específicos, visto que os insetos são suas presas primárias, e seus venenos são específicos a neutraliza-los.

Em contraste com a maioria dos inseticidas químicos, os ISVPs não são topicamente ativos, pois necessitam acessar seus locais de ação no sistema nervoso dos insetos. Para serem efetivos, eles tem de penetrar o exoesqueleto do inseto, que compreende uma epicutícula lipofílica exterior e uma exocutícula fortemente esclerotizada (KING & HARDY, 2013).

Os ISVPs devem ser entregue através de um vetor, tal como um entomopatógeno ou alternativamente ingerido pelo inseto alvo, a fim de ser eficaz. Como potenciais candidatos de ISVPs, os peptídeos ICK parecem ser os mais promissores, devido as suas características químicas, em especial a resistência a proteases e meia-vida longa na hemolinfa (KING & HARDY, 2013).

Uma abordagem promissora para fazer com que os ISVPs, cheguem a suas moléculas alvo em insetos, é fusiona-los a uma proteína transportadora que facilitaria o transporte através do intestino do inseto até hemolinfa. A proteína de fusão mais bem estudada para esta finalidade é a aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA), uma lectina manose específica. Quando

ingerida pelo inseto, a GNA liga-se a glicoproteínas do trato digestivo e é subsequentemente transportada através do epitélio do intestino para a hemolinfa; ao longo de um período de 24 horas, a proteína acumula-se no intestino, tubos de Malpigi, e hemolinfa do insetos (FITCHES ET AL., 2001; KING & HARDY, 2013). Em estudos conduzidos, a fusão da GNA com o peptídeo U₂-SGTX-Sf1a, foi demonstrada uma atividade inseticida por via oral contra o afídeo do pêssago verde, *Myzus persicae*, e o gafanhoto castanho do arroz, *Nilaparvata lugens* (DOWN, ET AL. 2006).

A vantagem significativa da abordagem sobre a proteína de fusão está diretamente relacionada ao melhoramento da atividade oral de ISVPs, onde estas podem ser produzidas de formas baratas por meio de métodos recombinantes, e transgenicos. No entanto, a ligação covalente de uma proteína de fusão poderia alterar a seletividade dos ISVPs não apenas no que diz respeito a pragas-alvo, mas também predadores e parasitoides. No entanto, ainda há muito trabalho a ser realizado para determinar o perfil ecotoxicológico e ambiental de ISVPs e como sua atividade pode ser significativamente melhorada (KING & HARDY, 2013).

Observando que as toxinas de aranhas foram desenvolvidas durante a evolução para serem moléculas extremamente eficazes e específicas, estas podem ser utilizadas biotecnologicamente, sendo necessários estudos bioquímicos mais aprofundados afim de um melhor conhecimento dessas moléculas para uma aplicação biotecnológica ampla e eficaz.

2.5.3 – ATIVIDADE CITOTÓXICA DE VENENOS DE ARANHAS

Embora os efeitos dos envenenamentos possam conduzir a uma percepção negativa, muitas toxinas como abordado até aqui, demonstram grande potencial para o desenvolvimento de novas moléculas para o diagnóstico, tratamento e talvez cura de alguns tipos de doenças, dentre elas o câncer (HEINEN & VEIGA, 2011).

A terapia anti-câncer é uma das principais áreas para o uso de proteínas e peptídeos derivados de venenos. Algumas destas, quando isoladas, podem ligar-se especificamente a membranas de células transformadas oncogeneticamente, afetando a migração e proliferação destas. Já são descritas toxinas de veneno de escorpião que afetam a fisiologia celular do cancer através de mecanismos como: bloqueio de canal iônico específico e permeabilidade das membranas celulares (HEINEN & VEIGA, 2011).

Heinen e Veiga (2011) reportam em sua revisão que moléculas como a fosfolipase-D isoladas da aranha marrom (*Loxoscesle*), que apresenta atividade hemolítica, são potenciais candidatas que podem apresentar atividade contra o câncer. A hialuronidase, enzima presente

que degrada componentes da matrix celular, também é citada como sendo um coadjuvante nesse tipo de tratamento, pois aumentaria a permeabilidade do tecido facilitando a entrada de drogas empregadas durante o tratamento.

Entre os estudos que relatam os efeitos de veneno de aranha utilizando modelos de tumores *in vivo* e *in vitro*, Gao et al. (2005) demonstram o efeito do veneno de *Macrothele raven* (Araneae, Hexathelidae) sobre a proliferação e citotoxicidade de células de carcinoma cervical humano (HeLa). Doses de veneno nas concentrações de 40, 20, e 10 mg/l demonstram um decréscimo significativo da proliferação celular em células HeLa. Além disso, essas mesmas doses aumentaram significativamente a citotoxicidade, como determinado por ensaios de LDH liberado pelas células. Houve uma parada do ciclo celular e ativação de caspase-3 nas células tratadas, que conduziram a célula a apoptose.

A Pancratistatina (PST), uma molécula isolada da aranha *Pancreaticum littorale*, mostrou ter efeito apoptótico especificamente sobre essas células malignas de neuroblastoma humano (SHSY- 5Y), linfoma humano (Jurkat) e câncer de mama (MCF-7), e não sobre as suas linhas não tumorais homóloga. O fato mais interessante é que esta molécula não afeta as células normais, quando em comparação com outras drogas utilizadas em tratamentos clínicos tais como o VP-16 e Paclitaxel (Taxol). Em linhas celulares de cancer, PST induziu a permeabilização da mitocôndria e a ativação de caspases, que conduzem a células a apoptose. O aumento de ROS também foi observado, entretando as mitocôndrias de células normais não foram afetadas (MCLACHLAN ET AL., 2005; KEKRE ET AL., 2005; SIEDLAKOWSKI ET AL., 2008; HEINEN & VEIGA, 2011).

Provavelmente, esse efeito observado deve-se a natureza alvo-específica das moléculas presentes no veneno de aranha, o que os tornam importantes candidatos na descoberta e no desenvolvimento de terapias sobre o câncer sem consequências tóxicas para o organismo. Desta forma fica evidenciado a importância de estudos mais aprofundados sobre venenos de aranhas e suas atividades biológicas para futuras prospecções biotecnológicas.

2.6 PROTEÔMICA DE VENENOS

O termo proteoma refere-se a um conjunto de proteínas em funcionamento de um dado ser vivo, incluindo as suas modificações num determinado momento e numa condição específica.

A proteômica caracteriza-se por ser um estudo de grande escala sobre um proteoma específico, incluindo informações sobre a abundância de proteínas, suas variações,

modificações, funções e interações moleculares em um determinado organismo, a fim de compreender melhor os seus processos celulares (NELSON & COX, 2011). A pesquisa utilizando a proteômica como ferramenta tem como objetivo principal realizar uma ponte entre a presença de certas proteínas e a biologia do organismo ou célula pesquisado. Este estudo amplia a ótica de conhecimento sobre um conjunto de proteínas expressas por um organismo, desde achar marcadores moleculares em células doentes, até entender qual o motivo da presença de certas proteínas em um determinado organismo.

Várias estratégias proteômicas diferentes vêm sendo desenvolvidas para a análise de amostras biológicas complexas e algumas destas têm sido aplicadas ao estudo detalhado de venenos animais, surgindo a vertente da proteômica denominada venômica. Organismos venenosos são comuns em torno da Terra, com mais de 100.000 espécies distribuídas entre todos os principais filos da árvore evolutiva do reino animal, dos primitivos cnidários (anêmonas do mar, medusas e corais) passando pelos anelídeos (sanguessugas), equinodermos (estrelas-do-mar e ouriços-do-mar), moluscos (conus e polvos), artrópodes (insetos e aracnídeos, miriápodes), até os cordatos (peixes, anfíbios, répteis e mamíferos) (CALVETE, 2011).

Mesmo estando distribuídos nos mais variados filos, os venenos caracterizam-se principalmente por serem uma mistura complexa de moléculas que tem predominantemente na sua constituição peptídeos e proteínas, com essas moléculas desempenhando as mais variadas funções. Do ponto de vista bioquímico muitos desses venenos, principalmente de serpentes e aranhas são estudados devido a sua importância médica e biotecnológica (Tabela 1). Entretanto o conhecimento de moléculas isoladas que os compõem e suas funções biológicas ainda não estão muito claros. Desta forma pesquisas de venômica podem vir a elucidar quais moléculas compõem estes venenos e como estas interagem.

É sabido que as toxinas presentes nos venenos perturbam a atividade de moléculas biológicas chave, tais como: enzimas, receptores e canais de íons. Desta forma, afetam principalmente os sistemas vitais do organismo, incluindo o sistema nervoso central e periférico, o cardiovascular e os sistemas neuromusculares, de coagulação sanguínea e de homeostase (CALVETE, 2011). Estudos sobre as toxinas de venenos têm fornecido um leque de ferramentas experimentais inestimáveis para decifrar mecanismos moleculares e seus detalhes funcionais, além do entendimento de como atuam em sinergia com outras moléculas da peçonha durante o quadro de envenenamento.

As aranhas despertam o interesse de pesquisas na comunidade médica, principalmente devido aos efeitos deletérios de seus venenos sobre a saúde humana. No entanto, apenas

alguns destes são letais para os seres humanos. Na verdade, existem apenas quatro grupos de aranhas atualmente conhecidos por causar síndromes clínicas significativas ou fatalidades humanas em decorrência de envenenamento: aranhas dos gêneros *Latrodectus* e *Steatoda*, conhecidas como viúva-negra; aranha-marrom (*Loxosceles* spp.); aranha armadeira (*Phoneutria* spp.), e a aranha de funil australiana (*Atrax*, *Hadronyche* e *Illawarra* spp.), (PALAGI ET AL., 2013). O estudo da venômica desses venenos visa primeiramente entender que moléculas compõem a peçonha, como se dá o quadro de envenenamento, e qual a maneira mais eficaz para neutralizar ou reverter este quadro.

Apesar da reputação temível gerada pela potente atividade biológica de componentes do veneno de aranha, apenas nas últimas três décadas que o potencial de peptídeos e proteínas desses venenos, como ferramentas farmacológicas, drogas ou bioinseticidas, começou a ser reconhecido. Torna-se cada vez mais evidente que os venenos de aranha contém uma diversidade riquíssima de novos ligantes que agem sobre canais iônicos e receptores, modulando a liberação de neurotransmissores, todos com uma ampla gama de ações e alvos farmacológicos (PALAGI ET AL., 2013).

Assim, a pesquisa da venômica em aranhas tornou-se um recurso valioso para a descoberta de novas moléculas de alta afinidade e específicas, que podem ser utilizadas para estudar o papel, localização, e regulação das vias de sinalização celular, tais como uma variedade de subtipos de canais iônicos, receptores acoplados a proteína G ou outros alvos de interesse para o desenvolvimento de drogas. Como resultado, a venômica sobre o veneno de aranhas começa a despertar uma ampla atenção na comunidade científica, no desenvolvimento de produtos biotecnológicos como nos setores agroquímicos e nas indústrias farmacêuticas (PALAGI ET AL., 2013).

Tabela 1. Algumas espécies de aranhas que tiveram o proteoma e o transcriptoma do seu veneno relatados.

Espécie de Aranha	Proteoma	Transcriptoma
<i>Citharischius crawshayi</i>	Diego-García et al., 2010	Diego-García et al., 2010
<i>Trittame loki</i>	Undheim et al., 2013	Undheim et al., 2013
<i>Scytodes thoracica</i>	Zobel-Thropp et al., 2014	Zobel-Thropp et al., 2014

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Este trabalho tem como objetivo estudar o veneno da aranha *Lasiodora* sp através da avaliação de suas atividades biológicas e do estudo de venômica parcial .

3.2. Específicos

- Otimizar o método de extração de veneno de *Lasiodora* sp. por eletroestimulação.
- Definir o perfil eletroforético em SDS-PAGE de veneno de *Lasiodora* sp macho e fêmea.
- Investigar atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos de importância médica com veneno total.
- Determinar a atividade hemolítica de veneno total de *Lasiodora* sp.
- Determinar atividade termiticida do veneno total de *Lasiodora* sp. sobre soldados e operários de *Nasutitermes corniger*.
- Avaliar a atividade citotóxica do veneno sobre células mononucleares de sangue periférico
- Separar por HPLC e determinar o perfil eletroforético de frações de veneno de *Lasiodora* sp.
- Identificar por espectrometria de massas as frações separadas por HPLC.

4. REFERÊNCIAS

ADAMS, M.E. et al. **Structure and properties of omega-agatoxin IVB, a new antagonist of P-type calcium channels** *Molecular Pharmacology* v.44, p.4681-688, 1993

AYROZA, G. et al. **Juruin: an antifungal peptide from the venom of the Amazon Pink Toe spider, *Avicularia juruensis*, wich contains the inhibitory cystine knot motif**, *Frontiers in Microbiology*, v. 3, p 1 – 10, 2012.

BELEBONI, R.O. et al. **Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects** *European Journal of Pharmacology*, v. 493, p. 1 – 17, 2004.

CALVETE, J.J **Snake venomics: From the inventory of toxins to biology**, *Toxicon*, v. 75, p. 44 – 62, 2013.

CASEWELL, N.R. et al. **Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms** *Trends in Ecology and Evolution*, v.28, p. 219 – 229, 2013

CLEMENT, H. et al. **Identification, cDNA clonig and heterologous expression of a hyaluronidase from the tarântula *Brachypelma vagans* venom** *Toxicon*, v. 60, p. 1223 – 1227, 2012.

CODDINGTON, J.A.; LEVI, H.W. **Systematic and evolution of spiders (Araneae)**. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*v. 22, p. 565 – 592, 1991.

DOWN, R.E. et al. **Insecticidal spider venom toxin fused to snowdrop lectin is toxic to the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and the Rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)**. *Pest Manag. Sci.* v. 62, p. 77–85, 2006.

DUTRA, A.A. et al. **Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasidora* sp. effecting on calcium channels**, *Peptides*, v. 29, p. 1505 – 1513, 2008.

ESCOUBAS, P. & RASH, L. **Tarantulas: eight – legged pharmacists and combinatorial chemists** *Toxicon*, v. 43, p. 555 – 574, 2004.

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.

FITCHES, E.; WOODHOUSE, S.D.; EDWARDS, J.P.; GATEHOUSE, J.A. **In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomatomoth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action.** *J. Insect Physiol*, v. 47, p.777–787, 2001

FOELIX, R. F. **In: Biology of spiders.** 2 Ed. Oxford University Press, 1996.

GAO, L., et al. **Effects of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells.** *Acta Pharmacol. Sin.*, v. 26, p. 369–376, 2005

GUETTE, C. et al. **Peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of the *Lasiadora parahybana* tarântula venom gland** *Toxicon*, v. 47, p. 640 – 649, 2006.

HARRISON, P.L.; ABDEL-RAHMAN, M. A.; MILLER, K.; STRONG, P. N. **Antimicrobial peptides from scorpion venoms**, *Toxicon*, v. 88, p. 115 – 137, 2014

HECK, S.D. et al. **Functional consequences of posttranslational isomerization of Ser46 in a calcium channel toxin** *Science* v. 266(5187) p. 1065-1068, 1994

HEINEN, T.E & VEIGA, A.B.G. **Arthropod venoms and cancer** *Toxicon*, v. 57, p. 497 – 511, 2011

HORMIGA, G. & GRISWOLD, C.E. **Systematics, Phylogeny, and Evolution of Orb-Weaving Spiders** *Annu. Rev. Entomol*, v. 59, p.487–512 2014

HORTA, C.C. et al. **ADP is a vasodilator component from *Lasiadora* sp. mygalomorph spider venom** *Toxicon*, v. 72, p. 102 – 112, 2013.

HU, Z. et al. **The venom of the spider *Selenoscomia jiafu* contains various neurotoxins acting on voltage-gated ion channels in rat dorsal root ganglion neurons** *Toxins*, v. 6, p. 988 – 1001, 2014

KALAPOTHAKIS, E. et al. **Effects of the venom of Mygalomorph spider (*Lasiadora* sp) on the isolated rat heart** *Toxicon*, v. 41, p. 23 – 28, 2003.

KEKRE, N., GRIFFIN, C., MCNULTY, J., PANDEY, S., **Pancratistatin causes early activation of caspase-3 and the flipping of phosphatidyl serine followed by rapid apoptosis specifically in human lymphoma cells.** *Cancer Chemother. Pharmacol.* V. 56, p. 29–38, 2005.

KING, G.F. **The wonderful world of the spiders: preface to the special *Toxicon* issue on spider venoms** *Toxicon*, v. 43, p. 471 – 475, 2004.

KING, G.F. & HARDY, M.G. **Spider-Venom peptides: Structure, Pharmacology, and Potential for Control of Insect Pests** *Annu.Rev.Entomol.* v. 58, p. 475 – 496, 2013

KUSHMERICK, C. et al. **Effects of a *Lasiadora* spider venom on Ca²⁺ and Na⁺ channels,** *Toxicon*, v. 39, p. 991 – 1002, 2001.

LAZAREV, V. N. et al. **Antimicrobial peptide from spider venom inhibits *Chlamydia trachomatis* infection at an early stage,** v. 195, p. 173 – 179, 2013.

MCLACHLAN, A., KEKRE, N., MCNULTY, J., PANDEY, S., 2005. **Pancratistatin: a natural anti-cancer compound that targets mitochondria specifically in cancer cells to induce apoptosis.** *Apoptosis* v.10, p. 619–630, 2005.

MOURÃO, C.B. F. et al. **Venomic and pharmacological activity of *Acanthoscurria paulensis* (Theraphosidae) spider venom** *Toxicon*, v. 61, p. 129 – 138, 2013.

NELSON, D. L. In **Principios de Bioquímica de Lehniger**, 5° ED, Artmed, 2011.

PALAGI, A. et al. **Unravelling the complex venom landscapes of lethal Australian funnel-web spiders (Hexathelidae: Atracinae) using LC-MALDI-TOF mass spectrometry** *Journal of Proteomics*, v. 80, p. 292 – 310, 2013.

PESSINI, A. C. et al **A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids** *Toxicon*, v. 39, p. 1495 – 1504, 2001.

QUINTERO-HERNÁNDEZ, V. et al. **Scorpion and spider venom peptides: Gene cloning and peptide expression.** *Toxicon*, v. 58, p. 644 – 663, 2011.

RASH, L.D.& HODSON, W.C. **Pharmacology and Biochemistry of spiders venoms** *Toxicon*, v. 40, p. 225 – 254, 2002.

ROCHA-E-SILVA, T.A.A. et al. **Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae)** *Toxicon*, v. 53, p. 153 – 161, 2009.

SAEZ, N. J. et al. **Spider-Venom Peptides as Therapeutics**, *Toxins*, v.2, p.2851 – 2871, 2010.

SANGGAARD, K. W. et al. **Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk**, *Nat. Commun.* 5:3765 doi: 10.1038/ncomms4765 (2014).

SCHANBACHER, F.L. et al. **Purification and characterization of tarantula, *Dugesiella hentzi* (girard) venom hyaluronidase.** *Comp Biochem Physiol B*, v. 44(2), p. 389–396, 1973.

SIEDLAKOWSKI, P. et al. **Synergy of Pancratistatin and Tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria.** *Cancer Biol. Ther.* V. 7, p. 376–384, 2008.

SMITH, J.J.; HERZIG, V.; KING, G. F.; ALEWOOD, P. F. **The insecticidal potential of venom peptides** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. , p. , 2013.

SUTTI et al. **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. 20:2. P. 1 – 7, 2014.

TANAKA, H. & TSUKAGOSHI, A. **Description and scanning electron microscopic observation of a new species of the genus *Polycopetta* (Crustacea, Ostracoda, Cladocopina) from an interstitial habitat in Japan**, *ZooKeys*, v. 294, p. 75–91, 2013.

UNDHEIM, E.A.B. et al. **A Proteomic and transcriptomics investigation of the venom from the Barychelid spider *Tritrame loki* (Brush-Foot Tarapdoor)** *Toxins*, v. 5, p. 2488 – 2503, 2013

VASSILEVSKI, A.A.; KOZLOV, S.A.; GRISHIN, E.V. **Molecular Diversity of Spider Venom** *Biochemistry*, v. 74, n. 13, p. 1505 – 1534, 2009.

VIEIRA, A.L.G. et al. **Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiadora* sp.** *Toxicon*, v. 44, p. 949 – 952, 2004.

WINDLEY, M. J. et al. **Spider-Venom Peptides as Bioinsecticides** *Toxins*, v. 4, p. 191 – 227, 2012.

WORLD SPIDER CATALOG (2015). **World Spider Catalog**. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 16, accessed on 01/04/2015

5. ARTIGO 1

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY FROM VENOM OF THE
SPIDER *LASIODORA* SP.**

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO:

“Frontiers in Microbiology”



(Fator de impacto 3.9)

Antimicrobial Activity from Venom of the Spider *Lasiodora* sp.

Felipe Roberto Borba Ferreira¹, Pollyanna Michelle da Silva¹, Tatiana Soares¹, Emmanuel Viana Pontual², Russolina Benedeta Zingali³, Thiago Henrique Napoleão¹, Patrícia Maria Guedes Paiva^{1,*},

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³ Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

*** Correspondence:** Patrícia Maria Guedes Paiva, Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Recife, Pernambuco, 50670-420, Brazil. ppaivaufpe@yahoo.com.br

Keywords: *Lasiodora*, antibacterial activity, antifungal activity, spider venom.

Abstract

The Brazilian spider *Lasiodora* (Mygalomorphae, Theraphosidae), whose trivial names are “caranguejeira” or tarantula, is widely distributed in Northeastern Brazil, in the rainforest. The theraphosid venoms may be a rich source of important pharmacological tools. This work evaluated the *Lasiodora* sp. venom for protein concentration, profile on polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and antimicrobial activity against medically important bacteria and fungi. *Lasiodora* sp. venom contained 4.53 ± 0.38 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of protein and showed polypeptides with molecular masses ranging from 14 to 75 kDa. Different profile was detected when SDS-PAGE was performed under denaturing or denaturing/reducing conditions revealing that several polypeptides contain disulfide bridges. The venom inhibited the growth and killed all tested microorganisms, with minimal inhibitory (MIC), minimal bactericide (MBC) and minimal fungicide (MFC) concentrations ranging from 3.9 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The *Lasiodora* sp. venom can be classified as a bactericide agent (MBC/MIC = 1) against the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus* and the Gram-negative bacterium *Aeromonas* sp. Also, it can be classified as a fungicide agent on *Candida parapsilosis* (MFC/MIC = 1) and *Candida albicans* (MFC/MIC = 2). The venom acted as a bacteriostatic drug against the Gram-positive species *Staphylococcus aureus* (MBC/MIC = 64), the Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (MBC/MIC = 8) and *Klebsiella pneumoniae* (MBC/MIC = 16) as well as fungistatic agent on the yeasts *Candida tropicalis* (MFC/MIC = 16.02) and *Candida krusei* (MFC/MIC = 8). In conclusion, *Lasiodora* sp. venom is source of antimicrobial agents with clinical relevance and the study contributes for the characterization of the genus.

1. Introduction

Spiders are a diverse and successful group of terrestrial invertebrates that represents ecologically important predators and produce complex venoms that enable them capturing specific preys (Pétillon et al., 2015). *Lasiadora* (Mygalomorphae, Theraphosidae) is a genus of Brazilian spiders, whose trivial names are “caranguejeira” or “tarantula”. They are widely distributed in Northeastern Brazil, in the rainforest, and reports of theraphosid bites on humans are relatively rare (Isbister et al., 2003; Ahmed et al., 2009; Fuchs et al., 2014). The effects on humans are not serious and can include local pain, edema and erythema which disappear after a few hours (Isbister et al., 2003). Among the Brazilian tarantulas, the toxins from *Lasiadora* species are broadly studied and their venoms are pointed as promising sources of bioactive molecules of scientific interest and with therapeutic potential (Vizzotto, 2009; Horta et al., 2013).

It was reported that the venom of a *Lasiadora* species affected the generation force and the electrical activity in isolated rat heart (Kalapothakis et al., 2003); the authors concluded that it induces vesicular release of acetylcholine from parasympathetic nerve terminals. *Lasiadora* sp. venom contains ADP as the main vasodilator compound, which was able to induce vasodilation in rat aortic rings in a concentration-dependent way (Horta et al., 2013). Also, the venom of *Lasiadora parahybana* contains a set of small peptides whose properties have not yet been determined (Guett et al., 2006).

Medically important microorganisms can escape of the strategies from the immune system of the host organism generating mild to severe infections. In these cases, it is necessary the use of chemotherapeutics. However, the indiscriminate use of antibiotics has led to the emergence of resistant strains of bacteria and fungi (Koh et al., 2009). In this sense, the search for new antimicrobial agents has gained attention. In this study we hypothesized that the venom of *Lasiadora* sp. may provide an alternative source of antimicrobial agents.

This work evaluated the *Lasiadora* sp. venom for protein concentration, profile on polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) and antimicrobial activity against bacteria and fungi with medical relevance.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult female *Lasiadora* sp. spiders (n= 7) were collected from an Atlantic Forest fragment in Paudalho city, State of Pernambuco, Brazil. The spiders were kept in plastic boxes and food (cockroach) was given once a week and water was offered daily. The spiders were maintained in the animal experimentation laboratory of the *Departamento de Bioquímica* from the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE). The rearing of the spiders has authorization (38690-2) of the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio).

2.2. Venom collection

The venom was collected by electro stimulation of animals that had the feeding discontinued between 4 and 7 days before the collection. The spiders were manually immobilized from the coxae area holding extremities upside down over the cephalothorax. The fangs were raised and positioned in a 1.5-mL microcentrifuge tube, thereby isolating the venom discharge orifice at the tip of the fang and hence avoiding contamination with digestive fluids

Two stimulator electrodes were placed in contact with the carapace above the cephalothorax and the fissure between the chelicerae and the cephalothorax, in a region where the chitin coat is thinner and then the transmission of the electrical current is easier. Electrical stimulus of 220V and 60-80Hz were applied once for 5s and the venom generally flowed immediately from the fangs. At the end of the process, food and water were offered. The collection processes were carried out with intervals of 15-20 days, in order to allow sufficient time for the spiders replenish their venom supply.

After collection, the venoms from different individuals were pooled and centrifuged at 12.000 g for 2 min to remove insoluble material. Next, the pool was lyophilized in a LIOTOP freeze-dryer model L101 (Liobras, São Carlos, Brazil) and stored at -20°C until the use. Protein concentration was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard. The samples were analyzed in triplicates and the results were expressed as a mean $\pm$ standard deviation.

2.3. Polyacrylamide gel electrophoresis

The protein profile of *Lasiodora* venom was evaluated on polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) as denaturing agent. The gel, containing 12% (w/v) acrylamide, was prepared according Laemmli (1970) and, after polymerization, the venom (22 µg) was applied on it. The experiment was performed in the presence or absence of the reducing agent dithiothreitol (DTT, 5 mM). After the complete migration, the polypeptides in the venom and the molecular mass markers (14.4 to 97 kDa; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were stained with 0.02% (v/v) Coomassie Brilliant Blue in 10% (v/v) acetic acid.

2.4. Antimicrobial activity

The bacterial strains (*Aeromonas* sp. ATCC-35941, *Bacillus subtilis* ATCC-6633, *Micrococcus luteus* F00112, *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00025, *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC-29665) were provided by the *Departamento de Antibióticos* of UFPE, Recife, Brazil. The yeasts (*Candida albicans* URM-5901, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* URM-6551 and *Candida parapsilosis* URM-6951) were obtained from the culture collection of University Recife Mycologia, *Departamento de Micologia* of UFPE. The bacteria and yeasts were cultured in Nutrient Broth (NB) and Sabouraud-Dextrose, respectively, overnight at 37 °C under permanent shaking. After this period, the culture concentrations were adjusted turbidimetrically to 10⁵-10⁶ colony forming units (CFU)/mL.

The minimal inhibitory (MIC), minimal bactericide (MBC) and minimal fungicide (MFC) concentrations of the venom were then determined. Initially, 100 µL of culture medium were dispensed in each well of a 96-well microplate. In each row, the venom (750 µg/mL) was two-fold serially diluted in the culture medium from the third well and next 20 µL of the microorganism culture was added to each well. The first corresponded to negative control and contained only the culture medium while the second well contained medium, distilled water and microorganism, without the sample (100 % growth control). The plates were incubated at 37°C for 24 h and assays were made in triplicate. After incubation, the optical density at 490 nm (OD₄₉₀) was measured using a microplate reader. MIC was determined as the lowest sample concentration able to promote a reduction ≥50 % in the optical density relative to the 100 % growth control (Amsterdam, 1996). The MBC and MFC

values were determined by transferring inocula from the wells corresponding to concentrations $\geq$ MIC to petri plates containing Nutrient Agar. The plates were incubated for 24 h at 37 °C. The MBC or MFC corresponded to the lowest venom concentration able to reduce the number of CFU in 99.9 % in comparison with 100 % growth control. The venom was classified as a bactericide or fungicide agent whether MBC/MIC or MFC/MIC ratios were lesser than four. Otherwise, the venom was classified as bacteriostatic or fungistatic agent (Levison, 2004).

3. Results

Protein concentration of *Lasiadora* sp. pooled venom was 4.53 ± 0.38 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ as determined for the venom after centrifugation. The venom from *Lasiadora* was analyzed by SDS-PAGE revealing a set of polypeptides with relative molecular masses ranging from 14 to 75 kDa in the absence of DTT; at this condition, three main polypeptide bands with 75, 22 and 14 kDa could be detected, as shown in Figure 1A. On the other hand, the treatment of the venom with the reducing agent DTT resulted in the disappearance of the polypeptide bands with 75 and 22 kDa as well as of other bands with molecular mass between these values (Figure 1B). In addition, SDS-PAGE of *Lasiadora* sp. venom under reducing conditions also revealed the presence of three main bands with 63, 29 and 14 kDa and other bands with molecular masses comprised between 21 and 15 kDa that were not detected in absence of DTT (Figure 1B).

The venom inhibited the growth and promoted cell death of all tested microorganisms. The minimal inhibitory (MIC), minimal bactericide (MBC) and minimal fungicide (MFC) concentrations are shown in Table 1. The MBC/MIC ratios were determined aiming to classify the venom as a bactericide/fungicide or bacteriostatic/fungistatic agent. The results indicated that it was a bactericide agent against *Aeromonas* sp., *B. subtilis* and *M. luteus* (MBC/MIC ratios of 1) and a fungicide agent on *C. parapsilosis* and *C. albicans* (MFC/MIC ratios of 1 and 2, respectively). The venom acted as a bacteriostatic drug against *S. aureus* (MIC/MBC: 64), *P. aeruginosa* (MIC/MBC: 8) and *K. pneumoniae* (MIC/MFC: 16) as well as fungistatic agent on the yeasts *C. tropicalis* (MIC/MBC: 16) and *C. krusei* (MIC/MFC: 8).

4. Discussion

High protein content was recovered after the processing of the venom, indicating the efficacy of the collection method employed in this work. The distinct profiles detected when SDS-PAGE was performed in presence or absence of the reducing agent suggest that several polypeptides contain disulfide bridges. This datum corroborates with those obtained by Yuan et al. (2008) who reported the presence of a superfamily of toxins constituted by disulfide bridges in the venom of the tarantulas *Ornithoctonus huwena* and *Ornithoctonus hainana*. The majority of toxins present in the venom of spiders are peptides stabilized by disulfide bonds and that can be involved in various physiological processes and could act as biopesticidal, antifungal, antiviral and neurotoxins or can block nicotinic receptors or promote vasodilation (Ayroza et al., 2012, Horta et al., 2013, Rates et al., 2013, Rocha-e-Silva et al., 2013, Wan et al., 2013).

Guette et al. (2006) reported that the peptide profile of the *Lasiadora parahybana* venom comprises mainly small peptides (3.1 to 8.5 kDa) but also peptides with molecular masses about 42 kDa were also detected. These reports differ from that observed for the venom of the species used in this work and this may be an important observation from a taxonomic point of view. In 1997, two toxins were purified of *L. parahybana*, lasiotoxin 1 e 2, with no homology with other spider toxins (Escoubas et. al., 1997). Thus, it is possible that the venom of *Lasiadora* sp. also contain unknown peptides.

The results from antibacterial assay indicated the *Lasiadora* sp. venom as a promising source of compounds with antimicrobial property. The classification of the venom in a bactericide/fungicide or as bacteriostatic/fungistatic was dependent of the target species revealing that the venom acts differently on the microorganisms evaluated.

The venoms of several poisonous animals, including spiders, have been evaluated for antimicrobial activity. For example, the venom of the spider *Agelena labyrinthica* was active against *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The bacteria exposed to these venom showed depression of cell wall and shrinkage and the authors suggested that antimicrobial peptides able to increase membrane permeability may be involved in the antibacterial effect (Benli and Yigit, 2008). A peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha* showed antibacterial (*E. coli* and *S. aureus*) and antifungal (*C. krusei* and *Cryptococcus neoformans*) activities and a weak hemolytic activity and only at

higher concentrations (Santos et al., 2010). In addition the peptide juruin, from the venom of the spider *Avicularia juruensis* showed antifungal activity on *C. albicans*. It is possible that the polypeptides found in *Lasiadora* sp. venom could act as toxins as well as antibacterial and antifungal agents.

Almost all spiders are poisonous and produce toxins in order to paralyze their prey (usually insects) or to defend themselves against predators (Wan et al., 2013). The spider venoms are harmless to humans when injected into the body through spider bite, with a few exceptions (Tambourgi and Berg, 2014). In this sense, the investigation of pharmacological potential of compounds found in spider venoms has been stimulated. However, this does not exclude the possibility of toxic effects of these compounds when entering the human body by another ways and thus the need for studies on toxicity to humans.

In conclusion, *Lasiadora* sp. venom is source of antimicrobial agents with clinical relevance and the study contributes for the characterization of the genus. Future works are now needed focusing on the identification of the antimicrobial agents involved in the deleterious effects on each microbial species.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowships (P.M.G. Paiva and R.B. Zingali) and the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE), and the Brazilian Ministry for Science, Technology and Innovation (MCTI) for research grants. F.R.B. Ferreira and T. Soares would like to thank CAPES for graduate scholarships. P.M. Silva would like to thank CNPq for graduate scholarship.

References

- Ahmed, N., Pinkham, M., Warrell, D.A. (2009). Symptom in search of a toxin: muscle spasms following bites by Old World tarantula spiders (*Lampropelma nigerrimum*, *Pterinochilus murinus*, *Poecilotheria regalis*) with review. *QJM* 102, 851–857.
- Amsterdam, D. (1996). "Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media" in *Antibiotics In Laboratory Medicine*, ed. V. Loman (Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 52-111.
- Ayroza, G., Ferreira, I.L.C., Sayegh, R.S.R., Tashima, A.K., Silva Jr., P.I. (2012). Juruin: an antifungal peptide from the venom of the Amazonian Pink Toe spider, *Avicularia juruensis*, which contains the inhibitory cysteine knot motif. *Front. Microbiol.* 3:324. doi: 10.3389/fmicb.2012.00324
- Benli, M., Yigit, N. (2008). Antibacterial activity of venom from funnel web spider *Agelena labyrinthica* (Araneae: Agelenidae). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 14, 641-650.
- Bradford, M.M. (1976), Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Fuchs, J., Von Dechend, M., Mordasini, R., Ceschi, A., Nentwig, A. (2014). A verified spider bite and a review of the literature confirm Indian ornamental tree spiders (*Poecilotheria species*) as underestimated theraphosids of medical importance. *Toxicon* 77, 73–77.
- Guette, C., Legros, C., Tournois, G., Goyffon, M., Célérier, M.L. (2006). Peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of the *Lasiodora parahybana* tarantula venom gland. *Toxicon* 47, 640–649.
- Horta, C.C., Rezende, B.A., Oliveira-Mendes, B.B.R., Carmo, A.O., Capettini, L.S.A., Silva, J.F. et al. (2013). ADP is a vasodilatador component from *Lasiodora* sp. Mygalomorph spider venom. *Toxicon* 72, 102-112.
- Isbister, G.K., Seymour, J.E., Gray, M.R., Raven, R.J. (2003). Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. *Toxicon* 41, 519–524.
- Kalapothakis, E., Kushmerick, C., Gusmão, D.R., Favaron, G.O.C., Ferreira, A.J., Gomez, M.V. et al. (2003). Effects of the venom of a Mygalomorph spider (*Lasiodora* sp.) on the isolated rat heart. *Toxicon* 41, 23-28.
- Koh, K.H., Tham, F.-Y. (2009). Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. *J. Microbiol.* 44, 144–148.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Pétillon, J., Potier, S., Carpentier, A., Garbutt, A. (2014). Evaluating the success of managed realignment for the restoration of salt marshes: Lessons from invertebrate communities. *Ecol. Eng.* 69, 70–75.
- Rocha-e-Silva, T.A., Rostelato-Ferreira, S., Leite, G.B., Silva Jr., P.I., Hyslop, S., Rodrigues-Simioni, L. (2013). VdTX-1, a reversible nicotinic receptor antagonist isolated from venom of the spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon* 70, 135–141.
- Santos, D.M., Verly, R.M., Piló-Veloso, D., de Maria, M., de Carvalho, M.A., Cisalpino, P.S. et al. (2010). LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Amino Acids* 39, 135-144.
- Vizzotto, C.S. (2009) *Isolamento e caracterização de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira Lasiodora sp.* Brasília: Fundação Universidade de Brasília.
- Yuan, C.H., He, Q.Y., Peng, K., Diao, J.B., Tang, X., Liang, S.P. (2008). Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. *PLoS ONE* 3:3414. doi: 10.1371/journal.pone.0003414

Table 1. Antimicrobial activity of the *Lasiadora* sp. venom against medically important species.

Microorganism	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a	MBC ($\mu\text{g/ml}$) ^b	MBC/MIC ratio	Classification of the <i>Lasiadora</i> venom ^c
Bacteria				
<i>Aeromonas</i> sp. (-)	62.5	62.5	1	Bactericide
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	62.5	62.5	1	Bactericide
<i>Micrococcus luteus</i> (+)	7.8	7.8	1	Bactericide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	31.25	250	8	Bacteriostatic
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	7.81	500	64	Bacteriostatic
<i>Klebsiella pneumonia</i> (-)	15.62	250	16	Bacteriostatic
Fungi				
<i>Candida albicans</i>	125	250	2	Fungicide
<i>Candida krusei</i>	7.81	62.5	8	Fungistatic
<i>Candida parapsilosis</i>	31.25	31.25	1	Fungicide
<i>Candida tropicalis</i>	3.9	62.5	16	Fungistatic

^aMinimal inhibitory concentration: the lowest concentration of venom able to promote a reduction $\geq 50\%$ the growth of bacteria strains regarding to negative control. ^bMinimal bactericide concentration: the lowest concentration of venom able to reduce the number of CFU in 99.9% in comparison with the negative control. ^cThe classification was done according to Levison (2004), which considered that an bactericide agent shows a MBC/MIC or MFC/MIC ratio not higher than four.

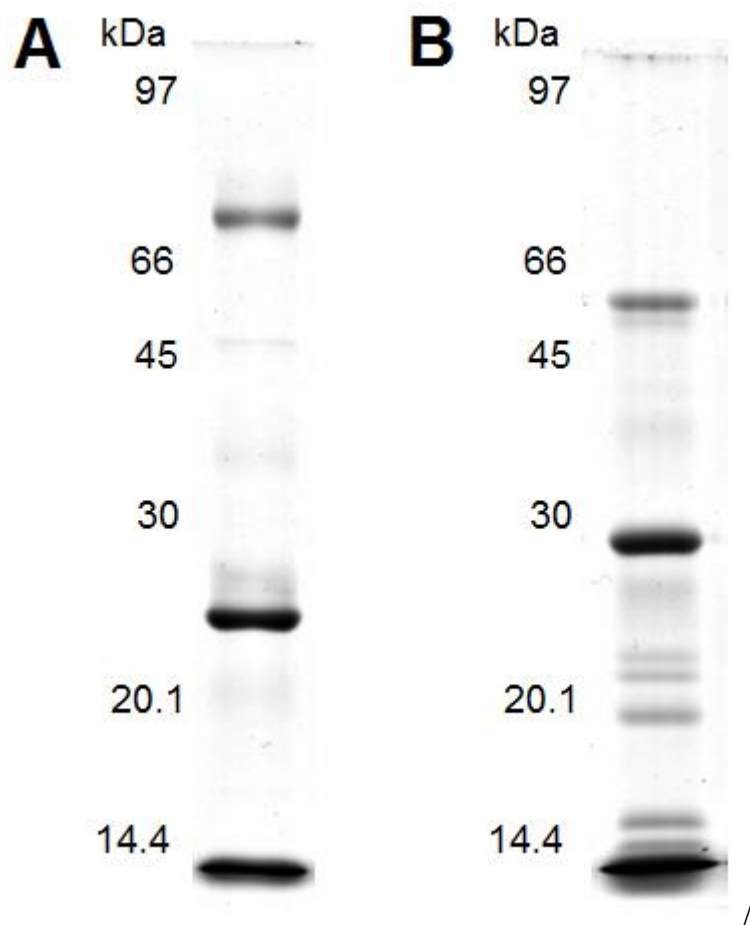
Figure 1.

Figure 1: Electrophoretic profile of of *Lasiodora* sp. venom on SDS-PAGE in absence (A) and presence (B) of the reducing agent dithiothreitol (DTT). The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

6. ARTIGO 2

**EVALUATION OF TOXICITY OF THE *LASIODORA* SP.
VENOM ON MAMMALIAN CELLS AND TERMITES**

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO:

“Toxicon”



(Fator de impacto 2.7)

EVALUATION OF TOXICITY OF THE *LASIODORA* SP. VENOM ON MAMMALIAN CELLS AND TERMITES

Felipe R.B. Ferreira^a, Larissa C.C. Araújo^b, Teresinha G. Silva^b, Gabriela S.V. Mello^c, Moacyr J.B.M. Rego^{a,c}, Maira G.R. Pitta^{a,c}, José D.F. Silva^a, Tatiana Soares^a, Russolina B. Zingali^d, Thiago H. Napoleão^a, Patrícia M.G. Paiva^{a,*},

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brazil.*

^b*Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brazil.*

^c*Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT), Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brazil.*

^d*Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Abstract

The spider *Lasiodora* sp. is a tarantula found in Brazilian northeast and it is usually not aggressive to humans. The pathophysiology of a spider bite is due to the presence in the venom of bioactive molecules including peptides which are the main toxins. The study of venom toxicity on different models is a promising strategy to discover novel molecules and to determine possible biotechnological application. The spider *Lasiodora* sp. is a tarantula commonly known in Brazil by the trivial name “caranguejeira”. In this work, we evaluated the venom of the *Lasiodora* sp. found in Brazilian northeast for toxicity on mammalian cells and termites of the species *Nasutitermes corniger*. The venom was collected by electro stimulation of animals and centrifuged to remove insoluble material. Hemolytic activity was performed using *Mus musculus* erythrocytes and the effective concentration that resulted in 50% hemolysis (EC₅₀) was calculated. Cytotoxicity on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was evaluated and treated cells were analyzed for apoptosis and necrosis by flow cytometry. Insecticidal activity of the venom against workers and soldiers of *Nasutitermes corniger* was also evaluated. The *Lasiodora* sp. venom showed a weak hemolytic activity, with an EC₅₀ of 757 [676.9–846.7] µg/mL. The venom showed high toxicity to PBMCs by inducing apoptosis process. The venom was not orally toxic to *N. corniger* workers and soldiers. In conclusion, the *Lasiodora* sp. venom showed interesting toxicity characteristics, since although toxic to PBMCs, it did not show hemolytic activity, which stimulates the investigation of possible biotechnological applications.

Keywords: spider venom; *Lasiodora*; cytotoxicity; hemolysis; apoptosis; *Nasutitermes corniger*

1. Introduction

Spiders venoms are complex mixtures produced in order to kill paralyze the preys of these animals. Among the various components of these venoms are salts, acylpoliamines, toxic peptides, neurotoxins, enzymes, amino acids, nucleotides, proteins, antimicrobial agents and low molecular mass compounds (Vassilevski et al., 2009; Gomez et al., 2013; Mourão et al., 2013; Undheim et al., 2013). The venoms of spiders may affect different transport systems at plasma membrane such as ionic channels and receptors (Vassilevski et al., 2009). The effects on humans of spider bites are usually not serious, promoting mainly local pain, edema and erythema which disappear in a short period (Isbister et al., 2003).

The peptides are the main toxins found in spider venoms and can be classified into two groups: linear peptides and peptides rich in disulfide bridges. The first are molecules similar to proteins, with molecular mass lower than 10 kDa, and characterized by being highly cationic and amphipathic, with affinity for lipid bilayers (Vassilevski et al., 2009; Windley et al., 2012; King and Hardy, 2013). The peptides rich in disulfide bridges act as neurotoxins and have been reported as potent insecticidal agents (Vassilevski et al., 2009). The proteins usually found in venoms correspond to enzymes (such as collagenases, hyaluronidases and phospholipases), which are responsible for conferring a necrotic characteristic to the venom of the brown spiders (Rash and Hodgson, 2002). Other proteins are neurotoxins, transport proteins as well as regulatory and structural proteins linked to intercellular functions (Vassilevski et al., 2009; King and Hardy, 2013). Venoms from species that have insects as main preys are reported as promising biopesticides and are described as highly specific agents, showing no generalized insecticidal activity, which is ecologically important (Nakasu et al., 2015).

The spider *Lasiodora* sp. is a tarantula commonly known in Brazil by the trivial name “caranguejeira”. It inhabits abandoned burrows, roots, holes in the ground and walls as well as vegetation places that allow it “to hide”. This spider has a nocturnal hunting habit and is usually not aggressive to humans.

The study of venom toxicity on different models is a promising strategy to discover novel molecules and to determine possible biotechnological applications. In this sense, the aim of this work was to characterize the venom of the *Lasiodora* sp. found in Brazilian northeast for toxicity on mammalian cells and termites of the species *Nasutitermes corniger*.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult female *Lasiadora* sp. spiders (n= 7) were collected from an Atlantic Forest fragment in Paudalho city, State of Pernambuco, Brazil (7° 53' 31'' S, 35° 10' 37''). The spiders were kept in plastic boxes and food (cockroach) was given once a week and water was offered daily. The spiders were maintained in the animal experimentation laboratory of the *Departamento de Bioquímica* from the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE). The rearing of the spiders has authorization (38690-2) of the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio).

2.2. Venom collection

The venom was collected by electro stimulation of animals that had the feeding discontinued between 4 and 7 days before the collection. The spiders were manually immobilized from the coxae area holding extremities upside down over the cephalothorax. The fangs were raised and positioned in a 1.5-mL microcentrifuge tube, thereby isolating the venom discharge orifice at the tip of the fang and hence avoiding contamination with digestive fluids.

Two stimulator electrodes were placed in contact with the carapace above the cephalothorax and the fissure between the chelicerae and the cephalothorax, in a region where the chitin coat is thinner and then the transmission of the electrical current is easier. Electrical stimulus of 220V and 60-80Hz were applied once for 5s and the venom generally flowed immediately from the fangs. At the end of the process, food and water were offered. The collection processes were carried out with intervals of 15-20 days, in order to allow sufficient time for the spiders replenish their venom supply.

After collection, the venoms from different individuals were pooled and centrifuged at 12.000 g for 2 min to remove insoluble material. Next, the pool was lyophilized in a LIOTOP freeze-dryer model L101 (Liobras, São Carlos, Brazil) and stored at -20°C until the use. Protein concentration was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard. The samples were analyzed in triplicates and the results were expressed as a mean $\pm$ standard deviation.

2.3. Hemolytic assay

The hemolytic assay was performed using *Mus musculus* erythrocytes. Briefly, the blood of mice (n=3), previously anesthetized, was collected by cardiac puncture (Ethics Committee of the *Universidade Federal de Pernambuco*, process number 23076.023704/2014-86). The erythrocytes were washed with saline solution (0.85% NaCl plus 10 mM CaCl₂). After centrifugation, the supernatant was discharged and the cells resuspended in the saline solution in order to obtain a 2% (v/v) suspension.

The assay was performed in 96-well microplates. The saline solution was added to each well. A PBS-diluted venom sample (100 µL; 31,25 – 2000 µg/mL) was added to a well containing 100 µL of the saline solution. In the negative control, it was added 100 µL of the saline solution while in the blank assay well it was added 50 µL of the saline solution and 50 µL of vehicle (PBS). The positive control (to obtain 100% hemolysis) contained 80 µL of saline solution plus 20 µL of 0.1% (v/v) Triton X-100. Next, each well received 100 µL of the suspension of mouse erythrocytes. After centrifugation for 1 h under constant agitation, the plate was allowed to stand for 1 h at 27 °C. Then, the supernatant was collected and the released hemoglobin was measured by absorbance at 450 nm. The effective concentration that resulted in 50% hemolysis (EC₅₀), when compared with that observed in the positive control, was calculated from nonlinear regression using the software GraphPad Prism v. 5.0. The sample being evaluated was considered to be active whether the EC₅₀ was lower than 200 µg/mL (Costa-Lotufo et al., 2005). Two independent experiments were performed in duplicate.

2.4. Evaluation of cytotoxicity on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from heparinized blood from three healthy, non-smoking donors who had not taken any drugs for at least 15 days prior to sampling collection, and the PBMC were isolated via a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). Cells were counted in a Neubauer chamber, and viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was >98%. All donors signed an informed consent form and the study was approved by the Human Research Ethics Committee of UFPE in the Health Sciences Center (CEP/CCS/UFPE N0 145/09).

PBMCs (100 µL, 0.3×10^6 cells/mL), were plated in 96-well microtitre plates (TPP-Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). After 24 h, the venom (100 µL) was

added to each well to obtain the concentrations 0.1, 1, 10 and 100 µg/mL. After incubation (72 h at 37°C), 100 µL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, 5.0 mg/mL) was added to each well, and the cell viability was estimated by assaying the ability of the living cells to reduce the yellow tetrazolium to a blue formazan product (Mosmann, 1983; Alley et al., 1988). After 3 h, the formazan product was dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO), and the absorbance at 450 nm was measured using a multi-plate reader. Negative control corresponded to untreated and the control of 100% growth corresponded to cells treated with 0.15 M NaCl. The assays were made in triplicate and three independent experiments were performed.

2.5. Flow cytometry analysis of death induction

The death induction mechanism was evaluated with Annexin/propidium iodide (PI) staining using an FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences). Cells were seeded at a density of 1×10^5 /mL into 6-well plates. After 48 h of incubation with the *Lasiadora* sp. venom at 10 µg/mL or camptothecin at 3 µM (positive control), the cells were washed twice with ice-cold phosphate buffered saline (PBS). Each cell sample was transferred to individual tubes and centrifuged at 200 *g* for 5 min. In accordance with the manufacturer's information, cells were resuspended in washing buffer before the incubation with Annexin-FITC and PI during 15 minutes. After washing, cells were resuspended in 400 µL of 1X Binding Buffer to each tube and then analyzed by flow cytometry (FACS Area II - Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) and FACS Diva analysis software.

2.6. Termiticidal assay

Termiticidal activity was evaluated by a no-choice bioassay based on the method described by Kang et al. (1990). Each experimental unit consisted of a Petri dish (90 × 15 mm, TPP-Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) whose bottom dish was covered with filter paper. A filter paper disk (4 cm in diameter) impregnated with 200 µL of sample in 0.15 M NaCl was put in each dish. Termiticidal activity was evaluated using different amounts of venom (0.14, 0.23, 0.56, and 0.7 µg of protein). In negative controls, papers were impregnated with 0.15 M NaCl. A total of 20 active termites (at a worker-to-soldier ratio of 4:1) were transferred to each dish, which was maintained at 28 °C in the dark. Insect survival was evaluated daily, until all insects were dead. Bioassays were carried out in quintuplicate for each concentration, and survival rates (%) were obtained for each treatment.

2.7. Statistical analysis

Means and standard deviations (SD) were calculated and data were expressed as a mean of replicates $\pm$ SD. Significant differences between groups were determined using Student's *t* test at significance level of $p < 0.05$.

3. Results and discussion

The results from haemolytic assay are shown in Figure 1A. The *Lasiadora* sp. venom showed a weak hemolytic activity since the EC_{50} calculated was 757 [676.9–846.7] $\mu\text{g/mL}$. Linear peptides from spider venoms have also been called as cytolytic peptides due to their ability in promoting damage to plasma membrane. These cationic and amphipathic peptides are able to bind electrostatically to the negative charges of membrane phospholipids and then gradually insert in the bilayer impairing its integrity (Vassilevski et al., 2009; King and Hardy, 2013). However, the occurrence of these peptides in venoms of “caranguejeira” spiders has not been reported until now and this may explain the absence of hemolytic activity of *Lasiadora* sp. venom.

The *Lasiadora* sp. venom was toxic to PBMCs since it reduced the cell viability in more than 50% at all tested concentrations (Figure 1B). Analysis by flow cytometry revealed that cell death was linked to induction of apoptosis (Figure 1C). The cytotoxicity of spider venom and isolated toxins has been evaluated and the apoptosis process has been linked to cell death. Gao et al. (2005) showed that the *Macrothele raven* venom was cytotoxic to HeLa cells (cervical carcinoma) at 10–40 mg/L and promoted apoptosis by activation of the caspase 3. The molecule pancratistatin, isolated from *Pancratium littorale* venom, induced mitochondria permeabilization and caspase activation in cancer cell lines leading to apoptosis (McLachlan et al., 2005).

Venom toxins may be not active against arthropods when orally derived. The most of insecticidal toxins from spider venoms act as neurotoxins such as a *Segestria florentina* toxin, which caused irreversible paralysis on *Periplaneta Americana* cockroaches (Lipkin et al., 2002) and a neurotoxin from *Phoneutria nigriventer* venom, which was specific to *Musca domestica* and *P. americana* (Figueiredo et al., 1995). As some exceptions, peptide toxins from venom of spider *Hadronyche versuta* were orally active against the tick *Amblyomma americanum* (Mukherjee et al., 2006) and a peptide isolated from venom of the spider

Selenotypus plumipes was orally termiticidal to the termite *Coptotermes acinaciformis*, promoting 70% mortality in 48 h at a dose of 350 nmol/g (Hardy et al., 2013). In this sense, we evaluated whether the *Lasiadora* sp. venom would exert termiticidal effect when ingested by *N. corniger* termites.

The results show that *Lasiadora* sp. venom was not toxic to *N. corniger* workers and soldiers (Figure 2) when offered to insects by impregnation on filter paper. It is possible that the components of *Lasiadora* sp. venom did not exert the same degree of toxicity on insects when ingested in comparison to when they are inoculated by the spider on the insect prey. Also, it is plausible that the *Lasiadora* sp. venom had no effect on termites from this species due to specificity features.

Venom toxins that did not show insecticidal activity by oral challenges have been submitted to the fusion protein technology, where these toxins are fused with plant proteins (usually lectins) and then carried into the insect body and reach the hemolymph. Several works report that these fused proteins have potent insecticidal activity against insects from different orders, being even more efficient than the lectin alone (Fitches et al., 2004; Yang et al., 2014; Nakasu et al., 2015). In this sense, future studies can be performed aiming to evaluate the insecticidal potential of *Lasiadora* sp. venom toxins fused to other proteins.

4. Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE).

References

- Costa-Lotufo, L.V., Khan, M.T.H., Wilke, A.A.D.V., Jimenez, P.C., Pessoa, C, de Moraes, M.E., de Moraes, M.O., 2005. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 21-30.
- Estrada-Gomez, S.; Muñoz, L. J. V.; Quintana, J. C., 2013. Extration and Partial characterization od venom from the Colombian spider *Pamphobeteus aff. Nigricolor* (Aranae: Theraphosidae). *Toxicon*, 76, 301 – 309.
- Figueiredo, S.G., Garcia, M.E.L.-P., Valentim, A.C., Cordeiro, M.N., Diniz, C.R., Richardson, M., 1995. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the armed spider *Phoneutria nigriventer* (Keys.). *Toxicon* 33, 83-93.
- Fitches, E.; Woodhouse, S.D.; Edwards, J.P.; Gatehouse, J.A. 2001. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomatomoth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. *J. Insect Physiol*, 47, 777–787.
- Fitches, E., Edwards, M.G., Mee, C., Grishin, E., Gatehouse, A.M.R., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A., 2004. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *Journal of Insect Physiology* 50, 61-71.
- Foelix, R. F. In: *Biology of spiders*. 2 Ed. Oxford University Press, 1996.
- Gao, L., et al., 2005. Effects of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells. *Acta Pharmacol. Sin.*, 26, 369–376.
- Hardy, M.C., Daly, N.L., Mobli, M., Morales, R.A.V., King, G.F., 2013. Isolation of an orally active insecticidal toxin from the venom of an Australian tarantula. *PLoS ONE* 8, e73136.

Heinen, T.E & Veiga, A.B.G., 2011. Arthropod venoms and câncer. *Toxicon*, 57, 497 – 511.

Hormiga, G. & Griswold, C.E., 2014. Systematics, Phylogeny, and Evolution of Orb-Weaving Spiders. *Annu. Rev. Entomol*, 59, 487–512

Kakasu, E.Y.T., Williamson, S.M., Edwards, M.G., Fitches, E.C., Gatehouse, J.A., Wright, G.A., Gatehouse, A.M.R., 2015. Novel biopesticides based on a spider venom peptide shows no adverse effects on honeybees. *Proceedings of the Royal Society B* 281, 20140619.

Kang, H.Y., Matsushima, N., Sameshima, K., Takamura, N., 1990. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* Léveillé). *Mokuzai Gakkaishi* 36, 78-84.

King, G.F., 2004. The wonderful world of the spiders: preface to the special *Toxicon* issue on spider venoms. *Toxicon*, 43, 471 – 475.

King, G.F. & Hardy, M.G., 2013. Spider-Venom peptides: Structure, Pharmacology, and Potential for Control of Insect Pests. *Annu.Rev.Entomol.* 58, 475 – 496.

Lazarev, V. N. et al., 2013. Antimicrobial peptide from spider venom inhibits *Chlamydia trachomatis* infection at an early stage. 195, 173 – 179.

Lipkin, A., Kozlov, S., Nosyreva, E., Blake, A., Windass, J.D., Grishin, E., 2002. Novel insecticidal toxins from the venom of the spider *Segestria florentina*. *Toxicon* 40, 125 – 130.

Mclachlan, A., Kekre, N., McNulty, J., Pandey, S., 2005. Pancratistatin: a natural anti-cancer compound that targets mitochondria specifically in cancer cells to induce apoptosis. *Apoptosis* 10, 619–630.

Mourão, C.B. F. et al., 2013. Venomic and pharmacological activity of *Acanthoscurria paulensis* (Theraphosidae) spider venom. *Toxicon*, 61, 129 – 138.

Mukherjee, A.K., Sollod, B.L., Wikel, S.K., King, G.F., 2006. Orally active acaricidal peptide toxins from spider venom. *Toxicon* 47, 182-187.

Palagi, A. et al., 2013. Unravelling the complex venom landscapes of lethal Australian funnel-web spiders (Hexathelidae: Atracinae) using LC-MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Proteomics*, 80, 292 – 310.

Rash, L.D.& Hodson, W.C., 2002. Pharmacology and Biochemistry of spiders venoms. *Toxicon*, 40, 225 – 254.

Rocha-E-Silva, T.A.A. et al., 2009. Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon*, 53, 153 – 161.

Saez, N. J. et al., 2010. Spider-Venom Peptides as Therapeutics, *Toxins*, 2, 2851 – 2871.

Sanggaard, K. W. et al. Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk, *Nat. Commun.* 5:3765 doi: 10.1038/ncomms4765 (2014).

Siedlakowski, P. et al., 2008. Synergy of Pancratistatin and Tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria. *Cancer Biol. Ther.* 7, 376–384.

Smith, J.J.; Herzig, V.; King, G. F.; Alewood, P. F., 2013. The insecticidal potential of venom peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, DOI 10.1007/s00018-013-1315-3.

Undheim, E.A.B. et al., 2013. A Proteomic and transcriptomics investigation of the venom from the Barychelid spider *Trittame loki* (Brush-Foot Traopdoor) *Toxins*, 5, 2488 – 2503.

Vassilevski, A.A.; Kozlov, S.A.; Grishin, E.V., 2009. Molecular Diversity of Spider Venom *Biochemistry*, 74:13, 1505 – 1534.

Windley, M. J. et al., 2012. Spider-Venom Peptides as Bioinsecticides *Toxins*, 4, 191 – 227.

World Spider Catalog (2015). World Spider Catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 16, accessed on 01/04/2015

Yang, S., Pyati, P., Fitches, E., Gatehouse, J.A., 2014. A recombinant fusion protein containing a spider toxin specific for the insect voltage-gated sodium ion channel shows oral toxicity towards insects of different orders. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 47, 1-11.

Figure captions

Figure 1. Effects of *Lasiadora* sp. venom on mammalian cells. (A) Hemolytic effect of the venom at different protein concentrations on *Mus musculus* erythrocytes. (B) Effect of venom at different protein concentrations on viability of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). (C) Analysis of viability and occurrence of apoptosis and necrosis in PBMCs treated with the venom at 10 µg/mL as well as with the positive control (camptotecin).

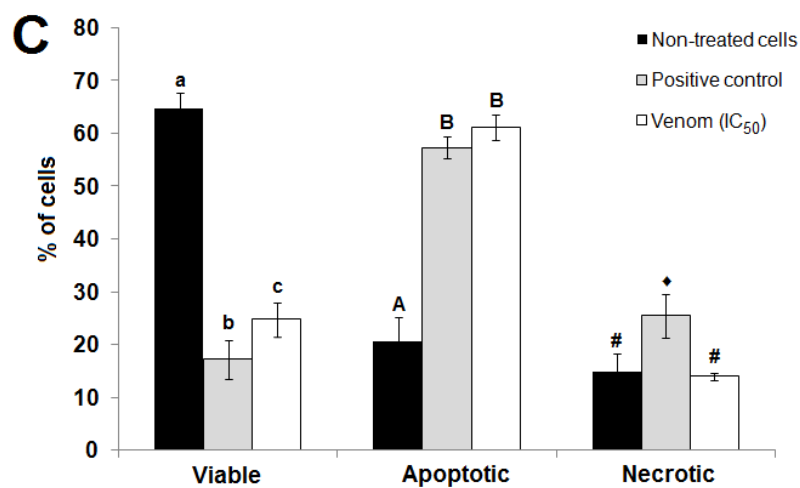
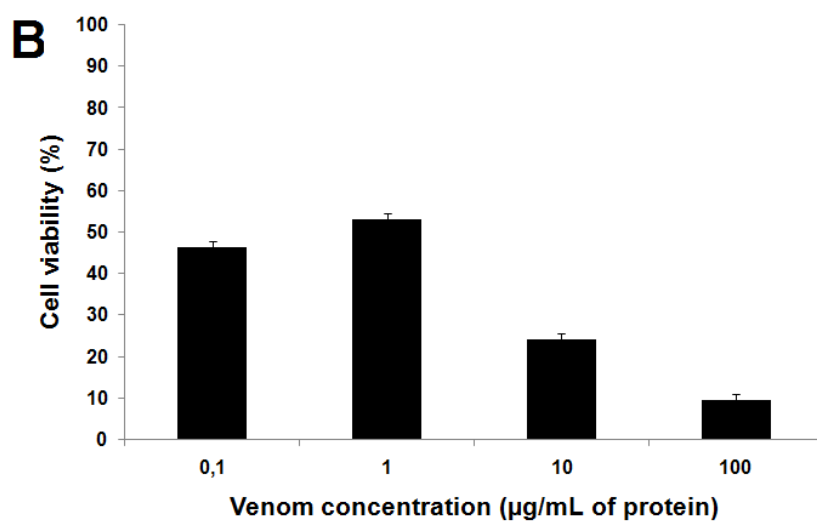
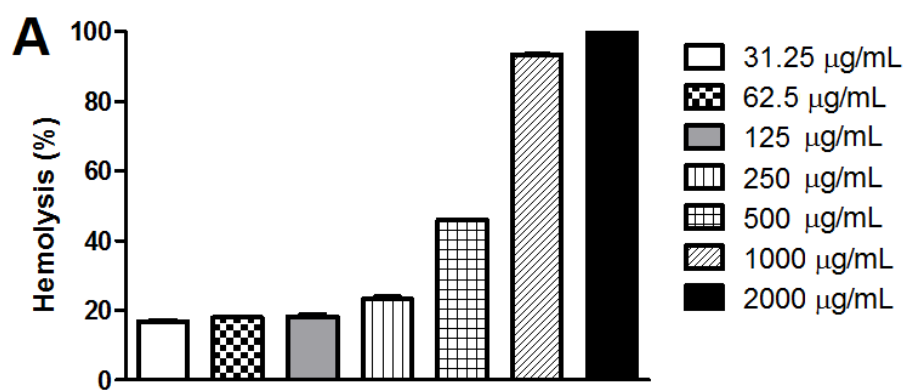
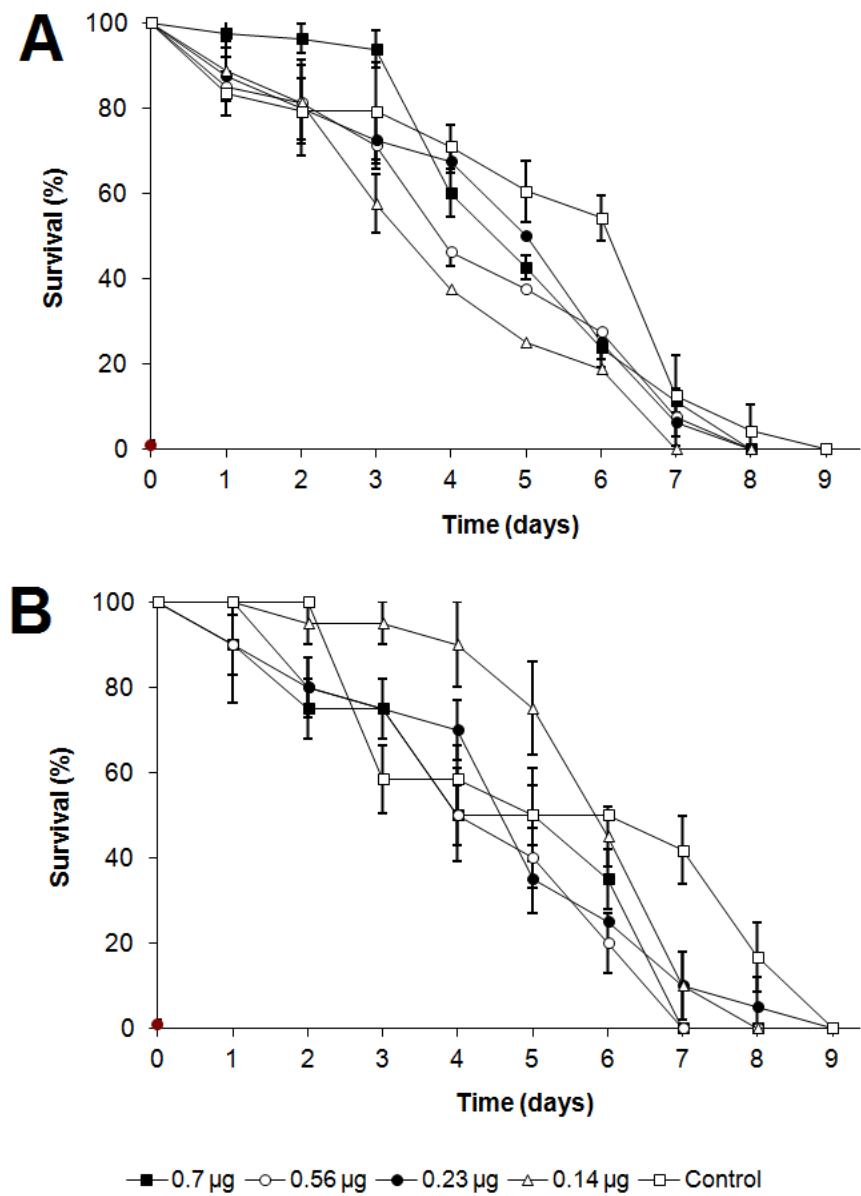


Figure 2. Effect of *Lasiadora* sp. venom on survival of *N. corniger* workers (A) and soldiers (B). Distilled water was the negative control. Each point represents the mean $\pm$ SD of five experiments.



7. ARTIGO 3

**EXTRACTION AND PARTIAL VENOMIC ANALYSES OF
THE BRAZILIAN SPIDER *LASIODORA* SP
(ARANAE:THERAPHOSIDAE) VENOM**

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO:

“Toxicon”



(Fator de impacto 2.7)

EXTRACTION AND PARTIAL VENOMIC ANALYSES OF THE BRAZILIAN SPIDER *LASIODORA* SP (ARANAE:THERAPHOSIDAE) VENOM

Felipe Roberto Borba Ferreira¹, Larissa Gonçalves Machado², Tatiana Soares¹, Patrícia Maria Guedes Paiva¹, Russolina Benedeta Zingali², *

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

² Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

*** Correspondence:** Russolina Benedeta Zingali, Laboratório de Hemostase e Venenos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis. Av. Carlos Chagas Filho, 373, CCS Bloco H, 2º andar sala 08, Ilha do Fundão
CEP: 21941-590 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Telefone: (21) 25626782
Fax: (21) 22708647

Keywords: *Lasiadora*, Spider Venom, Venomic, Tarantula, Toxin, Venom Milking.

Abstract

In the present study we conducted the extraction and partial venomic analyses of the venom from the Brazilian tarantula *Lasiadora* sp. After the extraction process by electric shock, a colorless venom was obtained without contamination with gastric fluids. This venom showed a content of 4.53 ± 0.38 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of protein and a pH of 5.5. Electrophoretic profile showed a low molecular mass smear ranging from 2 kDa to 10 kDa and a variety of bands with molecular masses from 30 to 250 kDa. The RP-HPLC venom profile together with SDS-PAGE did not reveal any difference between male and female venom's. After chromatographic separation fractions of venoms were digested in gel and analyzed by mass spectrometry. Four peptides, U₁-theraphotoxin-Lp1a (Lasiotoxin-1), U₁-theraphotoxin-Lp1b (Lasiotoxin-2) and U₃-theraphotoxin-Lsp1a (LTx5), ω -theraphotoxin-Asp3a were identified. These peptides showed a high identity with other peptides found in *Lasiadora* and other Theraphosides. Two proteins were identified: PLA₂ and hyaluronidase. PLA₂, hyaluronidase and ω -theraphotoxin-Asp3a are describe for first time composing the venom of *Lasiadora* sp.

1. Introduction

Spiders are terrestrial predators that contain a very successful venomous apparatus and complex venom constituents. (Zobel-Thropp et al. 2013) They evolved approximately 400 million years ago from an arachnid ancestor and are distributed all over the world and have conquered all environments. There are approximately 45,000 described species of spiders distributed among 114 families, with an even greater number awaiting characterization (World Spider Catalog, 2015). Spiders are the most diverse invertebrates apart from insects, which are their primary prey. This success is in large part due to the evolution of pharmacologically complex venoms that ensure rapid defeat of preys (Saez, et al. 2010; Hu, et al. 2014). Compounds of different chemical nature can compose spider venoms. These complex mixtures of biologically active can contain salts, low molecular mass compounds, acylpolyamines, peptide toxins, large multidomain proteins, including enzymes (Undheim, et al. 2013). Venom components can work synergistically, thus providing the efficacy of the action of the complex mixture, which would be, primary, to paralyze and kill their preys. Also, the venom composition is species-specific although factors, like sex, nutrition, natural habitat and climate may interfere with their biochemical characteristics (Vassilevski et al., 2009).

Generally most spiders are not aggressive and are harmless to humans. However, some species are responsible for painful bites, as the spiders from *Phoneutria* genus and even fatal cases, such as those from *Latrodectus* genus. When the bite occurs, they are usually accidental or for defense, so installing a arachnidic poisoning frame (Rash & Hodgson, 2002).

Tarantulas (Theraphosidae, Mygalomorphae) accidents are commonly painful, but no necrosis nor systemic effects in humans were reported (Saucier, 2004), except for the bites of spiders from the genus *Atrax* (Hexathelidae). No records of serious accidents caused by Mygalomorphae spiders were recorded up to now.

There are a few biochemical and pharmacological studies of Theraphosid spider venoms, some of these studies show the presence of a variety of novel ligands for cell receptors and channels (Rash & Hodson, 2002, Siemens, et al. 2006; Mazzuca, et al. 2007). One of the central points is the difficulty to milk the venom without contaminants though there is still relatively little information on the methods of milking, venom yields and general properties of these venoms.

Lasiadora sp. is a species of tarantula known commonly by trivial name of “caranguejeira”, the adult male individuals have a smaller abdome and longer legs than females (Figure 1). It is distributed in Northeastern Region of Brazil in the Forest Rain,

commonly inhabiting abandoned burrows in roots, holes in the ground or vegetation, being active during the night, leaving their burrows to hunt actively.

The majority of studies about *Lasiadora* venom only show isolated activities from some components of the venom and a peptide profile, but not a characteristic profile of proteins from venom (Dutra, et al. 2008; Guette, et al. 2006; Horta, et al. 2013; Kalapothakis, et al. 2003; Kushmerick, et al. 2001; Vieira, et al. 2004). In this work our group reports, for the first time in Brazil, the results of a proteomic characterization of the venom from male and female Brazilian spider *Lasiadora* sp. by chromatographic and electrophoretic techniques. Also, we report here a clean method of venom extraction process using electrical stimulus.

2. Material and Methods

2.1 Spiders

Lasiadora sp males (n=5) and females (n=8) adults caught at Paudalho city, Forest Zone at State of Pernambuco, Brazil, were kept in captivity in the animal experimentation laboratory of the *Departamento de Bioquímica* from the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE). The rearing of the spiders has authorization (38690-2) of the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio). The micro-habitat consisted of 24.5 x 18 x 16.5 cm plastic boxes with water and food diet (cockroach) offered once week. Twelve hours day-light followed by 12 h of darkness photoperiod were proportionate. The collection sites where each spider has been found were determined with GPS to future investigation of possible geographic variation in venom composition with other *Lasiadora* groups.

2.2 Venom milking

For milking, the spiders were manually immobilized at the coxae area holding extremities upside down over the cephalothorax. A piece of cotton containing 70% alcohol was passed gently over the entire abdomen to prevent spiders launch urticant hairs. Fangs were raised and positioned in a 1.5 ml microcentrifuge tube, thereby isolating the venom orifice at the tip of the fang from possible contamination by digestive fluids. Electrical stimulus of 220V and 60-80Hz were applied up a maximum of 5s. The two output electrodes of stimulator were placed in contact with carapace up cephalothorax and the fissure between the chelicerae and the cephalothorax, in a region where the chitin coat was thinner in and thus the transmission of

the electrical current was easier. The animals have the food suspended 5 days before the process. The milking process was carried out every 15-20 days, to allow sufficient time for the spiders to replenish their venom supply and at the end of each the process, food and water were offered. Venom generally flowed immediately from the fangs.

Venom collected from each individual were pooled and centrifuged at 12.000x g for 2 minutes to remove insoluble material. After this, the pool was vacuum dried and stored at -20°C until the use.

2.3 Protein quantification

The protein content of the venoms was determined using the Coomassie blue dye-binding method (Bradford,1976), with bovine serum albumin as the standard.

2.4 Physicochemical properties

Venom physicochemical properties analyzed were: color, pH, and solubility. Color and solubility were determined with visual perception by different evaluators. Venom pH was determined using pH-indicator strips (universal pH-indicators strips 0-14; MERCK KGaA, Germany).

2.5 Electrophoretic profile in Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Male and females crude venoms (25µg), were analyzed by SDS-PAGE (Laemmli, 1970) on 5% stacking gel and 12% separation gel. The gels were run at 80V at first 20 minutes and after at 100 V until the end of run. The gel was stained with Coomassie brilliant blue G-250. Molecular weights were estimated using mass markers (Bio-Rad).

2.6 Chromatographic profile

Pools of male or female venoms were fractionated by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). For this 1000µg; 250µg or 100µg of whole venom were dissolved in 500 µL of solution A (0.1% TFA in water) and was then applied to a reverse-phase TEKNOKROMA PEPTIDE-PROTEIN C18 column 5µm (20 x 0.4 cm), coupled to a Shimadzu apparatus. Proteins were eluted by a gradient of solution B (0.1% TFA in 90% acetonitrile) as follows: 5% B for 10 min, 5–35% B over 50 min, 35–60% B over 65 min,

60%-100%B over 70 min, 100%B over 75 min and 100–5% B over 80 min at a flow rate of 1.0 mL/min. The chromatographic run was monitored at 214 nm and 280 nm. Fractions were manually collected, vacuum dried and stored at -20°C until the use. Peaks were analyzed by SDS-PAGE.

2.7 Protein Digestion and Analysis Using ESI-Q-TOF Mass Spectrometry

The Coomassie Blue-stained polypeptide/protein bands were excised, destained and reduced with 100 mM DTT, alkylated with 100 mM iodoacetamide and in-gel digested with trypsin. Digestion was allowed to proceed for 24 h at 37° C (REF for details).

The extracted peptides from the gels were loaded onto a Waters Nano acquity system (Waters, Milford, MA). The peptides were desalted on-line using a Waters Symmetry C18 trap column (180 µm X 20 mm, 5 µm). The sample injection volume was typically 7.5 µl, and the LC was performed by using BEH 130 C18 (100 µm X 100 mm, 1.7 µm) column (Waters, Milford, MA) and eluted on (0.5 µl/min) with a linear gradient (10–40%) of acetonitrile containing 0.1% formic acid.

Electrospray tandem mass spectra were recorded using a Q-TOF quadrupole/orthogonal acceleration time-of-flight spectrometer (Waters, Milford, MA) interfaced to the Nano acquity system capillary chromatograph. The ESI voltage was set at 3500 V, the source temperature was 80 °C and the cone voltage was 30 V. The instrument control and data acquisition were conducted by a MassLynx data system (Version 4.1, Waters), and experiments were performed by scanning from a mass-to-charge ratio (m/z) of 400–2000 using a scan time of 1 s, applied during the whole chromatographic process. The mass spectra corresponding to each signal from the total ion current (TIC) chromatogram were averaged, allowing for an accurate molecular mass measurement. The exact mass was determined automatically using the Q-ToF's LockSpray™ (Waters, Milford, MA). Data-dependent MS/MS acquisitions were performed on precursors with charge states of 2, 3 or 4 over a range of 50–2000 m/z and under a 2 m/z window. A maximum of three ions were selected for MS/MS from a single MS survey. Collision-induced dissociation (CID) MS/MS spectra were obtained using argon as the collision gas at a pressure of 40 psi, and the collision voltage was varied between 18 and 90 V depending on the mass and charge of the precursor. All data were processed using the ProteinLynx Global server (version 2.5, Waters). The processing automatically lock mass corrected the m/z scale of both the MS and MS/MS data utilizing the lock spray reference ion.

Resulting spectra was analyzed using Mascot (MatrixScience) in the NCBI protein databases with carbamidomethyl as fixed modification.

3. Results

3.1 Animal collection and Venom extraction

All spiders, were collected manually examining where it is known the presence of spiders at Paudalho city at non urban areas. The animals were found inhabiting abandoned burrows of small lizards, under tree roots or bumps or holes in walls, associated with human constructions. The animals were placed in their micro-habitats, being offered fresh water and food.

After a week of adaptation, the venom was collected. Spiders were manually immobilized and secured in a clamp for its cephalothorax, and their urticant hairs were unable to be released after 70% alcohol was applied in their abdomen. This procedure gave good advantage during the venom collection, since there was no need to anesthetize the animals.

The clamp immobilizing the animal by cephalothorax was then connected to an electrode, and another electrode was placed at the base of chelicera then applied electric stimulation. The venom was collected in microtubes.

The spiders submitted to this extraction procedure survived, only muscle contractions were evident. Most animals did not show any physical damage, like burning, or body part missing (due to autotomy). However, some animals presented a small loss of hemolymph in joints of the legs. After the procedure, the spiders were returned to their micro-habitat and almost immediately had already recovered their reflexes. Some animals remained motionless for up to five minutes, recovering their movements subsequently. Fresh water and food were offered after the extraction of venom, and no changes in feeding patterns were observed. The method did not allow venom contamination with gastric fluids during the stimulation, since just fangs tips had contact with microtube.

Both venoms collected from male and female, were colorless, translucent and a small pellet after centrifugation can be seen, formed by insoluble material. The pH was 5.5, and after dry, it was presented as a dry gel. Dry venom was completely soluble in water.

3.2 Characterization of Crude Venom

3.2.1 SDS-PAGE

We first intended to compare venoms from male and female spiders in order to verify if some components were related to sex. Nonetheless, electrophoresis in 12% polyacrylamide gels of *Lasiadora* sp. crude venom revealed that profiles of male and female are very similar. There were the presence of bands with low molecular mass ranging from 2 kDa to 10 kDa and a variety of bands with molecular masses from 30 kDa to 250 kDa has been found (data not shown).

3.2.2 Reverse-phase chromatography

A chromatographic profile was obtained from venom pool of males and females. With 1mg of venom, after the first 27 minutes, a clear profile was observed with the presence of 12 well-separated peaks. The profile was very similar between male and female. Although the chromatographic profile of these venoms before 27 min were not defined because the amount of protein applied exceeded the machine's detection limit at these experimental conditions.

To solve this problem, we applied 10 times less amount of protein at these same conditions, resulting in the chromatographic profile of venoms shown in Figure 2. Again there were not significant differences between males and females venoms.

In order to identify these fractions we have used one sets of cromatogram, one using 0,25 mg of protein per run to separate peaks with retention time between 16 to 26 minutes and were divided in five fractions (A – E). The second using 1 mg of protein per run to separate peaks with retention time of 35, 42, 43, 45, 47.9, 48.6, 52, 55, 60, 62, 64 and 66 min identified as 1 – 12 (Figure 3). All fractions were submitted to SDS-PAGE in two different conditions reduced or not with DTT (Figure 4).

3.2.3 Peptide/Protein identification

Since no significant differences were observed between males and females' venom from *Lasiadora* by SDS-PAGE and chromatographic profile, it was concluded that the major proteins of the venom occur in both sexes, being possible to use either sex to characterize the venom molecules. Female venom from *Lasiadora* was chosen for the identification of proteins.

Protein fractions obtained after RP-HPLC were analyzed by SDS-PAGE and the bands of interest were excised and digested. The results from tryptic peptides were then analyzed by

mass spectrometry. Product ion spectra were submitted through the on-line form of the search engine MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) to identify spider venom proteins.

In our search against database, the tryptic peptides identified suggest homology 4 molecules with low mass, U₁-theraphotoxin-Lp1a (Lasiotoxin-1), U₁-theraphotoxin-Lp1b (Lasiotoxin-2) and U₃-theraphotoxin-Lsp1a (LTx5) and ω -theraphotoxin-Asp3a and 2 proteins, PLA₂ and hyaluronidase.

4. Discussion

This paper is the first report of the extraction and partial venom characterization from the venom of Theraphosidae spider *Lasiodora* sp. An increasing interest in the study of spider venoms has emerged over the years, due to the great potential of discovery of biomolecules, since the venoms of these animals have been found antimicrobial, neuromodulating, insecticide and enzymatic activity (Ayroza, et al. 2012; Hu, et al. 2014; Rash & Hodson 2002; Clement, et al. 2012). However obtaining these venom has as a major problem the keeping of these animals in captivity. The genus *Lasiodora* is a big-sized theraphosid spider and an attractive source of venom, because it can be bred in captivity and it produces large amounts of venom. This tarantula is a nocturnal predator, feeding mainly on ground-dwelling arthropods and small vertebrates, solitary, like all other tarantulas. During the collection of spiders for this experiment, it was noted that in addition to sites these animals occupy normally (as abandoned burrows of small lizards, holes in the ground, trees roots) the animals were also finding living in areas modified by human activities, and near houses. Due to ease of finding these animals and their maintenance in captivity, the *Lasiodora* sp is an excellent candidate for prospecting biomolecules from its venom. Thus, tarantulas represent a group that is both and large enough to cover a wide array of ecological and biochemistry diversity but is also small enough that sufficient number species, representing a significant cross-section of the family in terms of their venom biochemistry or molecular evolution, can be obtained and studied. Also the size of tarantulas allows for easier venom milking, facilitating biochemical studies (Escouba & Rash, 2004). Worldwide, different methods had been assayed to obtain spider venoms from Theraphosidae, where the electric stimulus is the main method. One of the main problems in the venom extraction process using electrical stimulation is the contamination with gastric fluids. In our method described here, this contamination is 100% avoided. Only the fang tips must have contact with the microcentrifuge tube, avoiding contact with the spider rostrum, labium or mouth. The

stimulus process should be fast with the venom flowing immediately from the fangs. To prevent spiders launch their urticant hairs during the process, once immobilized a cotton with 70% alcohol should be passed over abdomen. The urticant hairs cause itching when in contact with skin and can contaminate the microcentrifuge tubes, thus compromising the quality of the obtained venom. The periodicity of stimulation process did not change behaviors or cause anatomical visible damage allowing continuous and periodical milking. Only muscle contractions were evident during the procedure and some animals presented a small loss of hemolymph in joints of the legs, regurgitation was not detected. The physiochemical characteristics from *Lasiadora* venom were: a colorless venom, 100% soluble in water and a pH of 5.5, which agreed with venom of different Mygalomorphs spiders: *Attrax robustus*, *Dugesiella hentzi* and *Eurypelma californicum* (Rash & Hodson, 2002; Wiener, 1961; Savel-Niemann, et al. 1989).

To assess the molecular weight distribution of the venom proteins and peptides, the venom from males and females were analyzed by SDS-PAGE. Both venoms showed a similar profile and significant differences were not observed. Due to limits in the sensitivity and resolution of method used, the complexity and diversity of spider venom are usually underestimated. The *Lasiadora* venom showed a profile as expected, showing to be rich in low molecular weight molecules, probably, peptides.

Some tarantulas present differences in their venoms between sex, but *Lasiadora* sp. did not show. Sometimes, differences in venom are observed in some spiders, due: nutrition, natural habitat, climate, molt and other factors. *Lasiadora* from other regions must be studied to understand like these factors can change the venom composition. As expected no differences were observed between males and females, indicating that females' and males' venoms have a high similarity like observed in SDS-PAGE.

To further investigate the venom composition, we begin with the fractionation of the crude venom by reverse-phase HPLC followed by the initial characterization of each protein peak by SDS-PAGE. Thus, the masses of each peak can be estimated, and all proteins and peptides recovered were studied. Classic techniques, such as 2D electroforesis, only proteins from venom are better viewed and the peptides are lost. Moreover, monitoring the eluate at the absorption wavelength of the peptide bond (190–230 nm) from fractions of reverse-phase HPLC, small molecules can be better studied. Nonetheless, the combination of in-gel digestion, mass spectrometry (MS/MS) coupled to database search by BLAST analysis allows the unambiguous assignment to known or unknown protein families of all venom toxin bands visualized in a Coomassie Blue-stained SDS-polyacrylamide gel (Calvete, 2013).

The identification performed in *Lasiodora*'s venom peaks are done, however some fractions did not show similarity with protein families because no matches were found with other compounds in database. This information opens windows to a deeper study, since we may be facing new molecules from venom.

U₁-theraphotoxin-Lp1a (Lasiotoxin-1), U₁-theraphotoxin-Lp1b (Lasiotoxin-2) and U₃-theraphotoxin-Lsp1a (LTx5), are low mass peptides known found in venom from *Lasiodora* sp. These molecules seem neurotoxins affecting ionic channels. Lasiotoxin-2 affect voltage-gated calcium channels, blocking L-type Ca²⁺ channels (Dutra, et al. 2008). ω-theraphotoxin-Asp3a is a peptide from the venom genus *Aphonopelma* sp. that inhibits voltage gated calcium channels in rat cerebellar granule cells, this molecule is assumed to be insecticidal based on the sequence homologies to ω-theraphotoxin-Bs2a from the related spider *Brachypelma smithi* (Herzing, et al. 2011).

The homology protein found in *Lasiodora* sp. venom seems to be PLA₂ from venom *Bothrops pauloensis* and hyaluronidase from venom tarantula *Brachypelma vagans*. PLA₂ from *Bothrops pauloensis* shows presynaptic neurotoxicity, where 10 µg/ml of this protein produces complete neuromuscular blockade up to 80 minutes (Borja – Oliveira, et al. 2007.). Hyaluronidase is a enzyme involved in glycosaminoglycan degradation (hyaluronan, chondroitin sulphate A, B and C) (Clement, et al. 2012). Hyaluronan is a high molecular weight polysaccharide found in the extracellular matrix, especially of soft connective tissues. Hyaluronidases themselves are not toxic, but in venoms are spreading factors because they facilitate toxin diffusion into the tissues of the prey by catalysing hydrolysis of the glycosaminoglycans in connective tissues, thus contributing to systemic envenomation (Pessini, et al 2001).

5. Conclusions

Here we started to investigate the venom from tarantula spider *Lasiodora* sp from Paudalho City in Northeastern Region of Brazil.

Our group is the first to describe the venom profile of the venom from *Lasidora* sp. since at moment only studies about peptides were conduct. The methodology applied to collect of venom allows a good extraction without damage to the animal and yields good quality venom for research.

The proteins PLA₂ and Hyaluronidase were reported for this time in this species. More research is needed to better characterize these molecules in *Lasiodora* sp. venom and their biotechnological applications.

Future studies should be conducted to see if there is a variation in the composition of venoms between males and females from *Lasiodora* specimens occurring in other collection sites and other related spiders.

6. Acknowledgments

We are grateful to Ana Lúcia Carvalho (UEMP) and Augusto Vieira (UEMP) for technical support.

This work was supported by Capes, CNPq and FAPERJ.

7. References

- Ayroza, G. et al. 2012. Juruin: an antifungal peptide from the venom of the Amazon Pink Toe spider, *Avicularia juruensis*, wich contains the inhibitory cystine knot motif. *Frontiers in Microbiology*. 3, 1 – 10.
- Borja – Oliveira, C. R. et al. 2007. Purification and N-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA₂, neuwieditoxin-I and neuwieditoxin-II, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Jararaca pintada) venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 13, 103-121
- Calvete, J.J 2013. Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon*, 75, 44 – 62.
- Clement, H. et al. 2012. Identification, cDNA clonig and heterologous expression of a hyaluronidase from the tarântula *Brachypelma vagans* venom. *Toxicon*, 60, 1223 – 1227.
- Dutra, A.A. et al. 2008. Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasidora* sp. effecting on calcium channels. *Peptides*, 29, 1505 – 1513.
- Escoubas, P. & Rash, L. 2004. Tarantulas: eight – legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, 43, 555 – 574.
- Escoubas, P.; Sollod, B.; King, G.F. 2006. Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*, 47, 650– 663.
- Guette, C. et al. 2006. Peptide profiling by matrix-assisted laser sedorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of the *Lasiodora parahybana* tarântula venom glan. *Toxicon*, 47, 640 – 649.
- Herzing, V. et al. 2011. ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic Acids Research* 39, D653-D657

Horta, C.C. et al. 2013. ADP is a vasodilator component from *Lasiadora* sp. mygalomorph spider venom. *Toxicon*, 72, 102 – 112.

Hu, Z. et al. 2014. The venom of the spider *Selenoscomia jiafu* contains various neurotoxins acting on voltage-gated ion channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Toxins*, 6, 988 – 1001.

Kalapothakis, e. Et al. 2003. Effects of the venom of mygalomorph spider (*Lasiadora* sp) on the isolated rat heart. *Toxicon*, 41, 23 – 28.

Kushmerick, C. et al. 2001. Effects of a *Lasiadora* spider venom on Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Toxicon*, 39, 991 – 1002.

Mazucca, M., et al. 2007. A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat. Neurosci.* 10, 943–945.

Núñez, V. et al. 2009. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. *Journal of Proteomics*, 73, 57 – 78.

Pessini, A. C. et al 2001. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*, 39, 1495 – 1504.

Rash, L.D. & Hodson, W.C. 2002. Pharmacology and Biochemistry of spiders venoms. *Toxicon*, 40, 225 – 254.

Saez, N. J. et al. 2010. Spider-Venom Peptides as Therapeutics. *Toxins*, 2, 2851 – 2871.

Saucier, J.R. 2004. Arachnid Envenomation. *Emerg. Med. Clin. N. Am.* 22, 405 – 422

Savel-Niemann, A., Roth, D., 1989. Biochemical analysis of tarantula venom (*Eurypelma californicum*). *Naturwissenschaften* 76, 212–213.

Siemens, J. et al. 2006. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature*. 444, 208–212.

Undheim, E.A.B. et al. 2013. A Proteomic and transcriptomics investigation of the venom from the Barychelid spider *Tritrame loki* (Brush-Foot Traopdoor). *Toxins*. 5, 2488 – 2503.

Vieira, A.L.G. et al. 2004. Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiadora* sp. *Toxicon*. 44, 949 – 952.

Vassilevski, A.A.; Kozlov, S.A.; Grishin, E.V. Molecular Diversity of Spider Venom. *Biochemistry*, 74(13), 1505 – 1534, 2009.

Wiener, S., 1961. Observations on the venom of the Sydney funnel-web spider (*Atrax robustus*). *Med. J. Aust.* 48 (2), 693–699.

World Spider Catalog (2015). World Spider Catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 16, accessed on 01/04/2015.

Zobel-Thropp, P.A., et al. 2013. Spit and Venom from *Scytodes* Spiders: A Diverse and Distinct Cocktail. *Journal of proteome research* 13, 817 – 835.

Figure 1 – *Lasiadora* sp. Adults male (A) and female (B). *Lasiadora* sp. inhabits burrows abandoned small animals in roots (C).



Figure 2 - Characterization of *Lasiadora* sp. sexual venom profile by Reverse Phase-HPLC with 0,1 mg (A) or 1 mg (B) of total protein using a Teknokroma C18 column (0.4 cm x 25 cm, 5 μ m). Female (Blue) x Male (Green).

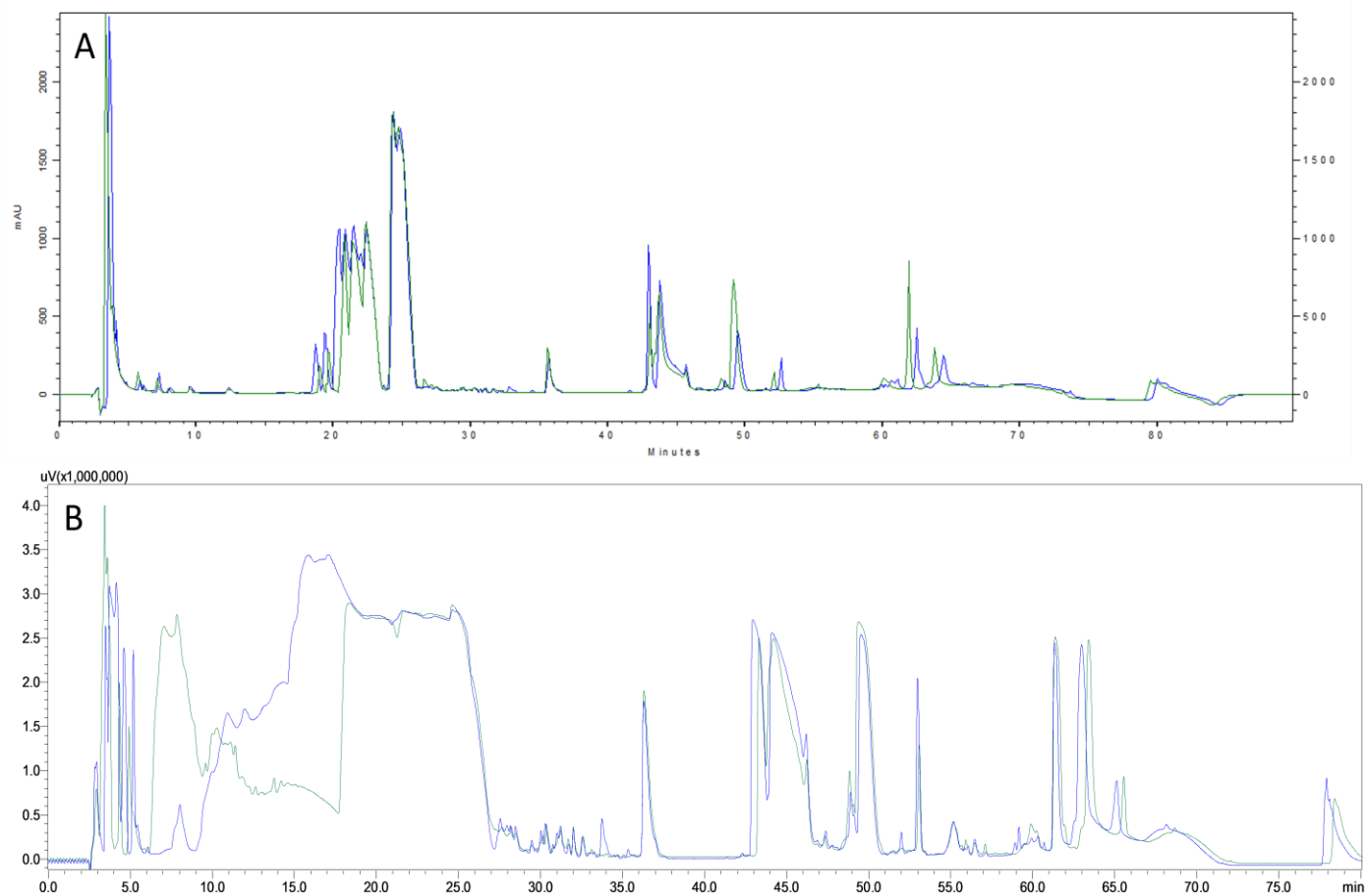


Figure 3 - Characterization of *Lasiadora* sp. venom proteome from Northeastern Region of Brazil by Reverse Phase-HPLC with 0,25 mg (A) or 1 mg (B) of total protein with a Teknokroma C18 column (0.4 cm x 25 cm, 5 μ m). Fractions were collected manually.

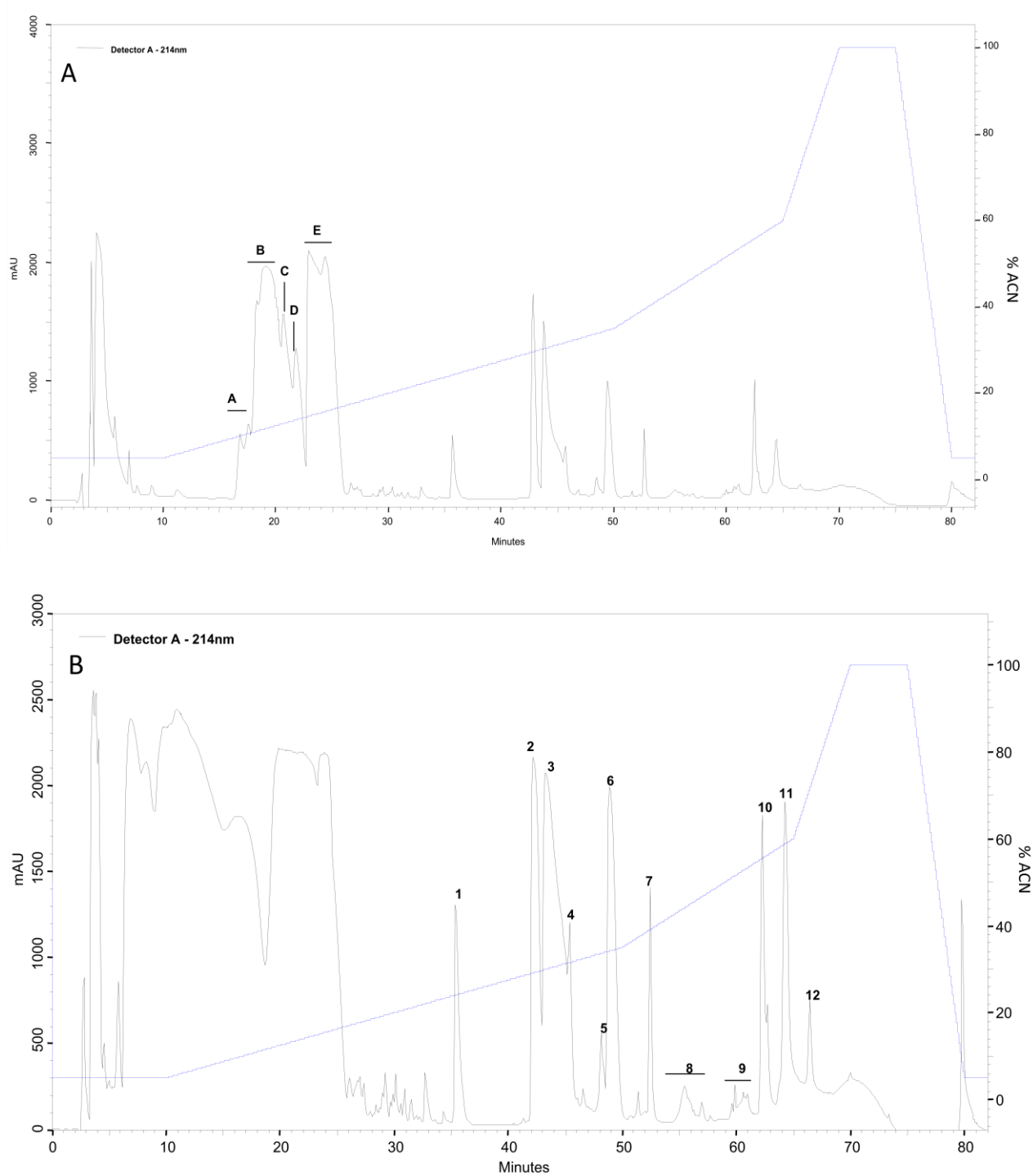
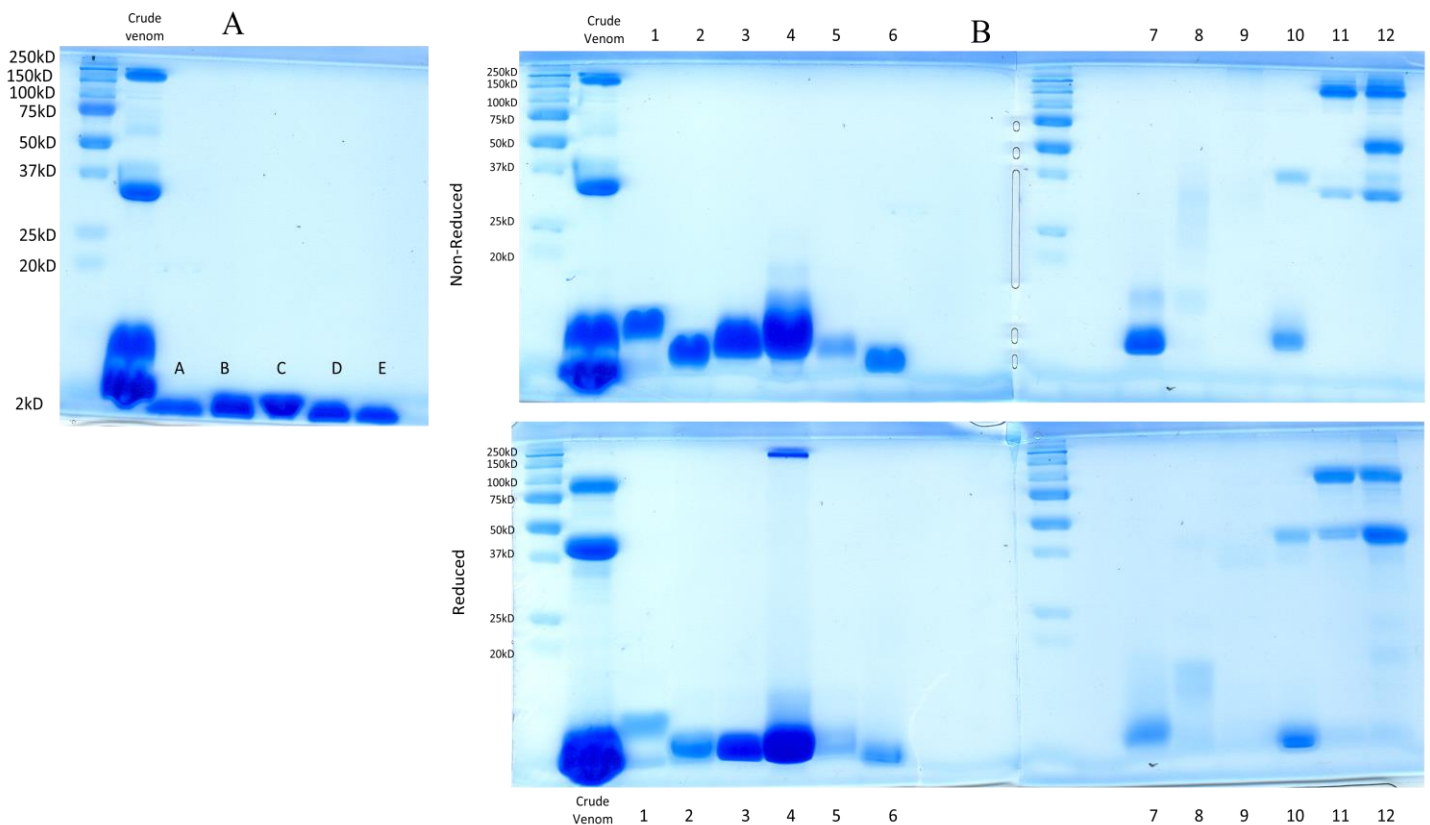


Figure 4 - SDS-PAGE (12%) of Reverse Phase-HPLC isolated fractions under non-reduced (upper gels) and reduced (bottom gels) conditions. First lanes are molecular weight standards (S) followed by crude venom and each named peak from early eluted low molecular weight fractions from 0,25mg chromatographic run (A) and late eluted fractions from 1 mg chromatographic run (B) displayed on figure 3.



8. CONCLUSÕES

O veneno aranha caranguejeira *Lasiodora* sp. foi caracterizado de forma parcial neste trabalho quanto a suas atividades biológicas e composição proteica. O veneno bruto demonstrou atividade biológica antimicrobiana contra fungos e bactérias de interesse médico. O mesmo não promoveu hemólise e apresentou alta citotoxicidade a células mononucleares de sangue periférico, levando a morte celular por apoptose.

Quando testado para atividade termiticida, o veneno bruto não demonstrou toxicidade frente a indivíduos de *Nasutitermes corniger*.

A caracterização da composição proteica do veneno revelou uma mistura complexa, em sua maior parte composta de peptídeos de baixo peso molecular. Entre as moléculas identificadas, 3 ainda não haviam sido descritas compondo o veneno de *Lasiodora* sp. São elas: PLA₂, Hialuronidase e ω -theraphotoxin-Asp3a.

Cruzando informações de venômica e atividades biológicas, o veneno da aranha caranguejeira *Lasiodora* sp, demonstram um grande potencial para pesquisas futuras, na busca de novas biomoléculas para futuras aplicações biotecnológicas.