Dr. José Roberto Aparecido dos Santos-Pinto

Desvendando o arsenal de toxinas presente na seda da teia de aranhas com um estudo de identificação de modificações pós-traducionais - PTMs

Relatório de Pós-doutorado realizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências (IB), Departamento de Biologia Básica e Aplicada, Rio Claro/SP.

Supervisor: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

PNPD/CAPES - Portaria Capes 206 de 2018,

código financeiro 001

Rio Claro
2022

Pós-doutorado - PNPD/CAPES
Relatório Científico (01/2019 a 02/2022)

Desvendando o arsenal de toxinas presente na seda da teia de aranhas com um estudo de identificação de modificações pós-traducionais - PTMs

Resumo

As aranhas dos gêneros *Trichonephila* e *Nephilingis* pertencem ao grupo das aranhas construtoras de teias orbitais, que desenvolveram a capacidade de sintetizar fios adesivos. Esses fios adesivos são encontrados na espiral de captura das teias, e apresentam gotículas oleosas contendo vesículas lipídicas extracelulares que aprisionam em seu interior soluções de proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares. Dentre essas moléculas muitas são toxinas de natureza proteica, e de baixas massas moleculares, as quais podem apresentar ações letais potentes (inseticidas) para as presas capturadas. Portanto, a presença dessas moléculas demonstra que a teia pode desempenhar um papel estratégico "químico-ativo" na captura de suas presas. Porém, até o momento não tem sido considerado a presença de possíveis modificações pós-traducionais (PTMs) que podem atuar sobre a atividade biológica e função dessas moléculas com um potencial em aplicações farmacológicas. As PTMs mais comumente estudadas são a fosforilação, a ubiquitinação, a glicosilação e a hidroxilação. A determinação de PTMs é fundamental para a elucidação de processos que controlam os eventos celulares, como crescimento, divisão e diferenciação celular, incluindo a interação entre proteínas. Dessa forma, o uso de métodos de enriquecimentos de amostras, como o método de enriquecimento de fosforilação, combinado com a análise proteômica utilizando técnicas avançadas de espectrometria de massas, tem progressivamente possibilitado o aumento no número de identificações de PTMs em proteínas e peptídeos presentes em estudos com amostras complexas, como a seda da teia de aranhas. Um estudo com modificações pós-traducionais das toxinas presentes nas teias das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata*, como se pretende no presente projeto, possibilitará obtermos informações biológicas e químicas das características dessas toxinas, contribuindo para uma melhor compreensão sobre a estrutura e uso dessas moléculas em aplicações farmacológicas e como bioinseticida seletivo.

SUMÁRIO

1. Introdução	4
1.1. A seda da teia das aranhas construtoras de teia orbital	4
1.2. Composição bioquímica da seda da teia de aranhas	6
1.3. O estudo das modificações pós-traducionais (PTMs)	8
2. Justificativa	10
3. Objetivos	11
4. Material e métodos	11
4.1 Obtenção da seda da teia das aranhas *Trichonephila clavipes* e *Nephilingis cruentata*	11
4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	11
4.3 Extração das proteínas e peptídeos solúveis da seda	12
4.4 Fracionamento das amostras para a obtenção dos peptídeos de até 3kDa e 10kDa	12
4.5 Quantificação da amostra	12
4.6 Enriquecimento das proteínas/peptídeos fosforilados	12
4.7 Análise proteômica com a estratégia do tipo *shotgun*	13
4.8 Análises de espectrometria de massas	13
4.9 Identificação das proteínas	13
4.10 Identificação das modificações pós-traducionais (PTMs)	14
4.11 Análise proteômica quantitativa label-free	14
4.12 Análise e interpretação dos dados utilizando atribuição funcional por consulta à base do *Gene Ontology* (GO)	14
4.13 Análises de enriquecimento funcional	15
4.14 Outras ferramentas de análises de bioinformática	15
5. Resultados e discussão	16
6. Conclusão	46
7. Referências bibliográficas	46

1. Introdução

1.1. A seda da teia das aranhas construtoras de teia orbital

As aranhas formam um grupo monofilético, cuja monofilia é apoiada pela presença de apêndices abdominais modificados, como fiandeiras, glândulas sericígenas e fúsulas. A ordem Araneae, pertencente ao filo Arthropoda, contém aproximadamente 40 mil espécies de aranhas descritas incluídas em 108 famílias (Platnick, 2008). Dessas 108 famílias encontradas no mundo, 67 são encontradas no Brasil (Brescovit et al., 2004). Dentro da ordem Araneae, pertencente à família Nephilidae estão as aranhas *Nephila clavipes* e *Nephilingis cruentata* (Figura 1), também conhecidas como aranhas construtoras de teia aérea orbital. Recentemente ocorreu uma alteração na taxonomia das aranhas do gênero *Nephila*, com a mudança para o gênero *Trichonephila* (Kallal et al., 2020). A família Nephilidae é composta por 58 espécies, cuja distribuição geográfica é predominantemente subtropical (Kuntner et al., 2013). São aranhas carnívoras, localizando-se nos espaços entre a vegetação e em áreas de florestas nas margens de rios. Também são encontradas em áreas externas às moradias, construindo refúgio junto às paredes próximo de luminárias, o que facilita a captura de presas (Humenik, et al., 2011).

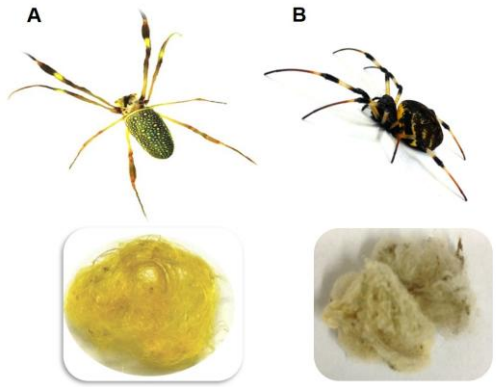


Figura 1. Aranhas construtoras de teia aérea orbital coletadas no campus da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" localizado na cidade de Rio Claro, São Paulo. **A -** seda da teia da aranha *T. clavipes;* **B -** seda da teia da aranha *N. cruentata*.

Durante milhões de anos de evolução, as aranhas tornaram-se eficientes produtoras de seda, atraindo o interesse humano para esse material que apresenta uma notável diversidade em sua composição química, estrutura e função, que vai desde a construção da teia orbital até o casulo. A seda produzida pelas aranhas são filamentos proteicos, constituindo uma interessante relação de estrutura-função e propriedades mecânicas, sendo produzida por um conjunto de glândulas abdominais. Existem vários tipos de glândulas e cada uma é responsável pela produção de um tipo específico de seda (Altman et al., 2003). Até então, tem sido descrito sete tipos diferentes de glândulas produtoras de seda; o número depende do gênero e espécie. As aranhas tecedoras de teias orbitais, como por exemplo, as aranhas dos gêneros *Trichonephila* e *Nephilingis*, possuem um conjunto de glândulas abdominais composto por até sete tipos diferentes de glândulas (Figura 2):

glândulas ampulada maior, ampulada menor, flageliforme, cilindrica ou tubuliforme, aciniforme, piriforme e agregada (Rousseau et al., 2009). Acredita-se que essas diferentes glândulas evoluíram a partir de um único tipo e se divergiram na anatomia, no conteúdo do lúmen e na morfologia (Vollrath, 1992).

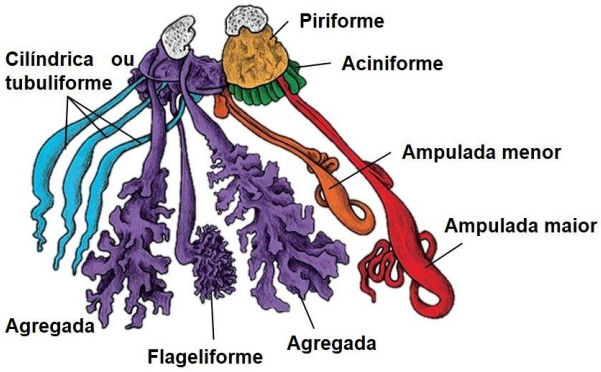


Figura 2. Esquema representativo das glândulas produtoras de seda das aranhas tecedoras de teias orbitais (adaptado de Vollrath, 2000). Tipos de fios de seda e suas respectivas glândulas produtoras.

O processo de fiação é, portanto, uma das principais atividades desenvolvidas pela aranha e está envolvido em cada etapa de sua vida, uma vez que são produzidos até sete tipos diferentes de fibras, conforme representado na figura 3 (Vollrath, 2000; Römer et al., 2008; Rousseau et al., 2009). Os diferentes tipos de fios de seda são comumente nomeados e diferenciados após serem secretados pelas respectivas glândulas; e possuem aplicações em tarefas específicas como captura de presas, reprodução, e como linha de segurança "escape" para fugir de predadores (Vollrath, 2000).

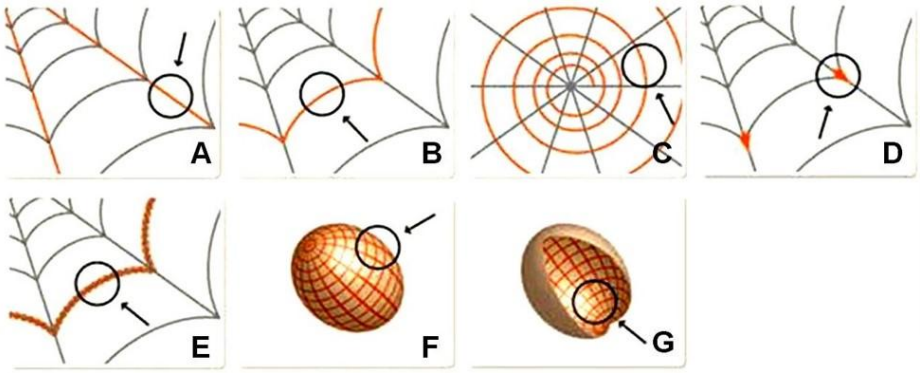


Figura 3. Tipos de fios de seda secretados pelas aranhas tecedoras de teias orbitais. **A** - glândula ampulada maior secreta os fios de seda dos raios da teia orbital, do frame e da linha de segurança "escape"; **B** - glândula flageliforme secreta os fios de seda da espiral de captura; **C** - glândula ampulada menor secreta os fios de seda que auxiliam a espiral de captura; **D** - glândula piriforme secreta os fios de seda das conexões entre as sedas e a fixação sobre um substrato; **E** - glândula agregada secreta um revestimento adesivo aquoso sobre a espiral; **F** - glândula tubuliforme secreta os fios de seda que cobre/protege os ovos externamente (bolsa de seda) após a postura; **G** - glândula aciniforme secreta os fios de seda que protege os ovos internamente (modificado de Römer et al., 2008).

A geometria espacial das teias é constituída macroscopicamente por dois tipos de fios de sedas: um fio radial rígido, o qual estabelece a estrutura primária da teia (também chamado de *frame*), e um fio viscoso situado ao centro, em forma de espiral formado por fibras constituídas pelas proteínas da seda flageliforme, as quais são produzidas pela glândula flageliforme; conhecido como fio de captura, à medida que as fibras axiais são expelidas pela glândula flageliforme, um revestimento bastante viscoso é depositado simultaneamente pela glândula agregada sobre as fibras axiais, formando gotículas, facilmente visíveis a olho nú (Salles et al., 2006; Blackledge, et al., 2009). Estudos com uma abordagem morfológica, realizados por Salles e colaboradores (2006) através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), demonstraram que a teia da aranha *T. clavipes* apresenta gotículas (40 μm Φ) contendo muitas vesículas lipídicas extracelulares (0,4 μm Φ), em suspensão dentro do interior aquoso destas gotículas. Também através de MET juntamente com técnicas de citoquímica, por reações com imidazol e ácido tânico, foi demonstrada a presença de lipídeos e de conteúdo protéico aprisionado por essas vesículas.

Para a captura de suas presas, as aranhas dos gêneros *Trichonephila* e *Nephilingis* utilizam de estratégias nas quais tanto o veneno quanto a teia apresentam papéis relevantes. Uma das principais funções do veneno das aranhas é promover a paralisia ou morte de suas presas, e ainda realizar pré-digestão da presa capturada (Humenik, et al., 2011). Esse veneno é constituído de uma mistura complexa de substâncias, entre as quais a presença de moléculas como peptídeos e proteínas tem sido descritas com propriedades de bioinseticidas, que atuam com uma elevada potência e rapidez na morte de uma grande quantidade de pragas (Vassilevski et al., 2009; Windley et al., 2012; Zhong et al., 2014). E assim como nos venenos de aranhas, estudos tem demonstrado que a seda da teia de aranhas também é composta por proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares. A presença dessas moléculas tem evidenciado que a teia não é uma simples ferramenta para captura mecânica e aprisionamento de presas, mas sim uma complexa estrutura, que parece desempenhar um papel estratégico “químico-ativo” na captura e pré-digestão de suas presas (Salles et al., 2006; Marques et al., 2005; Volsi et al., 2006; Chaw et al., 2015; dos Santos-Pinto et al., 2016a). Sendo assim, o uso de um veneno letal para subjugar as presas, em combinação com a produção de teias facilita a eficiente captura de presas a um gasto mínimo de energia (Langellotto et al., 2004).

1.2. Composição química da seda da teia de aranhas

Além da abordagem morfológica, estudos moleculares e estruturais revelam que a seda da teia da aranha *T. clavipes* é constituída por proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares; e essas moléculas têm demonstrado uma importância

fundamental no que se refere às estratégias químicas adotadas, tanto na defesa da própria aranha quanto na captura de presas.

Sales e colaboradores (2006) relataram a presença de ácidos graxos saturados, insaturados e poliinsaturados, como ácido *(Z)-tetradec-9-enoico; ácido (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoico; ácido (Z)-octadec-9-enoico,* entre outros, presentes nas gotículas da teia da aranha *T. clavipes*. Ainda não se sabe exatamente qual é a função dos ácidos orgânicos presentes na teia de aranhas, porém existem estudos que descrevem a ação de alguns destes ácidos como agentes tensoativos, que auxiliam no processo de desestabilização da cutícula dos artrópodes, atuando como uma ferramenta de captura e/ou defesa (Eisner et al., 1978). Ainda com relação as gotículas presentes na seda da aranha *T. clavipes*, em outros estudos foi demonstrado a presença de neurotransmissores nessas gotículas, tais como N-acetiltaurina, 4-aminobutiramida, glicina, betaína, colina, e putrescina (Higgins, et al., 2001). Em estudos de Maques et al (2005), com a aranha *Trichonephila clavipes*, foi demonstrado que algumas toxinas de baixa massa molecular só são sintetizadas por certas glândulas produtoras de seda e somente depositadas sob a seda da teia em determinados períodos do ano, como primavera e verão ou outono e inverno, de acordo com a dieta da aranha. Um exemplo, são as β-carbonilas que só foram detectadas em amostras coletadas durante os períodos de primavera e verão.

Nos estudos de Chaw et al. (2015), utilizando uma abordagem de transcriptoma foram relatados algumas proteínas como sendo similares aos componentes de venenos relacionadas com a seda presente nas glândulas ampulada maior e menor e na glândula tubuliforme da aranha *Latrodectus hesperus*. Em estudos de dos Santos-Pinto et al. (2016a), realizados em nosso laboratório, utilizando uma abordagem proteômica *bottom-up gel-based* e *gel-free shotgun,* relataram a identificação de algumas toxinas e neurotoxinas comuns em venenos animais como delta-latroinsectotoxin-Lt1a, alpha-latrotoxin-Lt1a, toxin acra I-3, conotoxin MiEr95, and M-lycotoxin-Ls4a, presentes em seis glândulas de seda (ampulada maior e menor, tubuliforme, agregada, flageliforme e aciniforme) da aranha *T. clavipes.* E recentemente, em estudos de Esteves et al. (2020), realizados também em nosso laboratório, evidenciaram por meio de uma análise de proteotranscriptômica a presença de proteínas semelhantes à toxinas e neurotoxinas, defensinas e enzimas proteolíticas presentes na seda da teia da aranha *Trichonephila clavipes*. A presença dessas proteínas nas glândulas produtoras de seda e na seda da teia sugerem que essas proteínas contribuem para a paralisação e captura de presas; dessa forma esses resultados corrobora a hipótese de que a teia da aranha *T. clavipes* desempenha um papel químico-ativo na captura de suas presas.

Até o momento sabe-se muito pouco em relação a composição peptídica da teia de aranhas. Os Peptídeos (definidos como proteínas menores que 10 kDa) são os

componentes dominantes da maioria dos venenos das aranhas, e a principal fonte de sua diversidade farmacológica (King & Hardy, 2013). Essa incrível diversidade química é uma razão pela qual os venenos das aranhas são amplamente utilizados como fontes naturais de processos de descoberta de drogas e inseticidas (Vetter et al., 2011). Volsi e colaboradores (2006) relatam a identificação e a caracterização bioquímica de três peptídeos relacionados à bradicinina (nephilacininas I a III), a partir do extrato aquoso de lavagem da teia da aranha *T. clavipes*, aparentemente utilizados como toxinas para captura de presas. A seda das aranhas dos gêneros *Trichonephila* e *Nephilingis* podem apresentar uma diversidade de peptídeos, como por exemplo, os peptídeos que agem em canais iônicos, descritos nos venenos de aranhas, que ainda não foram identificados nas secreções depositadas sobre as teias. Os venenos de aranha, em particular, são ricos em moduladores de canais de Na (V); sendo que um terço de todas as toxinas conhecidas por agirem sobre os canais de íons, são descritas por agirem sobre os canais de íons Na^+ (V) de vertebrados ou invertebrados. Algumas dessas toxinas tornaram-se ferramentas farmacológicas úteis; enquanto outras apresentam potencial como condutores terapêuticas devido ao fato de se dirigem a subtipos especificos de canais de Na (V), os quais são considerados alvos analgésicos importantes (Klint et al., 2012).

Como se pode notar, os estudos realizados até então utilizando de uma abordagem metabolômica, transcriptômica e proteômica, tem contribuído significativamente para a identificação e caracterização de compostos de baixas massas moleculares, peptídeos e proteínas, que podem apresentar algum potencial farmacológico e biotecnológico, presentes na seda da teia de aranhas; porém esses estudo não tem considerado a possível presença de modificações pós-traducionais nessas moléculas.

1.3. O estudo das modificações pós-traducionais (PTMs)

As PTMs consistem em modificações químicas de proteínas após a tradução, uma ampla estratégia utilizada por células eucarióticas para modificar rapidamente, a atividade local e específica de fatores essenciais em resposta às mudanças ambientais. Estas modificações permitem uma diversificação das atividades das proteínas codificada por todos os organismos aumentando significativamente a diversidade e a complexidade do proteoma (Walsh et al., 2005; Ribet et al., 2010). A determinação de PTMs é fundamental para a elucidação de processos que controlam os eventos celulares, como crescimento, divisão e diferenciação celular, incluindo a interação entre proteínas (Seo et al., 2008). Essas PTMs frequentemente ocorrem em multiplos sítios, podendo ocorrer em muitos resíduos de aminoácidos do mesmo grupo; ou em uma série de cascatas que sao cruciais para a função da proteína (Walsh et al., 2005). Apesar da grande importância da função biológica das modificações pós-traducionais, o seu estudo em larga escala é dificultado pela ausência de

métodos apropriados, e muitas das modificações só foram descobertas mais tarde com a elucidação de vários processos biológicos (Jensen, 2004). Mais de 300 PTMs são conhecidas atualmente. Elas incluem a adição de grupos químicos como, por exemplo, o fosfato ou acetato ou moléculas mais complexas, como carboidratos ou lipídios, a ligação covalente de pequenas proteínas, como a ubiquitina e a modificação de resíduos da cadeia lateral de aminoácidos específicos (Deribe et al., 2010).

As PTMs mais comumente estudadas são a fosforilação, a ubiquitinação, a glicosilação e a hidroxilação. A fosforilação é um das PTMs mais comuns em proteínas e consiste na fixação reversível de um grupo fosfato em um resíduo específico de uma proteína-alvo, atuando na sinalização e na regulação da atividade proteica, assim como também na conformação estrutural. A participação das proteínas quinase e fosfatase é crucial e altamente dinâmica, regulando intensivamente a adição do grupo fosfato, dada pela quinase, ou remoção do mesmo, dada pela fosfatase, em ciclos alternados que podem ocorrer em intervalos de tempo muito curto. Vários tipos de fosforilações têm sido relatados, sendo os mais freqüentes a fosforilação do grupo hidroxila dos resíduos de treonina, serina e tirosina (Johnson e Eyers et al., 2010; Ribet et al., 2010). A glicosilação é também uma das PTMs mais comuns em certas proteínas secretadas de eucariotos contribuindo para atividades biológicas, solubilidade, estabilidade, imunogenicidade, interação célula-célula e resistência às proteases (Steinberg et al., 2001). Trata-se de uma modificação mais complexa com dois principais mecanismos de ligações covalentes: N-glicosilação, no qual a adição de um grupo carboidrato ocorre em um resíduo de asparagina; e O-glicosilação, no qual a adição de um carboidrato ocorre em um resíduo de serina ou treonina (Helenius et al., 2004; Morelle et al., 2007).

Como estão envolvidas na maioria dos processos celulares, incluindo a manutenção da estrutura proteica, as análises das PTMs têm se tornado um grande desafio às pesquisas proteômicas sendo requeridos métodos sensíveis e eficientes para a detecção das PTMs. Porém, a espectrometria de massas (MS) tem demonstrado ser extremamente útil na identificação das PTMs (Mann et al., 2003; Johnson e Eyers et al., 2010). A presença de modificações covalentes em proteínas altera o peso molecular dos aminoácidos modificados, e esse aumento ou perda de massa pode ser detectada pelas análises de MS, as quais apresentam inúmeras vantagens como: alta sensibilidade, capacidade de identificação do local da PTM, possibilita a detecção de novas PTMs, capacidade de identificar PTMs em uma mistura complexa de proteínas, e condiçoes de quantificar as mudanças relativas das PTMs em locais distintos. Nenhuma outra técnica apresenta todas essas vantagens características (Larsen et al., 2006). Não existe uma estratégia universal para identificar as PTMs e todas as abordagens utilizadas apresentam as suas limitações. No entanto, o uso de métodos de enriquecimentos de amostras, como os métodos de

enriquecimento de fosforilação e glicosilação, combinados com a análise proteômica utilizando técnicas avançadas de espectrometria de massas como LC-ESI-MS e nano-ESI-MS/MS, e com diferentes métodos de fragmentação como ETD (Dissociação por Transferência de Elétrons) e CID (Dissociação Induzida por Colisão), tem progressivamente possibilitado o aumento no número de identificações de PTMs em proteínas e peptídeos presentes em estudos com amostras complexas, como a seda da teia de aranhas. E dentro da abordagem proteômica, a estratégia do tipo *shotgun*, ou seja, utilizando uma abordagem *gel-free,* tem se mostrado muito eficiente no aumento do número de identificações de proteínas. Trata-se de um método utilizado para a análise de uma amostra complexa de proteínas sem uma separação prévia; é realizada uma digestão enzimática em solução, e os diversos fragmentos peptídicos gerados podem ser separados e analisados em sistemas como LC-ESI-MS/MS e nano-ESI-MS/MS (Haas et al., 2006; Roepstorff, 2012; Ni et al., 2016).

2. Justificativa

Mediante os estudos já realizados, todas essas moléculas presentes nas teias de aranhas, descritas até então, e suas possíveis atuações, evidenciam que essas teias desempenham um papel “químico-ativo”, estratégico na captura dos mais diversos tipos de presas. E essas moléculas têm sido descritas, com algum potencial em aplicações farmacológicas e biotecnológicas; porém, esses estudos não têm considerado a presença de possíveis PTMs, como a fosforilação, e o quanto essas modificações podem determinar a conformação estrutural, solubilidade, atividade biológica e função dessas moléculas. Um estudo com modificações pós-traducionais das toxinas presentes nas teias das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata*, como se pretende no presente projeto, possibilitará obtermos informações biológicas e químicas das características dessas toxinas, contribuindo para uma melhor compreensão sobre a estrutura e uso dessas moléculas em aplicações farmacológicas e como bioinseticida seletivo.

O projeto proposto se encontra dentro da temática de pesquisas do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do CEIS/IBRC-UNESP, o qual possui experiência na área de caracterização de compostos orgânicos, proteínas e peptídeos em secreções de artrópodes e tem realizado a prospecção química de maneira sistemática, em insetos e aranhas da fauna do Estado de São Paulo, o que tem resultado em uma expressiva contribuição de informações e dados em trabalhos publicados nos mais diversos e renomados periódicos científicos da área de estudo.

3. Objetivos

- Desenvolver preparações de amostras de seda enriquecidas em peptídeos/proteínas fosforilados utilizando o kit High-Select TiO2 Phosphopeptide enrichment;
- Investigar e elucidar o perfil proteômico com um estudo de modificações pós-traducionais (PTMs) das amostras de seda, através da análise proteômica, em um sistema livre de gel*;*
- Realizar a perfilagem química dos peptídeos com um estudo de modificações pós-traducionais (PTMs) das amostras de seda, utilizando a abordagem de sequenciamento d*e novo* de peptídeos;
- Realizar ensaios de *Western blotting* utilizando anticorpos primários anti-fosforilação, para confirmar a ocorrência das fosforilações nas moléculas presentes nas amostras de seda;
- Investigar a toxicidade das amostras tratadas pelo método de enriquecimento de fosforilação através de bioensaios de inseto-toxicidade, utilizando como modelo experimental as abelhas *Apis mellifera;*
- Obter uma melhor compreensão sobre o mecanismo geral de atuação das moléculas identificadas, considerando as PTMs presentes nas amostras;
- Comparar bioquimicamente os resultados obtidos com os dados já descritos na literatura para outros organismos / toxinas animais.

4. Material e Métodos

4.1. Obtenção da seda da teia das aranhas *Nephila clavipes* e *Nephilingis cruentata.* A seda da teia das aranhas *T. clavipes* (recentemente alterado para o gênero *Trichonephila*; Kallal et al., 2020) e *N. cruentata* foram coletadas em regiões rurais das cidades de Cordeirópolis, Santa Gertrudes e Rio Claro, do estado de São Paulo, de maneira georreferenciada.

4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV). A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada com a finalidade de se observar as gotículas depositadas sob os fios da espiral de captura na sua forma íntegra. Os fios da espiral de captura da teia foram colocados sobre a superfície côncava da placa de Petri, ocupando toda a área da placa de forma a manter a integridade dos fios, através de sua suspensão. Posteriormente a placa de Petri foi exposta a vapor de tetróxido de ósmio 4% em água (Milli-Q) durante 20 horas. Em suporte de alumínio, denominados *stub*, foi fixada fita adesiva de carbono dupla face, dessa forma, os fios tratados com ósmio foram inseridos sobre a fita adesiva de carbono dupla face, de modo que permaneceram livremente suspensos, “em forma de ponte”. Os fios de

captura foram examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura (Hitachi, TM-3000).

4.3. Extração das proteínas e peptídeos solúveis da seda. As teias foram coletadas, pesadas e tratadas para a extração das proteínas e dos peptídeos presentes nas fibras e nas gotículas presentes sobre os fios. Para a extração das proteínas a amostra foi tratada em uma solução contendo água com um coquetel de inibidores de protease (Sigma) 0.2% (v/v), PMSF 1mM, e inibidores de fosfatase (Sigma) 0.2% (v/v); enquanto que para a extração dos peptídeos a amostra foi tratada em uma solução contendo acetonitrila 50% (v/v), coquetel de inibidores de protease (Sigma) 0.2% (v/v), PMSF 1mM, e inibidores de fosfatase (Sigma) 0.2% (v/v). Esses tratamentos foram realizados a temperatura ambiente e sob agitação contínua por aproximadamente 4 horas (3 mg de teia/1 mL de solução, em triplicata). Após esse período, as amostras (denominadas de “lavado da teia”) foram centrifugadas à 8000 x g por 15 minutos, com o sobrenadante sendo coletado e filtrado em filtro hidrofóbico de acetato-celulose 0,45 µm (MILLIPORE) e em seguida, liofilizado; os extratos secos resultantes foram armazenados à -20°C, até o momento de serem utilizados.

4.4. Fracionamento das amostras para a obtenção dos peptídeos de até 3kDa e 10kDa. As amostras foram fracionadas através de centrifugação à 8000 x g por 30 minutos em filtros microconcentradores Amicon 3000 e 10000, para a obtenção dos peptídeos que apresentam massas de até 3kDa e 10kDa, respectivamente. Dessa forma foi obtida uma fração de peptídeos de ate 3kDa e uma fração de proteopeptídeos de até 10kDa. Após o fracionamento, as amostras foram quantificadas, liofilizadas e os extratos secos resultantes foram armazenados à -20°C, até o momento de serem utilizados.

4.5. Quantificação da amostra. A quantificação de proteínas e peptídeos das amostras foi determinada pelo kit Qubit® Protein Assay (Life Technologies – Qubit® 3.0 fluorometer), conforme instruções do fabricante

4.6. Enriquecimento das proteínas/peptídeos fosforilados. Com a finalidade de favorecer a identificação das modificações de fosforilação nas proteínas e peptídeos das amostras de sedas, foi realizado o tratamento de enriquecimento das amostras. O enriquecimento de proteínas/peptídeos fosforilados foi realizado utilizando o kit High-Select TiO2 Phosphopeptide enrichment (Thermo Scientific™), conforme as instruções do protocolo do fabricante.

4.7. Análise proteômica com a estratégia do tipo *Shotgun.* Para a realização da estratégia de shotgun, as amostras (400 µg de extrato seco) de proteínas e proteopeptídeos (até 10kDa) enriquecidos, foram solublizadas em bicarbonato de amônio 50mM, pH 7.9 contendo urea 7.5 M, e incubada por 60 min à 25ºC sob leves agitações periódicas. Em seguida foi realizado o tratamento de redução e alquilação com a adição de DTT 10mM por 60 min à 37ºC; e iodoacetamida 40mM também por 60 min à 25ºC. Após esse tratamento a amostra foi diluída cinco vezes com bicarbonato de amônio 100 mM, pH 7.8, contendo cloreto de cálcio 1M. Em seguida foi adicionado tripsina (Promega) 40 ng/µL à 37°C por 16h. A reação de digestão foi interrompida com 5µL de ácido fórmico. A amostra digerida foi dessalinizada utilizando uma coluna SPE C18 (Discovery DSC-18, SUPELCO, Bellefonte, PA, USA) condicionada com ACN/TFA 0.1%. Os peptídeos foram eluídos da coluna com ACN 80%/ TFA 0.1%, secos em s*peedvac* e solubilizados em ACN 50%/ácido fórmico 5% para serem analisados.

4.8. Análises de espectrometria de massas. Para as análises de espectrometria de massas foi utilizado um espectrômetro do tipo µLC-ESI-micrOTOF-Q-III (Bruker Daltonics Bremen, Alemanha), acoplado a um sistema UFLC (Shimadzu) contendo duas bombas LC-20AD e um amostrador automático SIL-20AHT. As amostras em triplicata foram analisadas em um gradiente de 5 a 95% (v/v) ACN, contendo 0.05% (v/v) de ácido fórmico por 120 min, em uma coluna C-18, 12 nm (3 mm id x 100 mm, 2.2 µm) (Shim-pack XR-ODS, Shimadzu). O software HyStar v3.2 (Bruker Daltonics) foi utilizado para o controle de aquisição e análise dos dados, com a eluição dos peptídeos sendo monitorada à 214 nm em um fluxo de 0.2 mL/min. Os dados de MS e MS/MS foram adquiridos em uma faixa de m/z 100 a m/z 3000, em um espectrômetro de massas equipado com uma fonte de ionização “electrospray” (ESI), e analisador de massas híbrido formado pela combinação de sistemas quadrupolo e Time-of-Flight (Q-ToF) (Bruker Daltonics). As análises foram realizadas no modo positivo (ESI+) e contínuo, utilizando o princípio de dissociação de íons CID (dissociação induzida por colisão) e o hélio como gás de colisão, a uma pressão de 100kPa, energia de colisão de 50% e frequência de 30 kHz. Os espectros de massas foram adquiridos e uma lista de picos foi gerada utilizando o software DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics). Antes das análises, o espectrômetro de massas foi calibrado com uma solução calibrante Tune-Mix Electrospray Calibrant (Agilent).

4.9. Identificação das proteínas. Para a identificação das proteínas foi utilizado o servidor MASCOT 2.3.02 (Matrix Science, London, UK) realizando buscas contra bancos de dados Araneae, Arachnida, ArachnoServer database, Scorpiones, Hymenoptera e Conus. Os parâmetros de busca foram utilizados de acordo com a taxonomia do organismo de estudo

(*Metazoa / Other Metazoa*), assim como também conforme dados oriundos durante a manipulação experimental das amostras como o tipo de enzima proteolítica utilizada e possíveis modificações fixas e variáveis que possam ter ocorrido. As proteínas identificadas foram submetidas ao Scaffold 4.3.2 (Proteome Software Inc., Portland, OR) para validar a identificação dos peptídeos e cálculo do FDR - *false discovery rate* (menos que 1%). FDR foi calculado considerando pelo menos duas sequências peptidicas distintas. De acordo com o FDR algoritmo implementado no Scaffold, a probabilidade de identificação dos peptídeos foi ajustada para um mínimo de 99%, enquanto que a probabilidade de identificação das proteínas foi de 95%.

4.10. Identificação das modificações pós-traducionais (PTMs). Os espectros MS^n foram interpretados e uma lista de picos foi gerada utilizando o software DataAnalysis 4.1. Após a identificação das proteínas foi realizada uma pesquisa de erro de tolerância para detectar clivagens inespecíficas não atribuídas às modificações. As modificações de fosforilação que ocorrem nos resíduos de aminoácidos de tirosina (Y), serina (S), e treonina (T) foram selecionadas e adicionados para a busca de PTMs nos fragmentos peptídicos dos espectros de MS^n obtidos experimentalmente. Foram utilizados os softwares BioTools 3.2 (Bruker Daltonics), Peaks studio 7 (complete software for proteomics) e em seguida foi realizada uma análise manual para a confirmação das modificações.

4.11. Análise proteômica quantitativa label-free. A análise quantitativa das toxinas presentes nas sedas das aranhas *N. clavipes* e *N. cruentata* foi baseada na contagem espectral, considerando a contagem de íons totais (TIC) presentes em cada amostra. As análises foram realizadas utilizando réplicas de dados triplicados adquiridos nas análises de MS^n. As réplicas foram combinadas em um único arquivo, o qual foi usado para a consulta nos bancos de dados de proteínas, como descrito anteriormente. As análises estatística e inferencial foram realizadas através do algorítimo do Scaffold 4.3.2 (Proteome Software Inc., Portland, OR); os dados foram normalizados para a contagem de íons totais - TIC dos peptídeos identificados e expressados em abundância de números inteiros agrupados. Dessa forma foi possível verificarmos quais toxinas, estão presentes em uma quantidade maior ou menor em cada amostra de seda analisada.

4.12. Análise e interpretação dos dados utilizando atribuição funcional por consulta à base do *Gene Ontology (GO)*. Com a finalidade de compreender e interpretar os dados proteômicos, a lista das proteínas identificadas foram analisadas e classificadas de acordo com os termos do *Gene Ontology* (componente celular, processo biológico e função molecular), assim como também de acordo com o grupo de família de toxinas/neurotoxinas

ao qual pertence (Schmidt et al., 2014; http://geneontology.org/, The Gene Ontology Consortium, 2015).

4.13. Análises de enriquecimento funcional. Com a finalidade de comparar a abundância das toxinas fosforiladas entre as duas amostras de sedas, de acordo com os termos do *Gene Ontology*, análises de enriquecimento funcional foram realizadas através do algoritimo do FunRich - Functional Enrichment Analysis Tool Web Server 3.1.3 (Pathan et al., 2015). Dessa forma foram realizados análises de enriquecimento para os termos processo biológico, função molecular e componente celular. Foi utilizado a base de dados do UniProtKB contendo dados do Gene Ontology para os taxas Araneae, Arachnida, Scorpiones, Hymenoptera e Conus.

4.14. Outras ferramentas de análises de bioinformática. As análises de *Venn* e de *Heat map* foram realizadas através do algoritimo do FunRich - Functional Enrichment Analysis Tool Web Server 3.1.3 (Pathan et al., 2015).

5. Resultados e discussão

No presente relatório serão apresentados resultados das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos fios das sedas, perfilagem proteômica das toxinas presentes nas sedas, identificação das modificações pós-traducionais (PTMs) de fosforilação, e quantificação proteômica label-free das toxinas identificadas com fosforilação.

Com a finalidade de se obter informações sobre as características estruturais da superfície dos fios da seda, análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas mostrando a ultraestrutura dos fios da seda constituintes da teia orbital das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata* (Figuras 4A-B). Esses resultados mostram as características ultraestruturais dos fios de seda da espiral de captura, e podemos notar a presença de diversas gotículas distribuídas ao longo dos fios da teia; as mesmas apresentaram morfologia externa que variou entre globular e ovóide, com tamanhos de 80 a 120 µm de diâmetro (Φ), distribuídas em intervalos regulares de mais ou menos de 100 µm, ao longo do fio da teia. À medida que as fibras axiais são expelidas pela glândula flageliforme, um revestimento bastante viscoso é depositado simultaneamente pela glândula agregada sobre as fibras axiais, formando essas gotículas (Salles et al., 2006; Blackledge, et al., 2009). Aparentemente essas gotículas apresentam uma camada externa envolvendo o seu interior, fato este comprovado pela simples observação da sua forma regular, mantida mesmo após processamento por MEV.

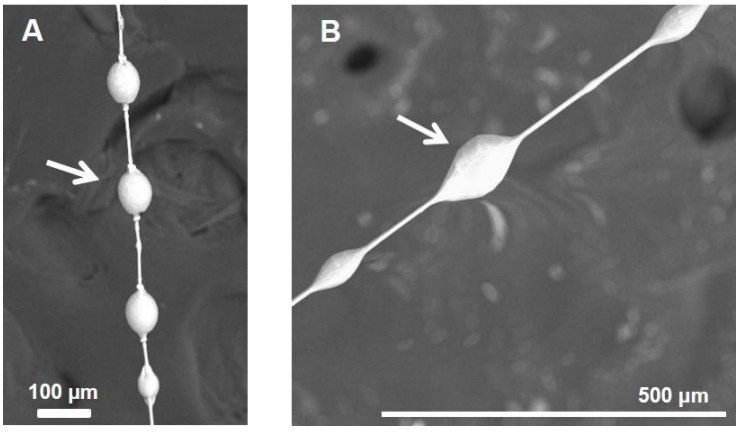


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das gotículas presentes nos fios de seda da teia das aranhas *T. clavipes* **(A)** e *N. cruentata* **(B)**. Ultraestrutura destacando o formato ovóide das gotículas (setas brancas).

Estudos com uma abordagem morfológica, realizados por Salles e colaboradores (2006) através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), demonstraram que a teia da aranha *T. clavipes* apresenta gotículas (40 µm Φ) contendo muitas vesículas lipídicas extracelulares (0,4 µm Φ) em suspensão dentro do interior aquoso destas gotículas. Também através de MET juntamente com técnicas de citoquímica por

imidazol e ácido tânico, foi demonstrado a presença de lipídeos e de conteúdo proteico aprisionado por essas vesículas. Em estudos realizados recentemente (Esteves, 2017 – dissertação de mestrado), também em nosso laboratório com a seda da teia da aranha *N. clavipes*, essas gotículas (50-100μm Φ) foram analisadas por MEV, e as vesículas lipídicas extracelulares presentes no interior das gotículas foram extraidas e analisadas por microscopia de luz (ML). Essas vesículas (0,3-1μm Φ) revelaram aprisionar um conteúdo que possivelmente corresponde ao conteúdo proteico que também foi identificado nos resultados de MET obtidos por Salles e colaboradores (2003). Nos estudos de Esteves (2017), os resultados evidenciaram a presença de vesículas lipídicas extracelulares, as quais são retidas no interior das gotículas, porém não foi possível verificar qual o tipo ou classificar a qual categoria essas vesículas lipídicas pertencem (como por exemplo: lipossomo, exossomo, etc). Porém, utilizando de uma abordagem proteômica, estudos realizados com as glândulas de seda e com a teia da aranha *N. clavipes* demonstraram a identificação de proteínas envolvidas na biogênese, transporte e secreção de exossomos; e a presença destas proteínas consequentemente sugere a possibilidade de que tais vesículas possam ser do tipo exossomos (dos Santos-Pinto et al., 2019).

Os exossomos são vesículas extracelulares originados de vesículas multilamelares (MLVs), com tamanho médio que varia de 40 a 100 nm de diâmetro (Raposo & Stoorvogel, 2013), esses podem aprisionar em seu interior proteínas, lipídeos e até ácidos nucléicos (Cocucci et al., 2009). Além dos exossomos existem outros tipos de vesículas extracelulares, como ectossomos e microvesículas (MVs), as quais são geradas por gemulação da membrana plasmática para o exterior da célula. O tamanho das mesmas varia de 50nm a 1μm de diâmetro (Bobrie et al., 2011). Já os lipossomos são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso (Batista et al., 2007), o tamanho é variável dentro do intervalo de 400 a 3500 nm de diâmetro (Mozafari, 2005). Os exossomos e principalmente os lipossomos são importantes nos estudos de aplicações terapêuticas, pois os mesmos podem aprisionar fármacos ou DNA para experimentos de terapia gênica; e interagem facilmente com a membrana plasmática de muitos tipos de células, introduzindo nelas as moléculas aprisionadas (Alberts et al., 2012). Até o momento, ainda não foi realizado nenhum estudo de caracterização sobre a natureza das vesículas lipídicas extracelulares que estão retidas no interior das gotículas presentes na seda da teia das aranhas do presente estudo. Dessa forma, uma análise mais aprofundada sobre essas gotículas e consequentemente das vesículas lipídicas extracelulares, bem como da sua composição fosfolipídica, se faz necessário para uma melhor compreensão e caracterização sobre a natureza dessas vesículas.

Além da abordagem morfológica, estudos moleculares e estruturais revelam que a seda da teia da aranha *T. clavipes* é constituída por proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares; e essas moléculas têm demonstrado uma importância fundamental no que se refere às estratégias químicas adotadas tanto na defesa quanto na captura de presas. E assim, como no veneno das aranhas, muitos estudos tem relatado a presença de toxinas e neurotoxinas nas fibras da seda produzidas por aranhas (Marques et al., 2005; Salles et al., 2006; Volsi et al., 2006; Zhang et al., 2012; Sanggaard et al., 2014; Chaw et al., 2015; Xu et al., 2016; dos Santos-Pinto et al., 2016a; Esteves, et al., 2020). Esses compostos/toxinas são os mais diversos, sendo descritos como proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares. A presença dessas moléculas tem evidenciado que a teia não é uma simples ferramenta para captura mecânica e aprisionamento de presas, mas sim uma complexa estrutura, que parece desempenhar um papel estratégico "químico-ativo" na captura e pré-digestão de suas presas. Também foram descritos a presença de alguns ácidos graxos na teia (Schulz, 2001; Salles et al., 2006; Esteves, et al., 2020) como possíveis agentes tensoativos, responsáveis pela desestabilização da cutícula de insetos deixando-a mais permeável, o que favorece a penetração e ação de toxinas como as da família das tetrahidro-β-carbolinas, que paralisam e matam as presas como descrito anteriormente por Marques, et al. (2005).

Mediante os dados/resultados já relatados na literatura nos mais diversos estudos com a seda de aranhas, conforme já mencionado acima, as toxinas e neurotoxinas presentes na seda da teia têm sido descritas, com algum potencial em aplicações farmacológicas e biotecnológicas; porém, esses estudos não têm considerado a presença de possíveis PTMs, como a fosforilação, e o quanto essas modificações podem determinar a conformação estrutural, solubilidade, atividade biológica e função dessas moléculas. Sendo assim, decidimos então investigar o perfil proteômico dessas toxinas presentes na seda, em um sistema livre de gel do tipo *shotgun*, com um estudo das PTMs de fosforilações que ocorrem nos resíduos dos aminoácidos serina, treonina e tirosina. Essa investigação possibilitará obtermos informações biológicas e químicas das características dessas toxinas, contribuindo para uma melhor compreensão sobre a estrutura e uso dessas moléculas em aplicações farmacológicas e como bioinseticida seletivo.

Após as análises de espectrometria de massas, das amostras obtidas após o método de enriquecimento de fosforilação, e processamento dos dados, foi possível identificar um total de 81 toxinas fosforiladas na seda da teia da aranha *N. cruentata*; e um total de 76 toxinas fosforiladas na seda da teia da aranha *T. clavipes*. Todas essas proteínas foram inicialmente classificadas de acordo com as funções atribuídas pelas análises no *Gene Ontology – GO* (componente celular, processo biológico e função molecular). Considerando

que a seda da teia é o produto da secreção de difentes glândulas produtoras de seda envolvidas no processo de fiação, é importante considerarmos que a busca por papéis funcionais de proteínas na base de dados GO prevê função molecular, processo biológico, e os componentes celulares (quando a informação está disponível) com base em relatórios de papéis intracelulares destas proteínas. Os papéis funcionais de proteínas secretadas, como as toxinas, não são bem preditos pelas pesquisas de enriquecimento no GO (dos Santos-Pinto et al., 2016a); proteínas secretadas geralmente desempenham apenas papéis individuais no meio extracelular, uma vez que aparentemente, não existem interações como aquelas observadas em rotas metabólicas do citoplasma ou organelas. Sendo assim, decidiu-se assumir a função molecular das proteínas do presente estudo previstas pelas análises GO, por apresentarem atividades de toxinas de acordo com as diferentes famílias de toxinas e neurotoxinas apresentadas pelo GO. Nesse caso, estamos propondo uma adaptação dessa função a um processo biológico específico para a situação de estudo no meio extracelular. Dessa forma, consideramos o processo biológico específico da seda, ou seja, a complexidade das glândulas produtoras de seda e a sua relação com o processo de fiação para a construção da teia, para classificar essas toxinas como proteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas pela teia. Esses resultados estão demonstrados na tabela 1, constando as informações dos dados oriundos da análise proteômica e análise GO.

Tabela 1. Identificação das toxinas/neurotoxinas fosforiladas, presentes na seda da teia das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata*. MW (kDa) - massa molecular; SP1 - *T. clavipes*; SP2 - *N. cruentata*; *PIP % - score, probabilidade de identificação da proteína.

Accession number	Protein name	Taxonomy	MW (kDa)	SP1 *PIP	SP2 *PIP	Biological process	Molecular function	Cellular component	Protein families
C0JB91	Sphingomyelinase D-like toxin SaSicTox-betaIIB1	*Sicarius albospinosus*	32	100%	-	hemolysis in other organism [GO:0044179]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Arthropod phospholipase D family, Class II subfamily
D2Y279	U11-theraphotoxin-Hhn1i	*Haplopelma hainanum*	13	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 14 (magi-1) family, 01 (HNTX-16) subfamily
Q9XZC0	Alpha-Latrocrustotoxin-Lt1a	*Latrodectus tredecimguttatus*	156	100%	-	exocytosis [GO:0006887]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Cationic peptide 01 (latrotoxin) family, 01 (alpha-latrocrustotoxin) subfamily
Q02989	Alpha-Latroinsectotoxin-Lt1a	*Latrodectus tredecimguttatus*	158	100%	100%	exocytosis [GO:0006887]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Cationic peptide 01 (latrotoxin) family, 02 (alpha-latroinsectotoxin) subfamily
Q25338	Delta-Latroinsectotoxin-Lt1a	*Latrodectus tredecimguttatus*	136	100%	100%	exocytosis [GO:0006887]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Cationic peptide 01 (latrotoxin) family, 04 (delta-latroinsectotoxin) subfamily
W4VS53	Cysteine rich secretory protein (CRISP-1)	*Trittame loki*	45	100%	100%	-	-	extracellular region [GO:0005576]	CRISP family
D2Y2M1	U3-theraphotoxin-Hhn1a_3	*Haplopelma hainanum*	10	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 51 (Hntx-8) subfamily, Hntx-8 sub-subfamily
D2Y2M9	U3-theraphotoxin-Hhn1d	*Haplopelma hainanum*	10	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 51 (Hntx-8) subfamily, Hntx-8 sub-subfamily
D2Y249	U3-theraphotoxin-Hhn1a_13	*Haplopelma hainanum*	10	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 51 (Hntx-8) subfamily, Hntx-8 sub-subfamily
D2Y2M6	U3-theraphotoxin-Hhn1a_5	*Haplopelma hainanum*	10	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 51 (Hntx-8) subfamily, Hntx-8 sub-subfamily
D2Y2G9	U3-theraphotoxin-Hhn1p	*Haplopelma hainanum*	10	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 51 (Hntx-8) subfamily, Hntx-8 sub-subfamily
P0CAZ5	M-zodatoxin-Lt8l	*Lachesana tarabaevi*	8	100%	-	defense response to bacterium [GO:0042742]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Cationic peptide 06 (cytoinsectotoxin) family
W4VRY7	U13-barytoxin-Tl1a	*Trittame loki*	14	98%	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 14 (magi-1) family, 05 (ICK-7) subfamily, ICK-7 sub-subfamily
D2Y1Z4	Mu-theraphotoxin-Hhn2a_7	*Haplopelma hainanum*	9	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 15 (Hntx-3) subfamily
A0FKN6	Astacin-like metalloprotease toxin	*Loxosceles intermedia*	30	100%	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	-
P23631	Alpha-Latrotoxin-Lt1a	*Latrodectus tredecimguttatus*	157	96%	100%	exocytosis [GO:0006887]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Cationic peptide 01 (latrotoxin) family, 03 (alpha-latrotoxin) subfamily
D2Y2R3	Omega-theraphotoxin-Hhn2a_3	*Haplopelma hainanum*	7	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 36 family, 02 subfamily
P0CH77	U4-theraphotoxin-Hhn1v	*Haplopelma hainanum*	4	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 12 (Hwtx-2) family, 02 (Hwtx-2) subfamily
A9QQ26	Venom allergen (antigen 5) CRISP-1	*Lycosa singoriensis*	42	-	100%	-	-	extracellular region [GO:0005576]	CRISP family, Venom allergen 5-like subfamily
M5B4R7	Venom protein GTx-TCTP1	*Grammostola rosea*	20	-	100%	-	-	extracellular region [GO:0005576]	TCTP family
M5AYD7	U4-theraphotoxin-Gr1b	*Grammostola rosea*	12	100%	100%	-	-	-	-
H7CEL2	U4-theraphotoxin-Gr1e	*Grammostola rosea*	12	100%	-	-	-	-	-
W4VSB7	U4-barytoxin-Tl1a	*Trittame loki*	10	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 27 (Jztx-72) family, ICK-41 subfamily
B6DCL0	U1-lycotoxin-Ls1i	*Lycosa singoriensis*	12	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 19 (CSTX) family, 04 (U1-Lctx) subfamily
P84000	U10-ctenitoxin-Pr1a	*Phoneutria reidyi*	4	100%	-	pathogenesis [GO:0009405]	ion channel inhibitor activity [GO:0008200]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 02 (plectoxin) family
D2Y2P0	U14-theraphotoxin-Hhn1f	*Haplopelma hainanum*	12	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 25 family, F7 subfamily
S5MFE6	U1-pisautoxin-Dm1e	*Dolomedes mizhoanus*	11	-	100%	-	-	-	-
P0C2S6	U9-ctenitoxin-Pn1a	*Phoneutria nigriventer*	10	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 02 (plectoxin) family, 01 (Tx3) subfamily
B6DD19	U13-lycotoxin-Ls1a_1	*Lycosa singoriensis*	14	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 05 (agouti) family
B3EWF6	U2-zodatoxin-Lt2c	*Lachesana tarabaevi*	13	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 19 (CSTX) family, 11 (latartoxin) subfamily
P0C7S8	Bradykinin-potentiating peptide S (BPP-S)	*Lycosa erythrognatha*	1	100%	-	regulation of blood pressure [GO:0008217]	metalloendopeptidase inhibitor activity [GO:0008191]	extracellular region [GO:0005576]	Bradykinin-potentiating peptide family
P85262	U9-ctenitoxin-Co1a	*Ctenus ornatus*	5	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 03 (Tx2) family, 05 subfamily
P85860	Allergen (antigen 5) CRISP-1	*Phoneutria keyserlingi*	17	-	100%	-	-	extracellular region [GO:0005576]	CRISP family
A3F7X2	U3-theraphotoxin-Lsp1a	*Lasiodora sp.*	13	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 25 family, F7 subfamily
B1P1B4	U6-theraphotoxin-Cg1a	*Chilobrachys guangxiensis*	7	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 36 family, 02 subfamily
P83560	Delta-hexatoxin-Mg1a	*Macrothele gigas*	12	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 06 (delta-actx) family

P61504	U1-segestritoxin-Sf1a	*Segestria florentina*	4	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 16 (SFI) family
Q9BJW0	Omega-hexatoxin-Hi2b	*Hadronyche infensa.*	11	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 15 family, 02 (omega-actx) subfamily
D5J6X8	Putative mature sequence toxin-like ACSKQ	*Pelinobius muticus*	12	100%	100%	-	-	-	-
P58604	U1-ctenitoxin-Cs1a	*Cupiennius salei*	8	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 19 (CSTX) family
B1P1H6	U26-theraphotoxin-Cg1a	*Chilobrachys guangxiensis*	12	100%	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 14 (magi-1) family, 07 (Jztx-56) subfamily
C0JAQ5	Sphingomyelinase D-like toxin LhiSicTox-alphaIA2a	*Loxosceles hirsuta*	30	-	100%	hemolysis in other organism [GO:0044179]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Arthropod phospholipase D family, Class II subfamily
Q7Z1Y7	SphingomyelinaseD (LaSicTox-alphaIB2a)	*Loxosceles arizonica*	36	-	100%	hemolysis in other organism [GO:0044179]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Arthropod phospholipase D family, Class II subfamily
A4USB4	SphingomyelinaseD (LiSicTox-alphaV1)	*Loxosceles intermedia*	35	-	100%	hemolysis in other organism [GO:0044179]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Arthropod phospholipase D family, Class II subfamily, Class IIa sub-subfamily
B6DD13	U12-lycotoxin-Ls1a_1	*Lycosa singoriensis*	10	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 31 family
Q8MTX1	U3-aranetoxin-Ce1a	*Caerostris extrusa*	11	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 20 family
D5J703	U4-theraphotoxin-Pm1a	*Pelinobius mutinous*	11	-	100%	-	-	-	-
Q5D231	U1-hexatoxin-Iw1a	*Hadronyche sp20*	9	100%	-	-	-	extracellular region [GO:0005576]	MIT-like AcTx family
P82601	U1-theraphotoxin-Cv1a	*Coremiocnemis valida*	3	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family
S5MJS8	U15-pisautoxin-Dm1a	*Dolomedes mizhoanus*	13	100%	-	-	-	-	-
Q5Y4X3	U2-agatoxin-Ao1m	*Agelena orientalis*	8	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 01 (U2-agtx) family
P0C244	Kappa/tau-theraphotoxin-Pc1a	*Psalmopoeus cambridgei*	4	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 62 (Vatx) subfamily
P85030	U18-ctenitoxin-Co1b	*Ctenus ornatus*	3	100%	-	-	-	extracellular region [GO:0005576]	U18-CNTX family
B6DCK1	U1-lycotoxin-Ls1b_2	*Lycosa singoriensis*	12	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 19 (CSTX) family, 04 (U1-Lctx) subfamily
B3FIQ7	U10-theraphotoxin-Hs2a	*Haplopelma schmidti*	13	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 14 (magi-1) family, 02 (HWTX-XVIc) subfamily
B1P1F5	U18-theraphotoxin-Cg1a	*Chilobrachys guangxiensis*	8	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 47 subfamily
W4VSH9	U19-barytoxin-Tl1a Kunitz-type serene protease inhibitor	*Trittame loki*	19	-	100%	-	serine-type endopeptidase inhibitor activity [GO:0004867]	extracellular region [GO:0005576]	Venom Kunitz-type family
Q5Y4U5	U4-agatoxin-Ao1a	*Agelena orientalis*	7	-	100%	pathogenesis [GO:0009405]	ion channel inhibitor activity [GO:0008200]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 33 family
M5AXR5	U8-theraphotoxin-Gr1a	*Grammostola rosea*	11	-	100%	-	-	-	-
SRP039535	U18-theraphotoxin-Hs1b_2	*Haplopelma schmidti*	10	100%	-	-	-	-	-
P0C8M0	Omega-Oxotoxin-Ol1a	*Oxyopes lineatus*	8	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Spiderine family, Spiderine subfamily
P81745	Omega-agatoxin-Aa3c	*Agelenopsis aperta*	5	99%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 04 (omega-agtx) family, 03 (type II/III omega-agtx) subfamily
P83251	M-oxotoxin-Ot2d	*Oxyopes takobius*	4	100%	-	defense response to bacterium [GO:0042742]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Cationic peptide 02 (oxyopinin-2) family
B1P1A3	U1-theraphotoxin-Cg1a_1	*Chilobrachys guangxiensis*	7	100%	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 46 (Jztx-7/10/12) subfamily
W4VRV3	U12-barytoxin-Tl1a	*Trittame loki*	15	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 14 (magi-1) family, 04 (ICK-6) subfamily
Q5Y4V7	U3-agatoxin-Ao1b	*Agelena orientalis*	8	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 07 (Beta/delta-agtx) family, 02 (aga-3) subfamily
B3FIS4	U5-theraphotoxin-Hs1a_5	*Haplopelma schmidti*	9	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 51 (Hntx-8) subfamily, Hntx-8 sub-subfamily
M5AWU7	Kappa-theraphotoxin-Gr2c_3	*Grammostola rosea*	10	-	100%	-	-	-	-
P15968	Mu-agatoxin-Hc1c	*Hololena curta*	4	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 07 (Beta/delta-agtx) family, 02 (aga-3) subfamily
D2Y2R4	Omega-theraphotoxin-Hhn2c	*Haplopelma hainanum*	7	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 36 family, 02 subfamily
W4VSI6	U7-barytoxin-Tl1a	*Trittame loki*	10	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 21 family
P84031	U7-ctenitoxin-Pr1a	*Phoneutria reidyi*	7	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 09 (Tx3-6) family
P15969	Omega-agatoxin-Aa1a	*Agelenopsis aperta*	13	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 04 (omega-agtx) family, 01 (type I omega-agtx) subfamily
W4VRV2	U1-barytoxin-Tl1a	*Trittame loki*	13	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 25 family, ICK-8 subfamily
W4VS46	U1-barytoxin-Tl1b	*Trittame loki*	13	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 25 family, ICK-8 subfamily
P81803	U1-hexatoxin-Hv1a	*Hadronyche versuta*	8	-	100%	-	-	extracellular region [GO:0005576]	MIT-like AcTx family
B6DCK5	U1-lycotoxin-Ls1b_6	*Lycosa singoriensis*	12	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 19 (CSTX) family, 04 (U1-Lctx) subfamily
D2Y2Q2	U15-theraphotoxin-Hhn1m Kunitz-type toxin	*Haplopelma hainanum*	10	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Venom Kunitz-type family, 01 (intermediate) subfamily
Q5Y4Y2	U2-agatoxin-Ao1d	*Agelena orientalis*	8	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 01 (U2-agtx) family
B1P1I0	U29-theraphotoxin-Cg1a	*Chilobrachys guangxiensis*	9	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 13 (insecticidal toxin ABC) family, 03 (JZTX-59) subfamily
B1P1J4	U35-theraphotoxin-Cg1a	*Chilobrachys guangxiensis*	15	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	-

S5N3U8	U6-pisautoxin-Dm1a	*Dolomedes mizhoanus*	11	-	100%	-	-	-	-
B6DCY6	U8-lycotoxin-Ls1f	*Lycosa singoriensis*	9	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 19 (CSTX) family, 08 (U8-Lctx) subfamily
B1P1D5	Kappa-theraphotoxin-Cg3a_1	*Chilobrachys guangxiensis*	7	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 44 (Jztx-4) subfamily
P0DJ82	Kappa-theraphotoxin-Hs1c	*Haplopelma schmidti*	10	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Venom Kunitz-type family, 02 (native) subfamily
P11061	Mu-agatoxin-Aa1e	*Agelenopsis aperta*	4	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 07 (Beta/delta-agtx) family, 03 (aga-4) subfamily, Aga sub-subfamily
D2Y235	Mu-theraphotoxin-Hhn1d	*Haplopelma hainanum*	9	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 22 (Htx-4) subfamily
P81790	Omega-ctenitoxin-Pn3a_1	*Phoneutria nigriventer*	13	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 04 (omega-agtx) family, 03 (type II/III omega-agtx) subfamily
ABP63656	Omega-hexatoxin-Ar1d_1	*Atrax robustus*	8	-	100%	-	-	-	-
P0C2V0	M-lycotoxin-Ls4a	*Lycosa singoriensis*	2	100%	-	defense response to bacterium [GO:0042742]	-	extracellular region [GO:0005576]	Cationic peptide 04 (cupiennin) family, 05 subfamily
W4VS49	U11-barytoxin-Tl1b	*Trittame loki*	11	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 10 (Hwtx-1) family, 25 (ICK4) subfamily
B3FIV0	U13-theraphotoxin-Hs1a	*Haplopelma schmidti*	9	100%	-	-	-	-	-
B6DD33	U2-lycotoxin-Ls1e	*Lycosa singoriensis*	12	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 04 (omega-agtx) family, 01 (type I omega-agtx) subfamily
B3FIP1	U8-theraphotoxin-Hs1a	*Haplopelma schmidti*	11	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Neurotoxin 27 (Jztx-72) family, ICK-72 subfamily
C0JB10	Sphingomyelinase D Ls4SicTox-alphaII1i	*Loxosceles sp.*	31	100%	-	hemolysis in other organism [GO:0044179]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Arthropod phospholipase D family, Class I subfamily
B8XGY8	Putative alpha toxin Tx452	*Buthus occitanus israelis*	9	100%	-	defense response [GO:0006952]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Long (4 C-C) scorpion toxin superfamily, Sodium channel inhibitor family
A0A443RU84	Astacin-like metalloprotease toxin	*Leptotrombidium deliense*	14	100%	-	-	metalloendopeptidase activity [GO:0004222]	-	-
A0A2D0PDE2	U10-Eretoxin-Ek1c_1	*Eresus cinnaberinus*	11	100%	-	-	-	-	-
B8XGY3	Putative alpha toxin Tx120	*Buthus occitanus israelis*	9	100%	-	defense response [GO:0006952]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Long (4 C-C) scorpion toxin superfamily, Sodium channel inhibitor family
P56743	Toxin Aah6 Neurotoxin VI	*Androctonus australis*	7	100%	-	defense response [GO:0006952]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Long (4 C-C) scorpion toxin superfamily, Sodium channel inhibitor family
A0A1L4BJA5	Venom toxin	*Hemiscorpius lepturus*	35	-	100%	lipid metabolic process [GO:0006629]	phosphoric diester hydrolase activity [GO:0008081]	-	-
B8XGZ2	Putative alpha toxin Tx644	*Buthus occitanus israelis*	9	99%	-	defense response [GO:0006952]	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Long (4 C-C) scorpion toxin superfamily, Sodium channel inhibitor family
A0A0U4HEU8	Venom protein VP4	*Odontobuthus doriae*	16	100%	-	-	metalloendopeptidase activity [GO:0004222]	-	-
A0A1B3IJ22	Venom peptide HtTxB	*Hadogenes troglodytes*	13	100%	-	-	-	-	-
A0A1B3IJ77	Venom peptide Ht267	*Hadogenes troglodytes*	7	-	99%	-	-	-	-
A0A1E1WWG5	Putative hyaluronidase	*Tityus obscurus*	47	100%	-	carbohydrate metabolic process [GO:0005975]	hyalurononglucosaminidase activity [GO:0004415]	-	Glycosyl hydrolase 56 family
XP_017888027.2	Venom serine protease Bi-VSP-like	*Ceratina calcarata*	45	-	100%	-	-	-	-
XP_029165961.1	Venom acid phosphatase Acph-1-like	*Nylanderia fulva*	48	-	100%	-	-	-	-
B5AJT3	Venom metalloproteinase 2	*Eulophus pennicornis*	47	100%	-	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Venom metalloproteinase (M12B) family
XP_011162023.1	Venom carboxylesterase-6	*Solenopsis invicta*	68	100%	-	-	-	-	-
XP_015121187.1	Venom acid phosphatase Acph-1	*Diachasma alloeum*	42	100%	-	-	-	-	-
XP_029049653.1	Venom carboxylesterase-6-like	*Osmia bicornis bicornis*	63	100%	-	-	-	-	-
A0A140G909	Conotoxin-specific protein disulfide isomerase (cspdi)	*Conus geographus*	56	100%	100%	cell redox homeostasis [GO:0045454]	protein disulfide isomerase activity [GO:0003756]	cell [GO:0005623]	-
A0A140G913	Conotoxin-specific protein disulfide isomerase (cspdi)	*Conus geographus*	56	100%	100%	cell redox homeostasis [GO:0045454]	protein disulfide isomerase activity [GO:0003756]	cell [GO:0005623]	Protein disulfide isomerase family
A0A142C1L	Conotoxin	*Conus betulinus*	10	100%	100%	-	-	-	-
M1F105	O-superfamily conotoxin Br7.6	*Conus brunneus*	10	100%	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	-
A0A291C2J6	Conotoxin	*Conus praecellens*	9	100%	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	-
A0A1P7ZCP7	Conotoxin	*Conus betulinus*	8	100%	100%	-	-	-	-
A0A291C1V5	Conotoxin	*Conus andremenezi*	8	100%	100%	-	-	-	-
A0A346CIX8	Conotoxin precursor superfamily F	*Conus ermineus*	10	100%	100%	-	-	-	-
A0A291C200	Conotoxin	*Conus andremenezi*	10	99%	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	-
A0A291C1S0	Conotoxin	*Conus andremenezi*	10	100%	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	-
A9P3W4	Four-loop conotoxin	*Conus coronatus*	8	95%	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	-
A0A346CJ14	Conotoxin precursor superfamily O1	*Conus ermineus*	6	100%	100%	-	-	-	-
A0A346CIJ9	Conotoxin precursor superfamily O3	*Conus ermineus*	8	100%	100%	-	-	-	-

C8BLR9	Conotoxin Lt12.9	*Conus litteratus*	11	100%	100%	-	-	-	-
P28881	Omega conotoxin SVIB precursor	*Conus striatus*	8	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Conotoxin O1 superfamily
P05484	Omega-conotoxin MVIIA	*Conus magus*	8	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Conotoxin O1 superfamily
K8DWB5	Alpha-conotoxin TxID	*Conus textile*	4	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Conotoxin A superfamily
A0A0K2S5P1	Conotoxin Superfamily O1	*Conus episcopatus*	9	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	-
P0C832	Omega-conotoxin-like S6.7	*Conus striatus*	4	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Conotoxin O1 superfamily
H9N3Q0	Alpha-conotoxin	*Conus diadema*	3	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Conotoxin A superfamily
F5BDH1	Alpha-conotoxin Bt1.91	*Conus betulinus*	7	-	100%	-	toxin activity [GO:0090729]	extracellular region [GO:0005576]	Conotoxin A superfamily

Com a finalidade de comparar a abundância das toxinas fosforiladas entre as duas amostras de sedas, de acordo com os termos do *Gene Ontology*, análises de enriquecimento funcional foram realizadas através do algoritimo do FunRich - Functional Enrichment Analysis Tool Web Server 3.1.3 (Pathan et al., 2015). Esses resultados estão demonstrados nas figuras 5, 6 e 7 destacando as categorias mais abundantes para os termos componente celular, processo biológico e função molecular das toxinas fosforiladas identificadas nas amostras de seda das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata*.

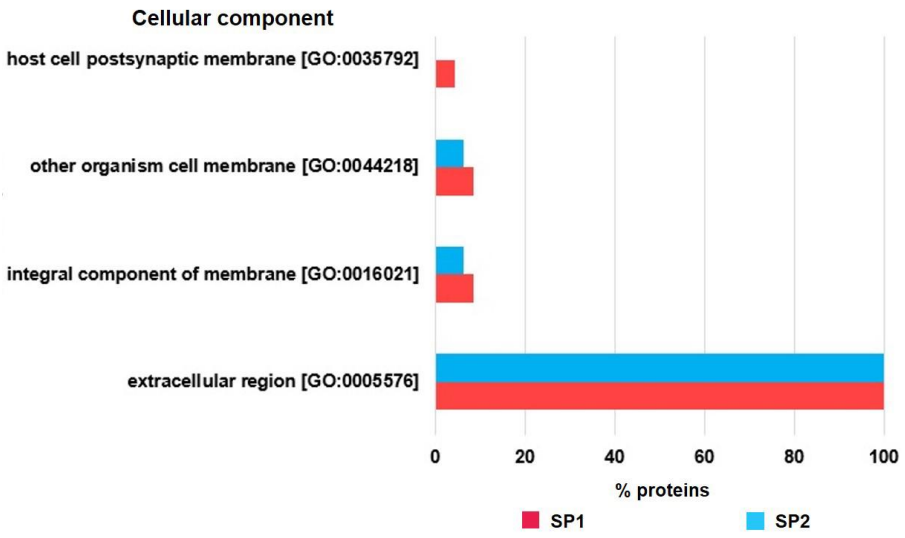


Figura 5. Análise de enriquecimento funcional destacando as categorias mais abundantes para o componente celular das toxinas fosforiladas identificadas nas duas amostras de sedas. SP1 - *T. clavipes*; SP2 - *N. cruentata*.

Podemos notar na figura 5 que, para a análise de enriquecimento para o componente celular a categoria *extracellular region* apresenta 100% das proteínas envolvidas para as duas amostras de sedas, tanto para *T. clavipes* quanto para *N. cruenetata*. Esse resultado só corrobora com o fato de que as toxinas fosforiladas identificadas no presente estudo são secretadas para o meio extracelular onde desenvolvem as suas funções.

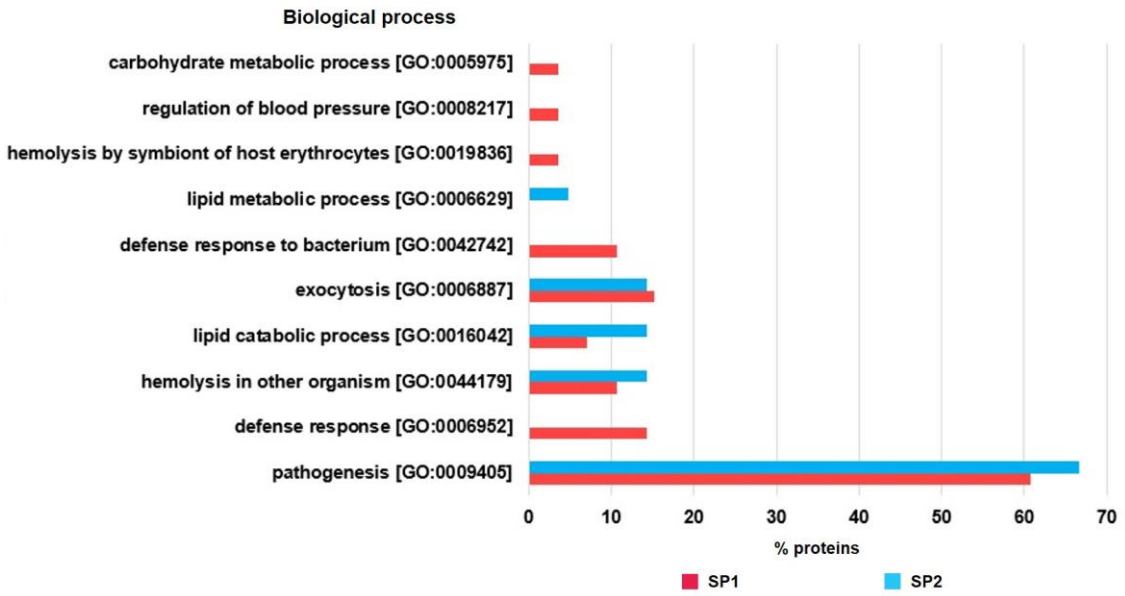


Figura 6. Análise de enriquecimento funcional destacando as categorias mais abundantes para o processo biológico das toxinas fosforiladas identificadas nas duas amostras de sedas. SP1 - *T. clavipes*; SP2 - *N. cruentata*.

Uma vez que os papéis funcionais de proteínas secretadas, como as toxinas, não são bem preditos pelas pesquisas de enriquecimento no GO (dos Santos-Pinto et al., 2016a), todas as toxinas fosforiladas identificadas nas duas amostras de sedas foram classificadas como proteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas pela teia, consideramos assim um processo biológico mais amplo e específico da seda. A figura 6 mostra as categorias mais abundantes para o processo biológico dessas toxinas fosforiladas, dessa forma destacamos que a categoria *pathogenesis* apresenta a maior quantidade de proteínas envolvidas, aproximadamente 61% para *T. clavipes* e 67% para *N. cruentata*. Outras categorias em destaque são: *hemolysis in other organisms* (aproximadamente 11% para *T. clavipes* e 14% para *N. cruentata*), *exocytosis* (aproximadamente 15% para *T. clavipes* e 14% para *N. cruentata*), e *lipid catabolic process* (aproximadamente 7% para *T. clavipes* e 14% para *N. cruentata*). E ainda podemos destacar as categorias *defense response* (aproximadamente 14%) e *defense response to bacterium* (aproximadamente 11%) somente para as toxinas fosforiladas identificadas na seda da aranha *T. clavipes*. Os resultados desse enriquecimento funcional para as amostras de sedas das aranhas do presente estudo, corroboram com o fato de que a maioria das toxinas fosforiladas identificadas apresentam a capacidade de patogênese, ou seja, ocasionar/induzir um estado anormal e geralmente prejudicial nas presas capturadas pela teia das aranhas; assim como também a capacidade de ocasionar hemólise de células em outros organismos. A presença de proteínas defensinas corrobora com a necessidade de preservação da seda da teia, assim como também da presa capturada sob digestão

enzimática contra possíveis infecções por microorganismos. Essas defensinas já foram relatadas como características de venenos animais, assim como também já foram relatadas nas glândulas produtoras de sedas da aranha *T. clavipes* (dos Santos-Pinto et al., 2016a; Esteves et al., 2020).

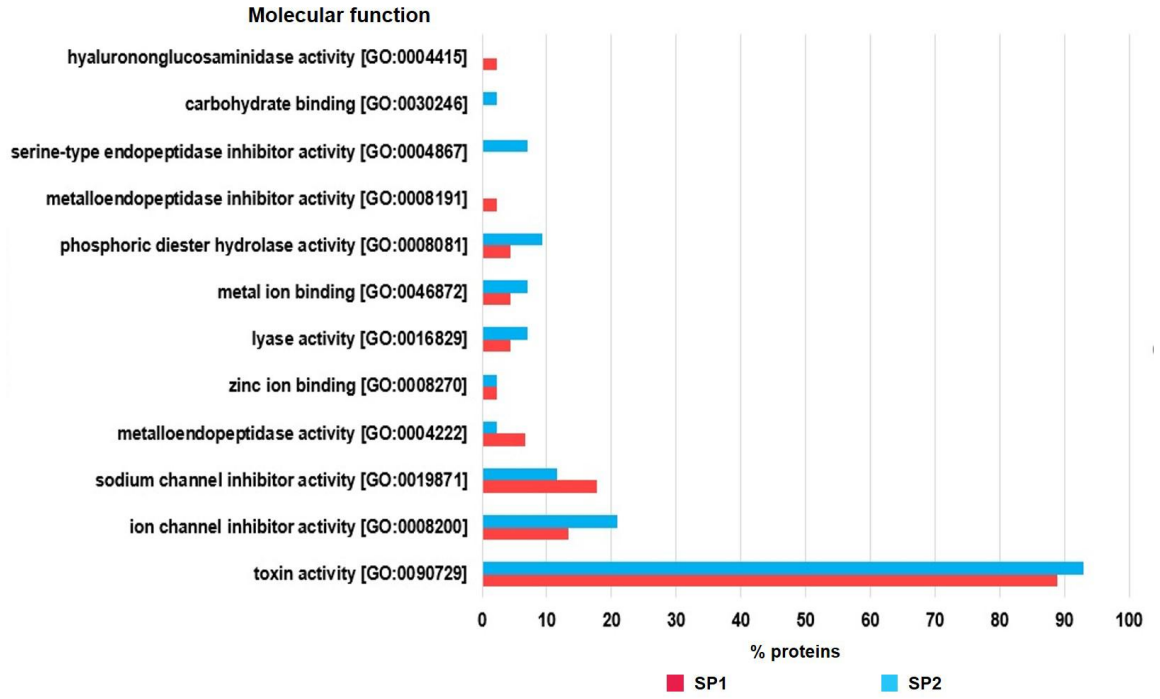


Figura 7. Análise de enriquecimento funcional destacando as categorias mais abundantes para a função molecular das toxinas fosforiladas identificadas nas duas amostras de sedas. SP1 - *T. clavipes*; SP2 - *N. cruentata*.

Conforme mencionado anteriormente, as proteínas secretadas geralmente desempenham apenas papéis individuais no meio extracelular, uma vez que aparentemente, não existem interações como aquelas observadas em rotas metabólicas do citoplasma ou organelas. E conforme demonstrado na análise de enriquecimento funcional para o componente celular (Figura 5), todas as toxinas fosforiladas identificadas no presente estudo são secretadas para o meio extracelular onde desenvolvem as suas funções. Dessa forma, decidiu-se assumir a função molecular das proteínas do presente estudo prevista pela análise de enriquecimento funcioanal, por apresentarem atividades de toxinas de acordo com as diferentes famílias de toxinas e neurotoxinas apresentadas pelo GO. A figura 7 mostra as categorias mais abundantes para a função molecular dessas toxinas fosforiladas, dessa forma destacamos que a categoria *toxin activity* apresenta a maior quantidade de proteínas envolvidas, aproximadamente 88% para *T. clavipes* e 93% para *N. cruentata*. Outras categorias em destaque são: *ion channel inhibitor activity* (aproximadamente 13%

para *T. clavipes* e 21% para *N. cruentata*), *sodium channel inhibitor activity* (aproximadamente 18% para *T. clavipes* e 12% para *N. cruentata*), e *metalloendopeptidase activity* (aproximadamente 7% para *T. clavipes* e 2% para *N. cruentata*). Os resultados desse enriquecimento funcional para as amostras de sedas das aranhas do presente estudo, corroboram com o fato de que a maioria das toxinas fosforiladas identificadas apresentam uma atividade tóxica, além de outras atividades demonstradas pelas categorias do enriquecimento. E assim como nos venenos de aranhas, que podem apresentar uma diversidade de moléculas que agem em canais iônicos (Klint et al., 2012), os nossos resultados do enriquecimento demonstram a presença de toxinas fosforiladas que possivelmente podem atuar em canais iônicos também, principalmente sobre os canais de íons Na+ (V) de vertebrados ou invertebrados. A atuação dessas toxinas presentes na seda, possivelmente, deve auxiliar na estratégia de captura de presas pelas teias das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata*. Essas moléculas têm sido descritas, com algum potencial em aplicações farmacológicas e como bioinseticida seletivo; porém, não tem sido considerado a presença de possíveis PTMs, como a fosforilação, e o quanto essas modificações podem determinar a conformação estrutural, solubilidade, atividade tóxica e função dessas moléculas. E ainda, a presença de proteínas que apresentam a atividade de metaloendopeptidase possivelmente estão envolvidas na pre-digestão das presas capturadas pela teia. Essas proteínas poderiam atuar sinergicamente na pré-digestão da presa, degradando tecidos e, assim, facilitando a entrada de toxinas (dos Santos-Pinto et al., 2016a; Walter et al., 2017). Além disso, podem desempenhar papéis importantes na ativação de toxinas precursoras por meio da clivagem de suas sequências pré-pró (Gremski et al., 2014) e também podem estar envolvidas na causa da toxicidade das presas pela seda da teia (Esteves et al., 2020).

Para a identificação das toxinas foram realizadas pesquisas de buscas contra diferentes bancos de dados como Araneae, Arachnida, ArachnoServer database, Scorpiones, Hymenoptera e Conus. Essa abordagem permitiu a identificação de toxinas de venenos que são comumente relatados em venenos animais como aranhas, escorpiões, insetos e até mesmo organismos marinhos (Tabela 1). A figura 8 mostra a distribuição taxonômica total dos organismos com melhor correspondência das sequências de proteínas identificadas nos bancos de dados. Sendo assim, 72% das seqüências correspondem a taxa Araneae, 16% a taxa Conus, 7% a taxa Scorpiones, 4% a taxa Hymenoptera e 1% para outros organismos.

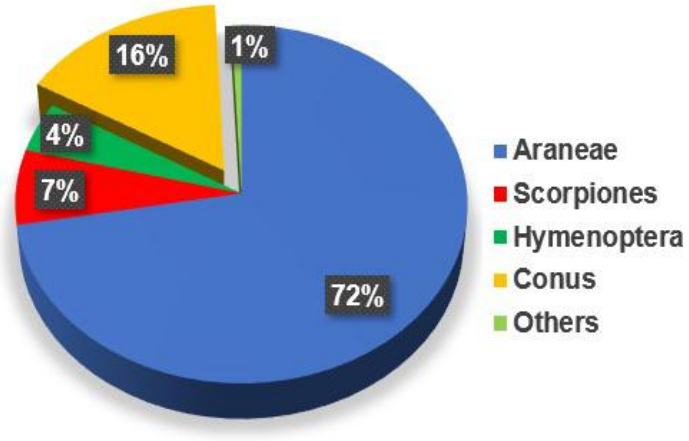


Figura 8. Distribuição taxonômica total dos organismos com melhor correspondência das sequências de toxinas fosforiladas identificadas nas sedas das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata.*

As aranhas representam um dos grupos que possuem um grande número de espécies venenosas (Platnik, N.I. The World Spider Catalog, Version 14.0. [http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html]); e as toxinas identificadas dentro da taxa Araneae contêm componentes representativos de diferentes famílias de aranhas, como:

i) *Sphigomyelinase D* - uma proteína que provoca dermonecrose em mamíferos; é considerada uma proteína de veneno única para as aranhas da família Sicariidae, como as aranhas marrom (gênero *Loxosceles*) e aranhas do gênero *Sicarius*. Esta proteína é utilizada como marcador nos estudos de evolução molecular deste grupo de aranhas (Binford et al., 2009); e provavelmente pode estar envolvida com a pré-digestão das presas capturadas pelas teias;

ii) *Latrotoxins* - constituem uma família de neurotoxinas típicas dos venenos de aranhas Theridiidae (constituídas principalmente pelas viúvas negras - gênero *Latrodectus*); sendo importante na paralisia e captura de presas, e também é utilizada como referência molecular em estudos de evolução molecular deste grupo de aranhas (Garb et al., 2013);

iii) *Zodatoxins* - são toxinas paralisantes, apresentando também ação antimicrobiana, isolada a partir do veneno do *Lachesana tarabaevi* (Jungo et al., 2010);

iv) *Ctenitoxin Pn ou Pk* - peptídeos neurotóxicos presentes no veneno pertencentes a família *Ctenidae* (King et al ., 2008a), neste caso as aranhas *Phoneutria nigriventer (Pn)* e *Phoneutria keyserlingi (Pk)*. As *Ctenitoxin Pn* tem complexos efeitos sobre canais de sódio, seu efeito principal parece ser o retardamento da inativação da corrente de sódio em axónios isolado de insetos (Matavel et al., 2002, de Lima et al., 2002; King et al ., 2008b);

v) *Agatoxins* - classe químicamente diversa de poliaminas e toxinas pepetídicas, as quais são isoladas de aranhas *Agelenopsis sp*. Seu mecanismo de ação inclui bloqueio de

canais iônicos dependentes de glutamato, os canais de sódio dependentes de voltagem, ou canais de cálcio dependentes de voltagem (Uchitel, 1997). Os subtipos *α-agatoxin* e *μ-agatoxin*, tem efeito de rápida paralisia em insetos (Adams , 2004);

vi) Theraphotoxin - proteínas neurotoxicas, isoladas do veneno das aranhas tarantulas da família Theraphosidae. Efeitos de ativação dos canais de potássio, inibição de cainais de sódio, causando o bloqueio da transmissão neuromuscular e paralisia em insetos (Li et al., 2003; Rates et al., 2013; Cherki et al., 2014);

vii) Lycotoxins - constitui uma família de peptídeos antimicrobianos típicos do veneno das aranhas *Lycosa carolinensis* (Yan et al., 1998) e *Lycosa singoriensis* (Budnik et al., 2004)

Os resultados do presente estudo demonstram que as aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata* (Araneidae) estão expressando toxinas (Tabela 1) até então consideradas únicas do ponto de vista evolutivo, de pelo menos dois grupos distantes de aranhas, i.e., *sphingomyelinase-D* da aranha do gênero *Loxosceles* (Sicariidae) e *latrotoxins* da aranha viúva negra do gênero *Latrodectus* (Theriidae). Além disso, essas aranhas também estão expressando toxinas consideradas típicas de outros dois grupos de famílias de aranhas não muito distantes filogeneticamente entre elas, i.e., as *zodatoxins* da aranha *L. tarabaevi* (Zodariidae) e *lycotoxins* da aranha do gênero *Lycosa* da família Lycosidae. Atualmente, existem duas hipóteses sugerindo que as famílias Sicariidae e Theriidae evoluiram independentemente uma da outra (Binford et al., 2009; Garb et al., 2013). Ao invés disso, os resultados do presente estudo estão sugerindo que algumas dessas proteínas podem estar presentes em todas as famílias de aranhas. Hipóteses anteriores foram elaboradas baseadas na presença ou ausência dessas proteínas nos venenos de aranhas; na maioria das investigações anteriores a ocorrência dessas proteínas utilizadas como marcadores moleculares de evolução, não foram investigadas nas glândulas de seda, mas somente nos venenos. Ainda deve ser especulado que, filogeneticamente as aranhas da família Araneidae representam um grupo intermediário entre dois clados mais distantes (Sicariidae and Theriidae) na filogenia das famílias de aranhas (Gregory et al., 2003), e portanto, compartilham características genéticas e bioquímicas comuns entre ambos os extremos.

As toxinas de venenos animais (aranhas, serpentes, escorpiões, moluscos marinhos - *Conus,* e anêmonas) são frequentemente membros de grandes famílias de genes que representam bibliotecas combinatórias naturais; isto é, eles contêm grupos de toxinas que apresentam sequências homólogas (Casewell et al., 2013; Sachkova et al., 2014; Haney et al., 2014). Assim, a evolução molecular de venenos animais pode ser altamente dinâmica e parece ser frequentemente moldada por duplicação de genes e uma forte seleção diversificada, assim como a co-evolução e a convergência (Fry et al., 2006; Binford et al.,

2009; Doley et al., 2009). Dessa forma, as pesquisas de buscas contra diferentes bancos de dados permitiram que, além das identificações das proteínas semelhantes a toxinas de venenos de aranhas, também encontrassemos identificações de proteínas semelhantes às toxinas comumente relatadas em outros venenos animais, como os venenos de organismos marinhos e insetos (Tabela 1).

Os nosssos resultados estão demonstrando que as glândulas produtoras de seda das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata* estão produzindo uma diversidade de proteínas semelhantes às toxinas e neurotoxinas isoladas e caracterizadas originalmente em venenos de aranhas e em outros diferentes venenos/amostras de animais. Estes resultados estão indicando que os genes destas proteínas/peptídeos podem ter evoluído independentemente em todos esses animais. Corroborando esta hipótese é importante mencionar a ocorrência do peptídeo *glacontryphan-M* com 100% de cobertura de sequência presente nas asas da borboleta *Hebomoia glaucippe*, o qual é estrutural e funcionalmente muito semelhante às toxinas peptídicas relatadas nos venenos de *Conus* (Bae et al., 2012). E ainda, devemos mencionar também que nos estudos de Torres e colaboradores (2014), utilizando de uma abordagem de transcriptoma, foram identificados na glândula de veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* transcritos que apresentam resíduos de cisteínas altamente conservados em suas sequências; essas sequências mostraram-se muito similares a diversos tipos de proteínas semelhantes às conotoxinas, como por exemplo, a Mu-conotoxin MrVIB originalmente descrita em venenos de *Conus marmoreus*. Recentemente, utilizando de uma abordagem proteômica *shotgun*, estudos realizados por de Souza e colaboradores (2019) com o veneno da vespa social *Polybia paulista* demonstraram a presença de duas proteínas semelhantes às conotoxinas originalmente descritas em venenos de *Conus*; assim como também de proteínas semelhantes às toxinas/neurotoxinas originalmente descritas em venenos de aranhas e escorpiões.

Considerando a importância da fosforilação e a identificação das toxinas fosforiladas presentes nas amostras de seda, a expressão dessas toxinas foi quantitativamente verificada através da análise de quantificação proteômica *label-free*, baseada na contagem espectral. Nesse caso foi considerando a contagem de íons totais (TIC) presentes em cada amostra para cada toxina identificada, sendo possível realizar uma comparação relativa entre as duas amostras. Os dados foram normalizados para a contagem de íons totais - TIC dos peptídeos identificados e expressados em abundância de números inteiros agrupados. Dessa forma foi possível verificarmos a abundância de cada toxina fosforilada em cada amostra de seda analisada. Esses resultados estão demonstrados na tabela 2, constando as informações dos dados oriundos da análise de quantificação para todas as toxinas fosforiladas identificadas.

Tabela 2. Análise proteômica quantitativa label-free das toxinas/neurotoxinas fosforiladas, presentes na seda da teia das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata*. MW (kDa) - massa molecular; SP1 - *N. clavipes*; SP2 - *N. cruentata*; TIC - contagem de íons totais (contagem espectral) expressados em abundância de números inteiros agrupados; PIP % - score, probabilidade de identificação da proteína.

Accession number	Protein name	Taxonomy	MW (kDa)	Fold Change	SP1_TIC	SP2_TIC	SP1_PIP	SP2_PIP
C0JB91	Sphingomyelinase D-like toxin SaSicTox-betaIIB1	*Sicarius albospinosus*	32	0.0000005	923,23	0,50	100%	-
D2Y279	U11-theraphotoxin-Hhn1i	*Haplopelma hainanum*	13	49000	0,50	24,34	-	100%
Q9XZC0	Alpha-Latrocrustotoxin-Lt1a	*Latrodectus tredecimguttatus*	156	0.000004	140,88	0,50	100%	-
Q02989	Alpha-Latroinsectotoxin-Lt1a	*Latrodectus tredecimguttatus*	158	0.3	218,29	70,03	100%	100%
Q25338	Delta-Latroinsectotoxin-Lt1a	*Latrodectus tredecimguttatus*	136	0.02	368,26	5,82	100%	100%
W4VS53	Cysteine rich secretory protein (CRISP-1)	*Trittame loki*	45	0.007	755,56	5,39	100%	100%
D2Y2M1	U3-theraphotoxin-Hhn1a_3	*Haplopelma hainanum*	10	0.0000010	506,80	0,50	100%	-
D2Y2M9	U3-theraphotoxin-Hhn1d	*Haplopelma hainanum*	10	0.0000006	866,68	0,50	100%	-
D2Y249	U3-theraphotoxin-Hhn1a_13	*Haplopelma hainanum*	10	0.003	0,50	2,30	-	100%
D2Y2M6	U3-theraphotoxin-Hhn1a_5	*Haplopelma hainanum*	10	0.10	0,50	83,20	-	100%
D2Y2G9	U3-theraphotoxin-Hhn1p	*Haplopelma hainanum*	10	0.3	0,50	246,02	-	100%
P0CAZ5	M-zodatoxin-Lt8l	*Lachesana tarabaevi*	8	0.000005	110,09	0,50	100%	-
W4VRY7	U13-barytoxin-Tl1a	*Trittame loki*	14	95000	0,50	47,49	98%	100%
D2Y1Z4	Mu-theraphotoxin-Hhn2a_7	*Haplopelma hainanum*	9	9.4	0,50	195,72	-	100%
A0FKN6	Astacin-like metalloprotease toxin	*Loxosceles intermedia*	30	310000	0,50	154,29	100%	100%
P23631	Alpha-Latrotoxin-Lt1a	*Latrodectus tredecimguttatus*	157	1.9	48,43	91,08	96%	100%
D2Y2R3	Omega-theraphotoxin-Hhn2a_3	*Haplopelma hainanum*	7	0.000003	195,37	0,50	100%	-
P0CH77	U4-theraphotoxin-Hhn1v	*Haplopelma hainanum*	4	0.000001	414,31	0,50	100%	-
A9QQ26	Venom allergen (antigen 5) CRISP-1	*Lycosa singoriensis*	42	12000	0,50	5,85	-	100%
M5B4R7	Venom protein GTx-TCTP1	*Grammostola rosea*	20	190000	0,50	93,18	-	100%
M5AYD7	U4-theraphotoxin-Gr1b	*Grammostola rosea*	12	0.2	122,97	30,52	100%	100%
H7CEL2	U4-theraphotoxin-Gr1e	*Grammostola rosea*	12	0.00002	23,67	0,50	100%	-
W4VSB7	U4-barytoxin-Tl1a	*Trittame loki*	10	0.000002	243,21	0,50	100%	-
B6DCL0	U1-lycotoxin-Ls1i	*Lycosa singoriensis*	12	0.00002	24,42	0,50	100%	-
P84000	U10-ctenitoxin-Pr1a	*Phoneutria reidyi*	4	0.00001	46,04	0,50	100%	-
D2Y2P0	U14-theraphotoxin-Hhn1f	*Haplopelma hainanum*	12	0.0000008	639,93	0,50	100%	-
S5MFE6	U1-pisautoxin-Dm1e	*Dolomedes mizhoanus*	11	27000	0,50	13,61	-	100%
P0C2S6	U9-ctenitoxin-Pn1a	*Phoneutria nigriventer*	10	0.00002	26,02	0,50	100%	-
B6DD19	U13-lycotoxin-Ls1a_1	*Lycosa singoriensis*	14	0.00002	29,77	0,50	100%	-
B3EWF6	U2-zodatoxin-Lt2c	*Lachesana tarabaevi*	13	0.00003	18,08	0,50	100%	-
P0C7S8	Bradykinin-potentiating peptide S (BPP-S)	*Lycosa erythrognatha*	1	0.000003	183,89	0,50	100%	-
P85262	U9-ctenitoxin-Co1a	*Ctenus ornatus*	5	0.000001	454,48	0,50	100%	-
P85860	Allergen (antigen 5) CRISP-1	*Phoneutria keyserlingi*	17	43000	0,50	21,65	-	100%
A3F7X2	U3-theraphotoxin-Lsp1a	*Lasiodora sp.*	13	5800	0,50	2,89	-	100%
B1P1B4	U6-theraphotoxin-Cg1a	*Chilobrachys guangxiensis*	7	8700	0,50	4,35	-	100%

P83560	Delta-hexatoxin-Mg1a	*Macrothele gigas*	12	0.00004	11,57	0,50	100%	-
P61504	U1-segestritoxin-Sf1a	*Segestria florentina*	4	0.000004	142,31	0,50	100%	-
Q9BJW0	Omega-hexatoxin-Hi2b	*Hadronyche infensa.*	11	0.00001	43,77	0,50	100%	-
D5J6X8	Putative mature sequence toxin-like ACSKQ	*Pelinobius muticus*	12	150000	0,50	77,04	100%	100%
P58604	U1-ctenitoxin-Cs1a	*Cupiennius salei*	8	0.00005	10,82	0,50	100%	-
B1P1H6	U26-theraphotoxin-Cg1a	*Chilobrachys guangxiensis*	12	56000	0,50	27,88	100%	100%
C0JAQ5	Sphingomyelinase D-like toxin LhiSicTox-alphaIA2a	*Loxosceles hirsuta*	30	150000	0,50	74,74	-	100%
Q7Z1Y7	SphingomyelinaseD (LaSicTox-alphaIB2a)	*Loxosceles arizonica*	36	88000	0,50	44,25	-	100%
A4USB4	SphingomyelinaseD (LiSicTox-alphaV1)	*Loxosceles intermedia*	35	280000	0,50	142,35	-	100%
B6DD13	U12-lycotoxin-Ls1a_1	*Lycosa singoriensis*	10	250000	0,50	122,85	-	100%
Q8MTX1	U3-aranetoxin-Ce1a	*Caerostris extrusa*	11	21000	0,50	10,55	-	100%
D5J703	U4-theraphotoxin-Pm1a	*Pelinobius mutinous*	11	67000	0,50	33,63	-	100%
Q5D231	U1-hexatoxin-Iw1a	*Hadronyche sp20*	9	0.000004	111,53	0,50	100%	-
P82601	U1-theraphotoxin-Cv1a	*Coremiocnemis valida*	3	0.0000004	1,16	0,50	100%	-
S5MJS8	U15-pisautoxin-Dm1a	*Dolomedes mizhoanus*	13	0.000002	248,12	0,50	100%	-
Q5Y4X3	U2-agatoxin-Ao1m	*Agelena orientalis*	8	66000	0,50	32,79	-	100%
P0C244	Kappa/tau-theraphotoxin-Pc1a	*Psalmopoeus cambridgei*	4	0.000007	72,05	0,50	100%	-
P85030	U18-ctenitoxin-Co1b	*Ctenus ornatus*	3	0.0000008	610,56	0,50	100%	-
B6DCK1	U1-lycotoxin-Ls1b_2	*Lycosa singoriensis*	12	110000	0,50	53,12	-	100%
B3FIQ7	U10-theraphotoxin-Hs2a	*Haplopelma schmidti*	13	180000	0,50	88,41	-	100%
B1P1F5	U18-theraphotoxin-Cg1a	*Chilobrachys guangxiensis*	8	310000	0,50	156,24	-	100%
W4VSH9	U19-barytoxin-Tl1a Kunitz-type serene protease inhibitor	*Trittame loki*	19	57000	0,50	28,27	-	100%
Q5Y4U5	U4-agatoxin-Ao1a	*Agelena orientalis*	7	150000	0,50	73,08	-	100%
M5AXR5	U8-theraphotoxin-Gr1a	*Grammostola rosea*	11	160000	0,50	82,23	-	100%
SRP039535	U18-theraphotoxin-Hs1b_2	*Haplopelma schmidti*	10	0.000007	68,61	0,50	100%	-
P0C8M0	Omega-Oxotoxin-Ol1a	*Oxyopes lineatus*	8	0.000003	160,43	0,50	100%	-
P81745	Omega-agatoxin-Aa3c	*Agelenopsis aperta*	5	0.00002	30,30	0,50	99%	-
P83251	M-oxotoxin-Ot2d	*Oxyopes takobius*	4	0.000002	212,42	0,50	100%	-
B1P1A3	U1-theraphotoxin-Cg1a_1	*Chilobrachys guangxiensis*	7	8100	0,50	4,06	100%	100%
W4VRV3	U12-barytoxin-Tl1a	*Trittame loki*	15	3100	0,50	1,54	-	100%
Q5Y4V7	U3-agatoxin-Ao1b	*Agelena orientalis*	8	35000	0,50	17,54	-	100%
B3FIS4	U5-theraphotoxin-Hs1a_5	*Haplopelma schmidti*	9	41000	0,50	20,32	-	100%
M5AWU7	Kappa-theraphotoxin-Gr2c_3	*Grammostola rosea*	10	640	0,50	320,23	-	100%
P15968	Mu-agatoxin-Hc1c	*Hololena curta*	4	140000	0,50	71,78	-	100%
D2Y2R4	Omega-theraphotoxin-Hhn2c	*Haplopelma hainanum*	7	42000	0,50	21,05	-	100%
W4VSI6	U7-barytoxin-Tl1a	*Trittame loki*	10	0.00004	12,86	0,50	100%	-
P84031	U7-ctenitoxin-Pr1a	*Phoneutria reidyi*	7	0.000004	130,90	0,50	100%	-
P15969	Omega-agatoxin-Aa1a	*Agelenopsis aperta*	13	0.0000003	1,52	0,50	100%	-
W4VRV2	U1-barytoxin-Tl1a	*Trittame loki*	13	3500	0,50	1,73	-	100%
W4VS46	U1-barytoxin-Tl1b	*Trittame loki*	13	4700	0,50	2,36	-	100%
P81803	U1-hexatoxin-Hv1a	*Hadronyche versuta*	8	16000	0,50	7,95	-	100%
B6DCK5	U1-lycotoxin-Ls1b_6	*Lycosa singoriensis*	12	39000	0,50	19,38	-	100%
D2Y2Q2	U15-theraphotoxin-Hhn1m Kunitz-type toxin	*Haplopelma hainanum*	10	110000	0,50	57,23	-	100%
Q5Y4Y2	U2-agatoxin-Ao1d	*Agelena orientalis*	8	19000	0,50	9,36	-	100%

B1P1I0	U29-theraphotoxin-Cg1a	*Chilobrachys guangxiensis*	9	51000	0,50	25,52	-	100%
B1P1J4	U35-theraphotoxin-Cg1a	*Chilobrachys guangxiensis*	15	2000	0,50	979,75	-	100%
S5N3U8	U6-pisautoxin-Dm1a	*Dolomedes mizhoanus*	11	15000	0,50	7,62	-	100%
B6DCY6	U8-lycotoxin-Ls1f	*Lycosa singoriensis*	9	310000	0,50	156,10	-	100%
B1P1D5	Kappa-theraphotoxin-Cg3a_1	*Chilobrachys guangxiensis*	7	140000	0,50	70,32	-	100%
P0DJ82	Kappa-theraphotoxin-Hs1c	*Haplopelma schmidti*	10	28000	0,50	13,81	-	100%
P11061	Mu-agatoxin-Aa1e	*Agelenopsis aperta*	4	2300	0,50	1,15	-	100%
D2Y235	Mu-theraphotoxin-Hhn1d	*Haplopelma hainanum*	9	140000	0,50	68,11	-	100%
P81790	Omega-ctenitoxin-Pn3a_1	*Phoneutria nigriventer*	13	9700	0,50	4,84	-	100%
ABP63656	Omega-hexatoxin-Ar1d_1	*Atrax robustus*	8	32000	0,50	15,76	-	100%
P0C2V0	M-lycotoxin-Ls4a	*Lycosa singoriensis*	2	0.00002	29,72	0,50	100%	-
W4VS49	U11-barytoxin-Tl1b	*Trittame loki*	11	0.7	48,59	0,50	100%	-
B3FIV0	U13-theraphotoxin-Hs1a	*Haplopelma schmidti*	9	0.00004	11,96	0,50	100%	-
B6DD33	U2-lycotoxin-Ls1e	*Lycosa singoriensis*	12	0.00001	43,63	0,50	100%	-
B3FIP1	U8-theraphotoxin-Hs1a	*Haplopelma schmidti*	11	0.00004	11,56	0,50	100%	-
C0JB10	Sphingomyelinase D Ls4SicTox-alphaIII1i	*Loxosceles sp.*	31	0.00001	36,61	0,50	100%	-
B8XGY8	Putative alpha toxin Tx452	*Buthus occitanus israelis*	9	0.00003	17,77	0,50	100%	-
A0A443RU84	Astacin-like metalloprotease toxin	*Leptotrombidium deliense*	14	0.00010	5,19	0,50	100%	-
A0A2D0PDE2	U10-Eretoxin-Ek1c_1	*Eresus cinnaberinus*	11	0.00002	22,04	0,50	100%	-
B8XGY3	Putative alpha toxin Tx120	*Buthus occitanus israelis*	9	0.00004	12,63	0,50	100%	-
P56743	Toxin Aah6 Neurotoxin VI	*Androctonus australis*	7	0.000006	81,41	0,50	100%	-
A0A1L4BJA5	Venom toxin	*Hemiscorpius lepturus*	35	39000	0,50	19,57	-	100%
B8XGZ2	Putative alpha toxin Tx644	*Buthus occitanus israelis*	9	0.00003	15,73	0,50	99%	-
A0A0U4HEU8	Venom protein VP4	*Odontobuthus doriae*	16	0.0002	3,09	0,50	100%	-
A0A1B3IJ22	Venom peptide HtTxB	*Hadogenes troglodytes*	13	0.000009	57,31	0,50	100%	-
A0A1B3IJ77	Venom peptide Ht267	*Hadogenes troglodytes*	7	340000	0,50	172,43	-	99%
A0A1E1WWG5	Putative hyaluronidase	*Tityus obscurus*	47	0.0003	1,97	0,50	100%	-
XP_017888027.2	Venom serine protease Bi-VSP-like	*Ceratina calcarata*	45	96000	0,50	47,85	-	100%
XP_029165961.1	Venom acid phosphatase Acph-1-like	*Nylanderia fulva*	48	2500	0,50	1,27	-	100%
B5AJT3	Venom metalloproteinase 2	*Eulophus pennicornis*	47	0.0003	1,64	0,50	100%	-
XP_011162023.1	Venom carboxylesterase-6	*Solenopsis invicta*	68	0.0002	2,45	0,50	100%	-
XP_015121187.1	Venom acid phosphatase Acph-1	*Diachasma alloeum*	42	0.000005	103,46	0,50	100%	-
XP_029049653.1	Venom carboxylesterase-6-like	*Osmia bicornis bicornis*	63	0.00003	18,24	0,50	100%	-
A0A140G909	Conotoxin-specific protein disulfide isomerase (cspdi)	*Conus geographus*	56	2.7	32,89	90,27	100%	100%
A0A140G913	Conotoxin-specific protein disulfide isomerase (cspdi)	*Conus geographus*	56	0.2	335,26	59,70	100%	100%
A0A142C1L	Conotoxin	*Conus betulinus*	10	0.02	1,37	24,92	100%	100%
M1F105	O-superfamily conotoxin Br7.6	*Conus brunneus*	10	9.0	71,15	638,07	100%	100%
A0A291C2J6	Conotoxin	*Conus praecellens*	9	140000	0,50	72,30	100%	100%
A0A1P7ZCP7	Conotoxin	*Conus betulinus*	8	0.07	206,69	13,55	100%	100%
A0A291C1V5	Conotoxin	*Conus andremenezi*	8	0.5	119,71	56,37	100%	100%
A0A346ClX8	Conotoxin precursor superfamily F	*Conus ermineus*	10	120000	0,50	62,11	100%	100%
A0A291C200	Conotoxin	*Conus andremenezi*	10	1.5	176,97	259,82	99%	100%
A0A291C1S0	Conotoxin	*Conus andremenezi*	10	0.1	248,93	35,57	100%	100%
A9P3W4	Four-loop conotoxin	*Conus coronatus*	8	64000	0,50	31,81	95%	100%

A0A346CJ14	Conotoxin precursor superfamily O1	*Conus ermineus*	6	0.2	708,53	110,87	100%	100%
A0A346CIJ9	Conotoxin precursor superfamily O3	*Conus ermineus*	8	0.7	61,72	43,41	100%	100%
C8BLR9	Conotoxin Lt12.9	*Conus litteratus*	11	6.7	23,80	158,34	100%	100%
P28881	Omega conotoxin SVIB precursor	*Conus striatus*	8	260000	0,50	127,58	-	100%
P05484	Omega-conotoxin MVIIA	*Conus magus*	8	190000	0,50	93,12	-	100%
K8DWB5	Alpha-conotoxin TxID	*Conus textile*	4	100000	0,50	51,99	-	100%
A0A0K2S5P1	Conotoxin Superfamily O1	*Conus episcopatus*	9	160000	0,50	82,31	-	100%
P0C832	Omega-conotoxin-like S6.7	*Conus striatus*	4	37000	0,50	18,30	-	100%
H9N3Q0	Alpha-conotoxin	*Conus diadema*	3	220000	0,50	112,42	-	100%
F5BDH1	Alpha-conotoxin Bt1.91	*Conus betulinus*	7	140000	0,50	68,20	-	100%

O diagrama de Venn, demonstrado na figura 9A, apresenta uma análise de comparação das toxinas fosforiladas identificadas nas sedas das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata*. Para essa análise foram considerados os códigos de acesso das diferentes proteoformas identificadas e depositadas nos bancos de dados. Sendo assim, a mesma proteína pode apresentar diferentes códigos de acesso, e na nossa análise comparativa somente as proteínas com o mesmo código de acesso serão denominadas como comuns entre as duas amostras. A intersecção entre as duas amostras de sedas – *T. clavipes* ∩ *N. cruentata*, demonstrou que 24 toxinas são comuns entre as duas amostras, conforme demostrado na tabela 1. E a figura 9B mostra a abundância de expressão das 24 toxinas fosforiladas e compartilhadas entres as duas amostras de sedas através da distribuição da intensidade pelo mapa de calor. Para verificar o código de acesso e dados quantitativos das toxinas, olhar a tabela 2.

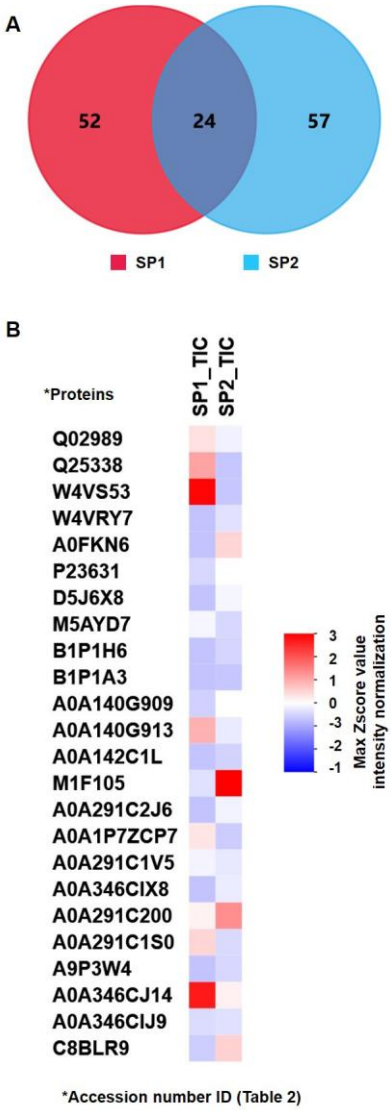


Figura 9. A - Diagrama de Venn destacando as toxinas fosforiladas identificadas e que são compartilhadas (que apresentam o mesmo código de acesso) entre as duas amostras de sedas. **B -** *Heat map* dos dados de quantificação destacando as toxinas fosforiladas e compartilhadas entre as duas amostras de seda. SP1 - *T. clavipes*; SP2 - *N. cruentata*; TIC - contagem de íons totais.

As figuras 10 e 11 demonstram a quantificação das toxinas fosforiladas mais abundantes identificadas nas sedas das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata*, respectivamente.

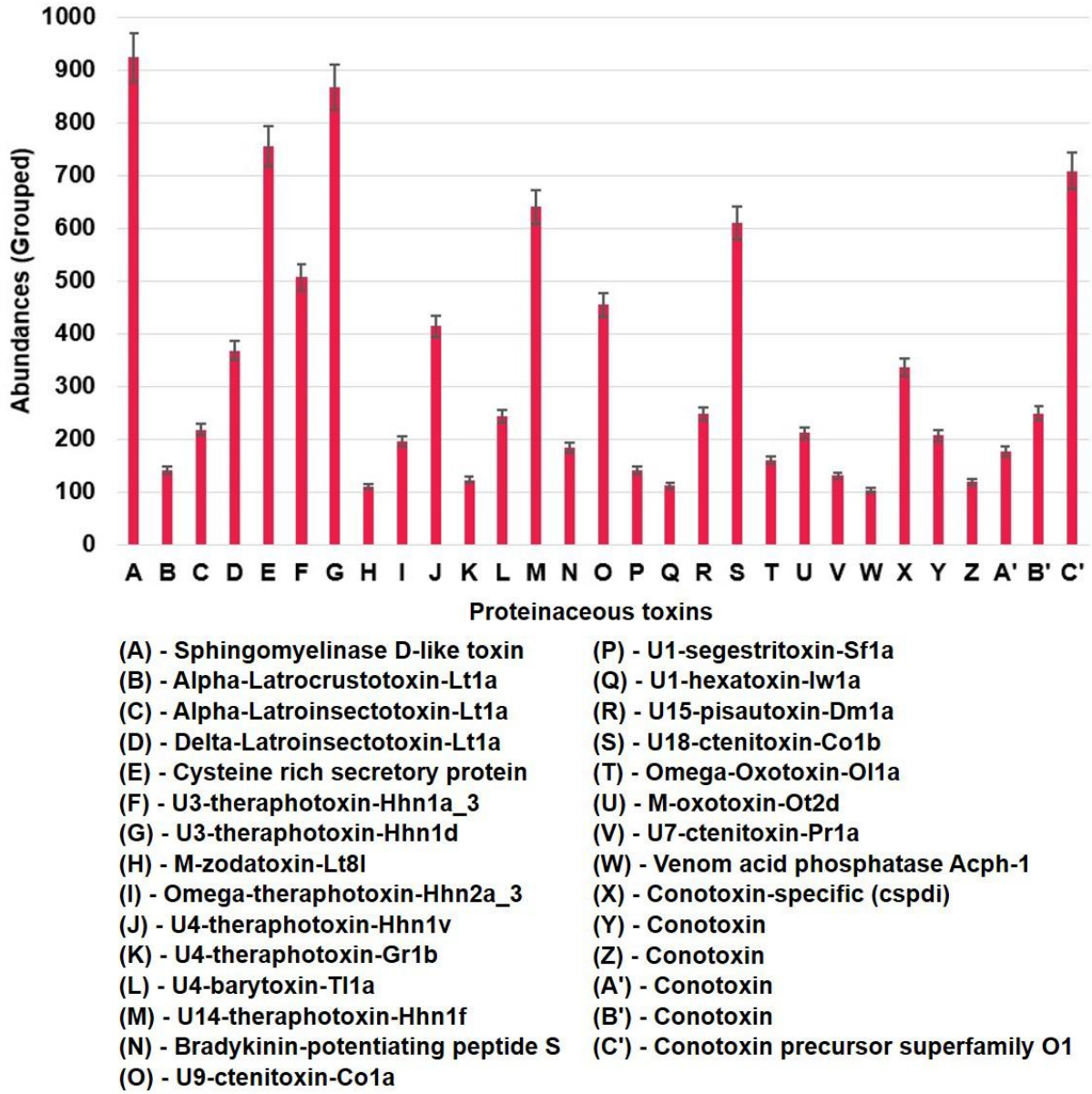


Figura 10. Análise de quantificação proteômica *label-free* das toxinas fosforiladas presentes na seda da teia da aranha *T. clavipes*. Os dados foram normalizados para a contagem de íons totais - TIC dos peptídeos identificados e expressados em abundância de números inteiros agrupados.

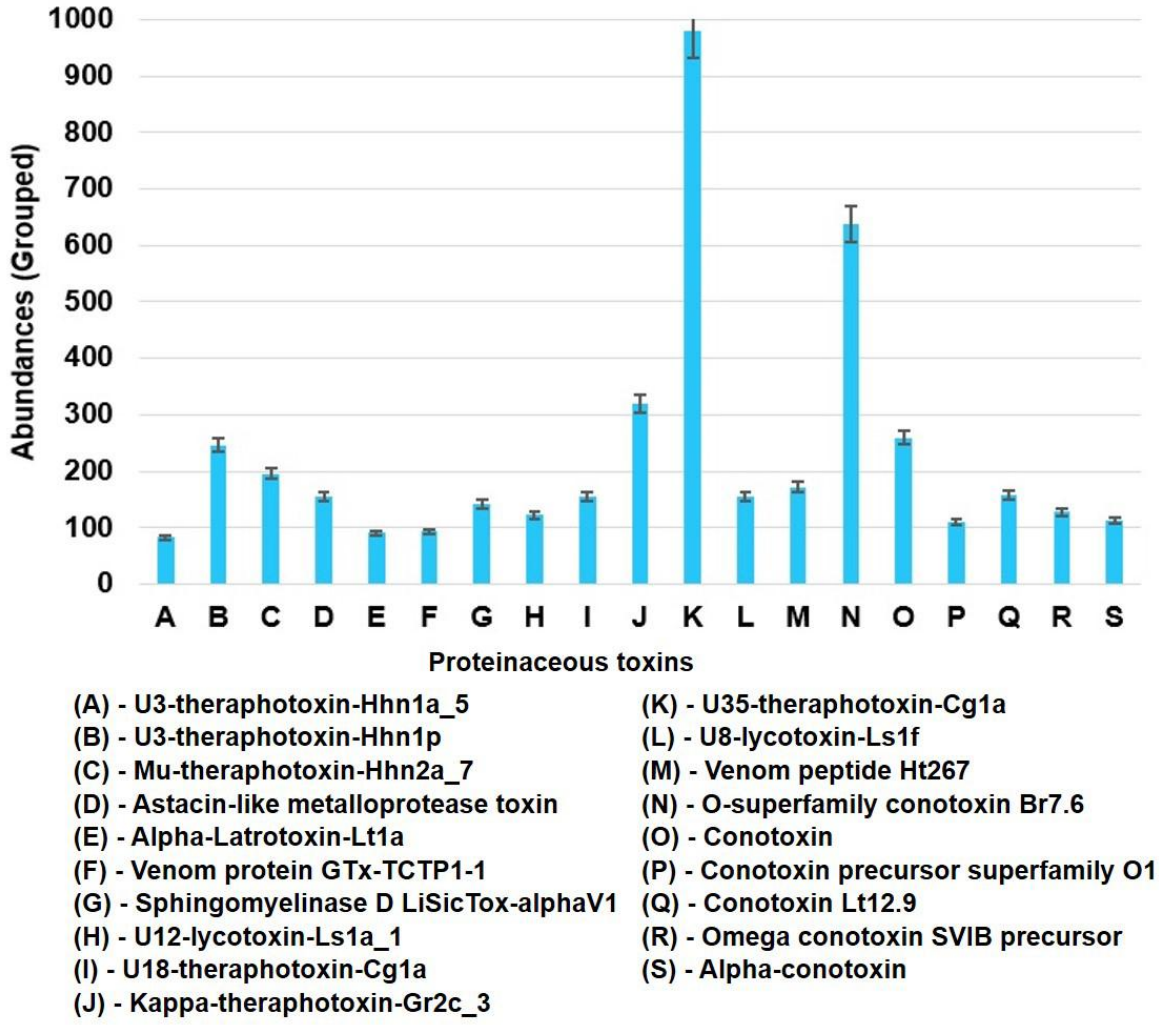


Figura 11. Análise de quantificação proteômica *label-free* das toxinas fosforiladas presentes na seda da teia da aranha *N. cruentata*. Os dados foram normalizados para a contagem de íons totais - TIC dos peptídeos identificados e expressados em abundância de números inteiros agrupados.

A figura 12 demonstra a comparação da quantificação das 24 toxinas fosforiladas identificadas e que são compartilhadas (que apresentam o mesmo código de acesso) entre as sedas das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata*.

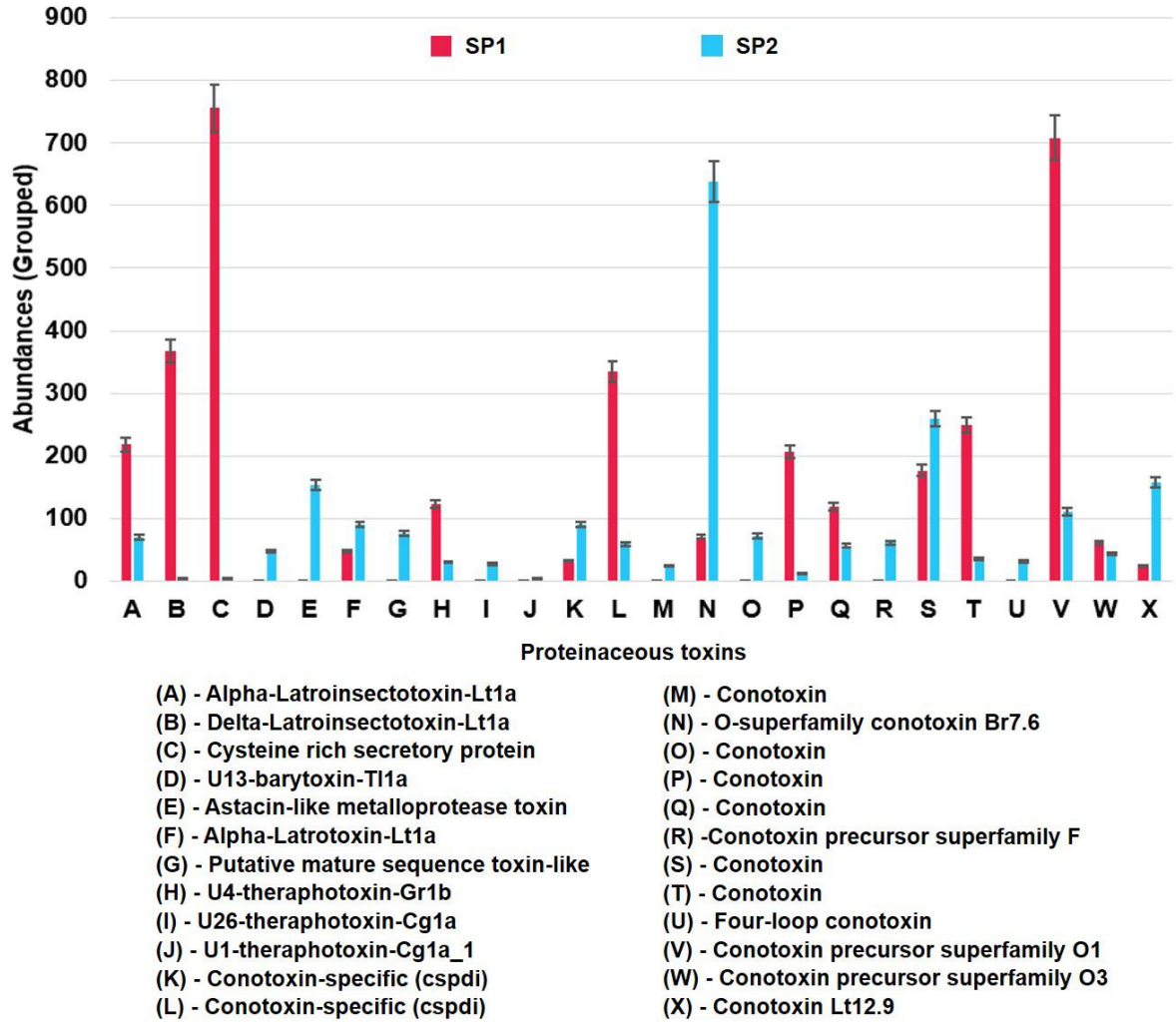


Figura 12. Análise comparativa de quantificação proteômica *label-free* das toxinas fosforiladas presentes nas sedas das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata*. Os dados foram normalizados para a contagem de íons totais - TIC dos peptídeos identificados e expressados em abundância de números inteiros agrupados.

Os resultados de quantificação demonstram que de um modo geral, as toxinas fosforiladas estão presentes em uma abundância maior na seda da aranha *T. clavipes* em comparação com as toxinas fosforiladas presentes na seda da aranha *N. cruentata*; ou seja, as glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes* estão expressando toxinas fosforiladas que são secretadas sobre a seda da teia em uma abundância muito maior com relação as glândulas produtoras de seda da aranha *N. cruentata.* Considerando a presença dessas toxinas nas sedas para a captura e pré-digestão de presas, podemos sugerir que essa diferença de expressão pode estar relacionada com a disponibilidade de presas para cada aranha. Importante mencionar que, as amostras de seda das aranhas *T. clavipes* e *N.*

cruentata foram coletadas no mesmo período, sendo processadas e analisadas nas mesmas condições experimentais.

Apesar das aranhas do presente estudo pertencerem a mesma família Nephilidae, sendo conhecidas como aranhas construtoras de teia aérea orbital, apresentam diferenças entre si com relação a estratégia para a construção de suas teias. As aranhas do gênero *Trichonephila*, por exemplo, constroem suas teias nos espaços entre a vegetação e em áreas de florestas nas margens de rios, contando somente com a luz natural para atrair e capturar suas presas; o que pode não ocorrer com muita frequência dependendo do período climático e da disponibilidade de presas; dessa forma essas aranhas precisam garantir uma captura eficiente das presas expressando toxinas/neurotoxinas em abundância que são secretadas sobre a seda da teia. E, juntamente com as propriedades mecânicas da teia essas moléculas auxiliam na captura causando paralisia da presa sobre a teia. Enquanto que as aranhas do gênero *Nephilingis* constroem suas teias em áreas externas às moradias, construindo refúgio junto às paredes próximo de luminárias, o que facilita a disponibilidade e captura de presas.

Alguns estudos relacionam o papel da teia de captura com a seleção da dieta da aranha, com a finalidade de entender como algumas presas são aprisionadas com maior ou menor eficiência que outras; e esses estudos ainda sugerem que o processo pelo qual as presas (geralmente insetos) são capturadas não ocorre por acaso, nem de forma passiva, mas sim de forma elaborada, seletiva e ativa (Stowe, 1986; Nentwing, 1987; Craig et al., 2000; Tso et al., 2005; Boutry et al., 2008; Henneken et al., 2017). Isto acontece por duas razões: (i) a própria arquitetura da teia favorece a sua função de capturar, e de certa maneira, selecionar os tipos e tamanhos de presas; (ii) por sua vez, as presas variam em suas habilidades de evitar as teias ou escapar delas, o que promove uma co-evolução bastante singular entre a presa e o predador (Raubenheimer et al., 2009). No entanto, esses estudos realizados até então tem considerado a influência da dieta somente sobre as propriedades mecânicas da teia, não considerando a presença de compostos tóxicos sobre a seda. A estratégia elaborada, seletiva e ativa mencionada pelos estudos já realizados, possivelmente se deve também a presença desses compostos, caracterizando então uma estratégia quimíca-ativa que auxilia na captura de presas pela teia. Em estudos de Marques e colaboradores (2005), por exemplo, foi demonstrado que algumas toxinas de baixas massas moleculares só são sintetizadas por certas glândulas produtoras de seda e somente depositadas sob a seda da teia, em determinados períodos do ano, como primavera e verão ou outono e inverno; de acordo com a dieta da aranha. Nos nossos resultados, de quantificação proteômica *label-free*, fica evidente a diferença de expressão de toxinas fosforiladas entre as duas amostras de seda; demonstrando assim, a necessidade da aranha *T. clavipes* de expressar toxinas/neurotoxinas sobre a seda da teia em maior

abundância para uma captura eficiente de suas presas, conforme a disponibilidade das mesmas.

Além dos resultados mencionados e já discutidos anteriormente, também foi possível identificar 25 sequências peptídicas fosforiladas, presentes na seda da teia da aranha *T. clavipes*; e 18 sequências peptídicas fosforiladas, presentes na seda da teia da aranha *N. cruentata*. Essas sequências não apresentaram resultados de identificação com proteínas depositadas nos bancos de dados; e foram obtidas utilizando da abordagem de sequenciamento *de novo* através do software Peaks studio 7 (complete software for proteomics and PTMs). Esses resultados estão demonstrados nas tabelas 3 e 4; e as figuras 13, 14, 15 e 16 mostram espectros de massas representativos obtidos para as modificações de fosforilações detectadas nos resíduos de serina, treonina e tirosina em algumas dessas sequências peptídicas.

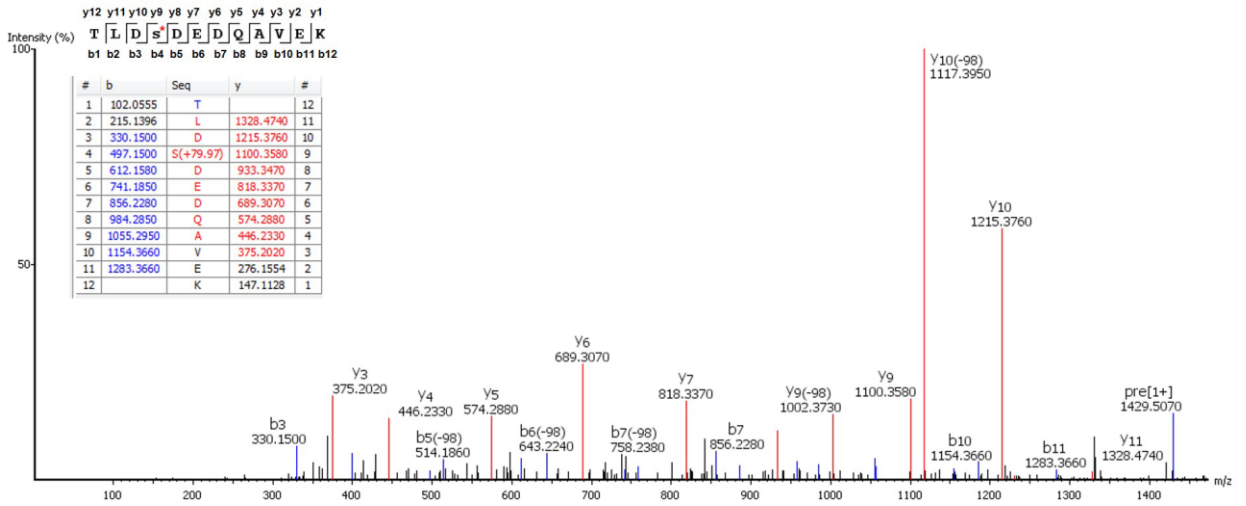
A grande maioria dessas sequências peptídicas possivelmente podem ter se originado de proteínas “não caracterizadas”, uma vez que se trata de fragmentos oriundos de digestão enzimática, ou seja, não são peptídeos naturais / intactos sobre a seda. Proteínas “não caracterizadas” são designadas como proteínas de funções desconhecidas, devido à ausência de homologia com outras proteínas que apresentam funções, sequências e estruturas conhecidas nos bancos de dados (Lubec et al., 2005); e / ou também devido a não caracterização funcional através de ensaios experimentais, após as análises estruturais, denominando dessa forma, essas proteínas como não caracterizadas. Porém, essas proteínas podem ser analisadas através de uma predição funcional e estrutural de suas sequências utilizando de ferramentas de bioinformática, e constando assim nos bancos de dados como por exemplo, na base de dados UniProtKB (https://www.uniprot.org/). Podemos notar então, que ainda existe uma quantidade muito grande de proteínas fosforiladas, presentes na seda da teia das aranhas, que apresentam funções desconhecidas e que possivelmente podem apresentar alguma atividade de toxina sobre a teia para a captura de presas.

Tabela 3. Sequências de peptídeos fosforilados detectados na seda da teia da aranha *T. clavipes*, e obtidos utilizando a abordagem de sequenciamento *de novo* através do software Peaks study 7 (Complete software for proteomics and PTMs). A tabela mostra as informações como sequência peptídica destacando as PTMs nos resíduos de aminoácidos assinalados em vermelho; Tag length - tamanho da sequência em número de resíduos de aminoácidos; ALC (Average Local Confidence) - % de confiabilidade de identificação da sequência; valores de m/z (massa/carga) observados; carga; RT - tempo de retenção; massa do peptídeo (Da); PTMs e valores de massas (Da) da PTM detectada nos fragmentos; Database search - NA (não se aplica). Valores de massas de PTMs podem ser encontrados em http://www.unimod.org.

Peptide sequences	Tag length	ALC (%)	m/z	z	RT	Mass (Da)	PTMs	Database search
TSVEVPNDTR	10	83	639,276	2	17,42	1276,4736	T: Phospho (+79.97)	NA
FQGLDLLNQGVLDAGDSSK	19	89	1028,96	2	21,33	2055,9514	S: Phospho (+79.97)	NA
NAFLDLLNQGVLDAGDSSK	19	86	1028,96	2	21,37	2055,9514	S: Phospho (+79.97)	NA
MVDDALGAAYSSK	13	85	704,301	2	23,14	1406,5789	S: Phospho (+79.97)	NA
AFNLDLLNQGVLDAGDSSK	19	85	1028,96	2	21,43	2055,9514	S: Phospho (+79.97)	NA
DCVKCSR	7	85	502,687	2	6,82	1003,3616	C: Carbamidomethyl (+57.02), S: Phospho (+79.97)	NA
FANLDLLNQGVLDAGDSSK	19	85	1028,96	2	21,37	2055,9514	S: Phospho (+79.97)	NA
CNLMQENGENAAAQGHSR	18	84	1041,96	2	17,87	2081,8044	C: Carbamidomethyl (+57.02), M: Oxidation (+ 15.99), S: Phospho (+79.97)	NA
DCVCKSR	7	83	502,691	2	6,95	1003,3616	C: Carbamidomethyl (+57.02), S: Phospho (+79.97)	NA
MMNDLPTR	8	83	1073,51	1	21,13	1072,4082	M: Oxidation (+ 15.99), T: Phospho (+79.97)	NA
FMLFLNEQYK	10	83	706,793	2	10,3	1411,6248	Y: Phospho (+79.97)	NA
MVDDALGAYASSK	13	82	704,3	2	23,12	1406,5789	S: Phospho (+79.97)	NA
TLDSDEDQAVEK	12	82	715,252	2	10,1	1428,5657	S: Phospho (+79.97)	NA
CNLMQENGELVDQGHSR	17	81	1041,96	2	17,59	2081,8296	C: Carbamidomethyl (+57.02), M: Oxidation (+ 15.99), S: Phospho (+79.97)	NA
YNDDLPTR	8	80	1073,5	1	21,16	1072,4226	T: Phospho (+79.97)	NA
TNEADECLSHHTR	13	80	550,611	3	9,78	1648,6301	C: Carbamidomethyl (+57.02), T: Phospho (+79.97)	NA
FYEHGTQVQNDLPLDENTGENFANVSHK	28	80	1095,13	3	22,09	3282,4253	S: Phospho (+79.97)	NA
MLGFVTNWASLADGVASGLMLMR	23	83	1340,61	2	29,02	2679,1101	TS: Phospho (+79.97)	NA
NSTMTYPDGSMGTCYK	16	83	994,863	2	14,41	1987,644	C: Carbamidomethyl (+57.02), M: Oxidation (+ 15.99), YS: Phospho (+79.97)	NA
QTYPDGSMGTCYK	13	94	802,292	2	10,74	1602,5732	C: Carbamidomethyl (+57.02), M: Oxidation (+ 15.99), Y: Phospho (+79.97)	NA
DNYPDGSMGTCYK	13	87	802,293	2	10,75	1602,5369	C: Carbamidomethyl (+57.02), M: Oxidation (+ 15.99), Y: Phospho (+79.97)	NA
QTYPDGSFGTCYK	13	92	802,294	2	10,9	1602,6062	C: Carbamidomethyl (+57.02), Y: Phospho (+79.97)	NA
DDYPDGSFGTCYK	13	82	802,787	2	11,07	1603,5537	C: Carbamidomethyl (+57.02), Y: Phospho (+79.97)	NA
RTTDATSR	8	85	494,176	2	11,48	986,4182	S: Phospho (+79.97)	NA
YDLCDGFVDCK	11	85	736,253	2	13,75	1470,5195	C: Carbamidomethyl (+57.02), Y: Phospho (+79.97)	NA

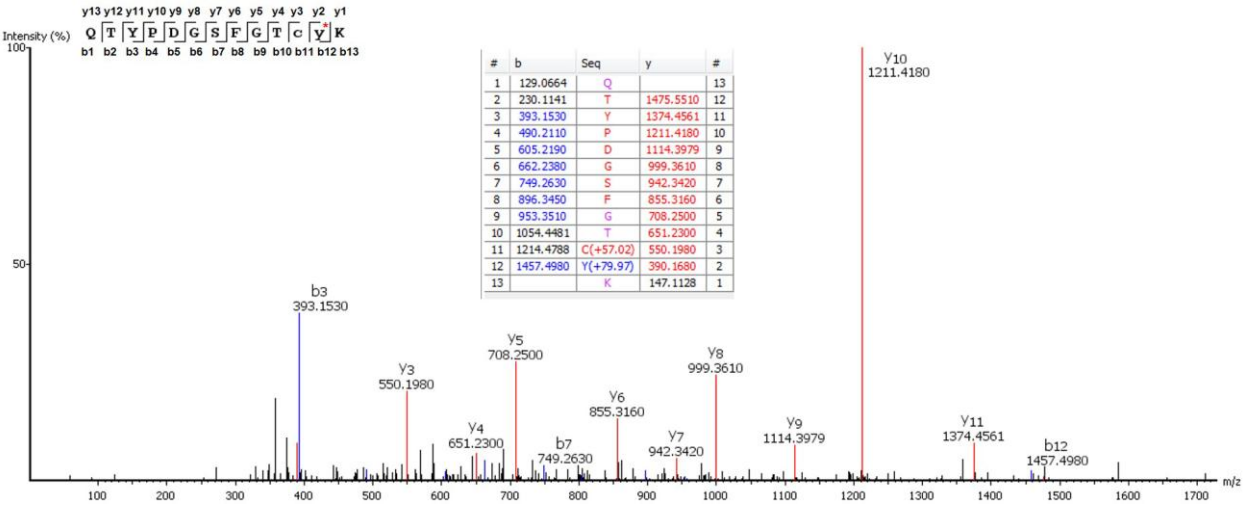
Tabela 4. Sequências de peptídeos fosforilados detectados na seda da teia da aranha *N. cruentata*, e obtidos utilizando a abordagem de sequenciamento *de novo* através do software Peaks study 7 (Complete software for proteomics and PTMs). A tabela mostra as informações como sequência peptídica destacando as PTMs nos resíduos de aminoácidos assinalados em vermelho; Tag length - tamanho da sequência em número de resíduos de aminoácidos; ALC (Average Local Confidence) - % de confiabilidade de identificação da sequência; valores de m/z (massa/carga) observados; carga; RT - tempo de retenção; massa do peptídeo (Da); PTMs e valores de massas (Da) da PTM detectada nos fragmentos; Database search - NA (não se aplica). Valores de massas de PTMs podem ser encontrados em http://www.unimod.org.

Peptide sequences	Tag length	ALC (%)	m/z	z	RT	Mass (Da)	PTMs	Database search
LNETSR	6	89	400,2144	2	7,83	798,3273	S: Phospho (+79.97)	NA
AMHPSR	6	88	397,6765	2	6,19	793,2942	M: Oxidation (+ 15.99), S: Phospho (+79.97)	NA
FVSSPCVKPEDYK	13	87	818,3176	2	11,3	1634,7051	C: Carbamidomethyl (+57.02), Y: Phospho (+79.97)	NA
SSTYPDGFGSCSSGELTYK	19	84	1061,8606	2	15,52	2121,8237	C: Carbamidomethyl (+57.02), S: Phospho (+79.97)	NA
DFTLNSDQDGADVNK	15	84	859,8051	2	11,27	1717,6831	S: Phospho (+79.97)	NA
FFSYYEDSTGFLTQSCR	17	83	1094,3934	2	22,16	2186,8655	C: Carbamidomethyl (+57.02), S: Phospho (+79.97)	NA
LCDDMLGCVGNKGPGNQGYLMNTCLK	26	83	1009,7654	3	23,55	3026,2466	C: Carbamidomethyl (+57.02), M: Oxidation (+ 15.99), Y: Phospho (+79.97)	NA
EQTNSGSLFYDVTR	14	83	848,8945	2	20,27	1695,7141	T: Phospho (+79.97)	NA
VMSSPCVKEPDYK	13	83	818,3154	2	11,23	1634,6721	C: Carbamidomethyl (+57.02), M: Oxidation (+ 15.99), S: Phospho (+79.97)	NA
SSTYPDGFGSCSSGETLYK	19	83	1061,865	2	15,51	2121,8237	C: Carbamidomethyl (+57.02), M: Oxidation (+ 15.99), S: Phospho (+79.97)	NA
YEFLACADKLPK	12	82	767,8127	2	17,35	1533,6938	C: Carbamidomethyl (+57.02), Y: Phospho (+79.97)	NA
ETGGAGVGGGLLGSK	15	81	670,363	2	22,27	1338,6179	S: Phospho (+79.97)	NA
MGVLTK	6	81	728,3754	1	17,34	727,3339	T: Phospho (+79.97)	NA
SSTYPDGFGSCSSADTLYK	19	80	1061,8604	2	14,88	2121,8237	C: Carbamidomethyl (+57.02), S: Phospho (+79.97)	NA
EYFLACADQLPK	12	80	767,8157	2	17,12	1533,6575	C: Carbamidomethyl (+57.02), Y: Phospho (+79.97)	NA
LFYMLGCVDKLPNELQNLMNTCLK	24	80	1009,4398	3	23,45	3025,3821	C: Carbamidomethyl (+57.02), M: Oxidation (+ 15.99), Y: Phospho (+79.97)	NA
VENSAPVEK	9	80	526,7111	2	6,58	1051,4587	S: Phospho (+79.97)	NA
DFTLNSDAGDQDVNK	15	80	859,8023	2	11,28	1717,6831	S: Phospho (+79.97)	NA



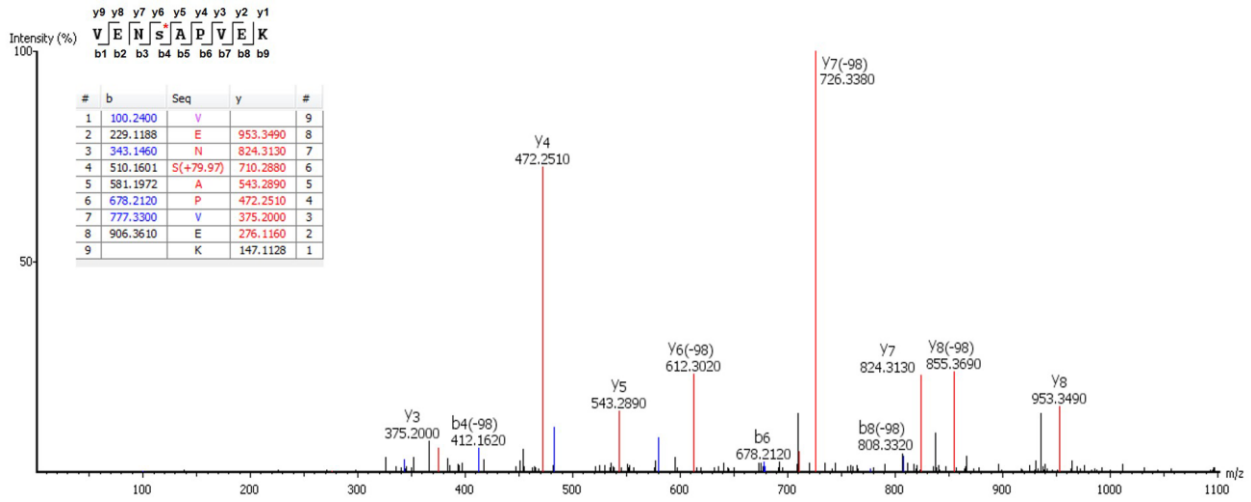
#	b	Seq	y	#
1	102.0555	T		12
2	215.1396	L	1328.4740	11
3	330.1500	D	1215.3760	10
4	497.1500	S(+79.97)	1100.3580	9
5	612.1580	D	933.3470	8
6	741.1850	E	818.3370	7
7	856.2280	D	689.3070	6
8	984.2850	Q	574.2880	5
9	1055.2950	A	446.2330	4
10	1154.3660	V	375.2020	3
11	1283.3660	E	276.1554	2
12		K	147.1128	1

Figura 13. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico TLDS*DEDQAVEK, selecionando-se o íon m/z 715.252 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor; e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de serina (Δ = +80 Da), observado na sequência peptídica presente na seda da teia da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto que aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul.



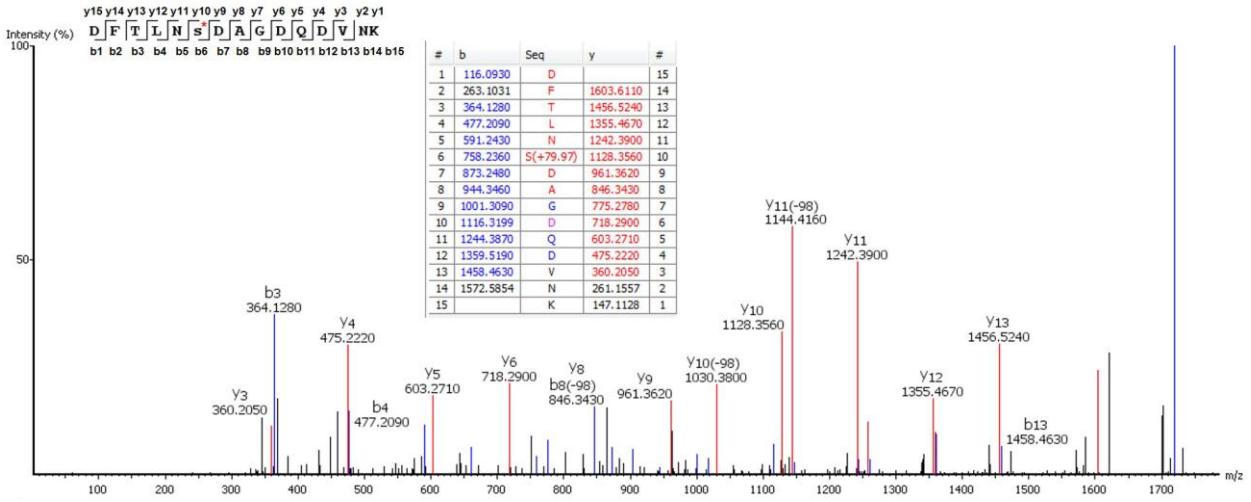
#	b	Seq	y	#
1	129.0664	Q		13
2	230.1141	T	1475.5510	12
3	393.1530	Y	1374.4561	11
4	490.2110	P	1211.4180	10
5	605.2190	D	1114.3979	9
6	662.2380	G	999.3610	8
7	749.2630	S	942.3420	7
8	896.3450	F	855.3160	6
9	953.3510	G	708.2500	5
10	1054.4481	T	651.2300	4
11	1214.4788	C(+57.02)	550.1980	3
12	1457.4980	Y(+79.97)	390.1680	2
13		K	147.1128	1

Figura 14. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico QTYPDGSFGTCY*K, selecionando-se o íon m/z 802.294 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor; e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de tirosina (Δ = +80 Da), observado na sequência peptídica presente na seda da teia da aranha *T. clavipes*. O resíduo de cisteína (C) também apresenta um acréscimo de massa (Δ = +57.02 Da), caracterizando a modificação de carbamidometilação. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto que aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul.



#	b	Seq	y	#
1	100.2400	V		9
2	229.1188	E	953.3490	8
3	343.1460	N	824.3130	7
4	510.1601	S(+79.97)	710.2880	6
5	581.1972	A	543.2890	5
6	678.2120	P	472.2510	4
7	777.3300	V	375.2000	3
8	906.3610	E	276.1160	2
9		K	147.1128	1

Figura 15. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico VENS*APVEK, selecionando-se o íon m/z 526.711 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor; e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de serina (Δ = +80 Da), observado na sequência peptídica presente na seda da teia da aranha *N. cruentata*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto que aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul.



#	b	Seq	y	#
1	116.0930	D		15
2	263.1031	F	1603.6110	14
3	364.1280	T	1456.5240	13
4	477.2090	L	1355.4670	12
5	591.2430	N	1242.3900	11
6	758.2360	S(+79.97)	1128.3560	10
7	873.2480	D	961.3620	9
8	944.3460	A	846.3430	8
9	1001.3090	G	775.2780	7
10	1116.3199	D	718.2900	6
11	1244.3870	Q	603.2710	5
12	1359.5190	D	475.2220	4
13	1458.4630	V	360.2050	3
14	1572.5854	N	261.1557	2
15		K	147.1128	1

Figura 16. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico DFTLNS*DAGDQDVNK, selecionando-se o íon m/z 859.802 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor; e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de serina (Δ = +80 Da), observado na sequência peptídica presente na seda da teia da aranha *N. cruentata*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto que aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul.

Como podemos notar, os resultados apresentados até então demonstram que as amostras de sedas das aranhas *T. clavipes* e *N. cruentata* apresentam uma fração protéica composta por toxinas/neurotoxinas fosforiladas típicas de venenos animais e bem diversificada. A fosforilação é um das PTMs mais comuns e importantes em proteínas e consiste na fixação reversível de um grupo fosfato em um resíduo específico de uma proteína-alvo, atuando na sinalização e na regulação da atividade protéica (Ribet et al., 2010), assim como também na conformação estrutural. Em geral, a introdução de um ou mais grupos fosfato nos resíduos de serina, treonina e tirosina é conhecido por induzir mudanças conformacionais significativas e consequentemente ocasionar efeitos sobre a atividade biológica e interação das proteínas (Eyers et al., 2008; Johnson e Eyers et al., 2010). Redes de sinalização, mediadas por fosforilação, regulam essencialmente toda a biologia das células e organismos em estados normais e de doenças; ocorre uma amplificação do sinal, possibilitando a comunicação entre os diferentes compartimentos celulares, desencadeada por uma cascata de fosforilação. Dessa forma receptores e enzimas são ativados e desativados pela fosforilação e desfosforilação (Choudhary et al., 2010).

Muitos estudos têm demonstrado a presença de fosforilação nas proteínas constituintes das fibras que formam a seda da teia de aranhas. Essas proteínas, chamadas de espidroínas, apresentam uma enorme quantidade de resíduos fosforilados em suas sequências, contribuindo para a determinação da conformação estrutural e interação entre as espidroínas (Michal et al., 1996; Huemmerich et al., 2004; Askarieh et al., 2010; dos Santos-Pinto et al., 2014; dos Santos-Pinto et al., 2015; dos Santos-Pinto et al., 2016b; dos Santos-Pinto et al., 2018). No entanto, esse é o primeiro estudo investigativo que relata a presença de PTMs como a fosforilação nas toxinas/neurotoxinas identificadas na seda da teia de aranhas, uma vez que essas moléculas auxiliam na estratégia de captura de presas.

A grande maioria dessas moléculas (Tabela 1) tem sido descritas com propriedades de inseticidas e farmacológicas, atuando em canais iônicos e receptores neuronais (Windley et al., 2012; King et al., 2013; Kalia, et al., 2014; Bende et al., 2015 Jin et al., 2017; Ma et al., 2018). O significado biológico da presença da fosforilação observada nas toxinas/neurotoxinas identificadas ainda precisa ser melhor investigado; porém, podemos sugerir que a atuação e importância da fosforilação nessas toxinas pode ser bem ampla contribuindo para as propriedades bioquímicas dessas moléculas. Dessa forma, a fosforilação pode contribuir para a estabilidade, solubilidade e atividades biológicas específicas; pode contribuir no direcionamento dessas toxinas em diferentes rotas de sinalização para a atuação em canais iônicos e receptores neuronais. E ainda, podemos sugerir que a fosforilação de uma fração de toxinas protéicas presentes nas amostras, poderia então proporcionar uma novidade evolutiva para a adaptação e diversificação das

funções dessas moléculas, em um sistema tão complexo quanto é a seda da teia de aranhas utilizada para a captura de diferentes tipos de presas. Dessa forma a presente investigação contribui com dados de uma fonte promissora de compostos tóxicos que podem ser explorados em pesquisas com um potencial em aplicações farmacológicas e até mesmo para pesquisas de novos modelos estruturais para o desenvolvimento racional de bioinseticidas seletivos.

6. Conclusão

A seda de aranha emerge como uma estrutura multifacetada, capaz de capturar diversos tipos de presas. A disparidade quantitativa nas moléculas proteicas semelhantes a toxinas, entre as teias de *T. clavipes* e *N. cruentata,* ressalta a interação dinâmica entre a composição da seda e as estratégias de captura de presas. Essas moléculas, que exibem atividades tóxicas e inibidoras de canais iônicos, contribuem significativamente para a imobilização ou paralisia das presas, dependendo das preferências alimentares da aranha. Os bioensaios de toxicidade em insetos corroboram o papel químico ativo da seda da teia, além de sua função mecânica na captura de presas. Além disso, o potencial dessas moléculas proteicas semelhantes a toxinas como bioinseticidas reforça sua utilidade em aplicações agrícolas, justificando uma exploração mais aprofundada para fins farmacológicos e biotecnológicos. Assim, a seda de aranha surge como uma fonte promissora de compostos tóxicos com diversas aplicações, abrindo caminhos promissores para futuras iniciativas de pesquisa e desenvolvimento.

7. Referências bibliográficas

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

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Lipídeos e membranas celulares. In: **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Ed., 357-457, 2012.

Altman, G.H. et al. Silk-based biomaterials. **Biomaterials** 24, 401-416, 2003.

Askarieh, G.; Hedhammar, M.; Nordling, K.; Saenz, A.; Casals, C.; Rising, A.; Johansson, J.; Knight, S.D. Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. **Nature** 465, 236-238, 2010.

Bae, N., Li, L., Lödl M., Lubec, G. Peptide toxin glacontryphan-M is present in the wings of the butterfly *Hebomoia glaucippe* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pieridae). **Proc Natl Acad Sci USA** 109, 17920-17924, 2012.

Batista, C.M.; De Carvalho, C.M.B.; Magalhães, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 43, 167-178, 2007.

Bende NS, et al. The insecticidal spider toxin SFI1 is a knottin peptide that blocks the pore of insect voltage-gated sodium channels via a large β-hairpin loop. **FEBS J.** 282:904-920, 2015.

Binford, G.J., Bodner, M.R., Cordes, M.H., Baldwin, K.L., Rynerson, M.R., Burns, S.N., Zobel-Thropp, P.A. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. **Mol Biol Evol.** 26, 547-566, 2009.

Blackledge, T.A., et al. Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era. **Proc. Natl. Acad. Sci**., v. 106, n. 13, p. 5229-5234, 2009.

Bobrie, A.; Colombo, M.; Raposo, G.; Thery, C. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. **Traffic**, 12, 1659-1668, 2011.

Boutry, C.; Blackledge, T.A. The common house spider alters the material and mechanical properties of cobweb silk in response to different prey. **J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.** 309(9):542-52, 2008.

Brescovit, A.D.; Bertani, R.; Pinto-da-Rocha, R.; Rheims, C.A. **Aracnídeos da Estação Ecológica Juréia-Itatins: Inventário preliminar e história natural.** In Marques, O. A. V. e Duleba, W. (Editores). Estação Ecológica Juréia-Itatins: Ambiente físico, flora e fauna. Ed. Holos. Ribeirão Preto. .198-221, 2004.

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

Casewell, N.R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R.A., Fry, B.G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Trends. Ecol. Evol.** 28, 219-229, 2013.

Chaw, R.C.; Correa-Garhwal, S.M.; Clarke, T.H.; Ayoub, N.A.; Hayashi, C.Y. Proteomic Evidence for Components of Spider Silk Synthesis from Black Widow Silk Glands and Fibers. **J Proteome Res.** 14 (10), 4223-4231, 2015.

Cherki, R.S.; Kolb, E.; Langut, Y.; Tsveyer, L.; Bajayo, N.; Meir, A. Two tarantula venom peptides as potent and differential Na(V) channels blockers. **Toxicon** 77:58-67, 2014.

Choudhary, C.; Mann, M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 11(6):427-39, 2010.

Cocucci, E.; Racchetti, G.; Meldolesi, J. Shedding macrovesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biol**., 19, 43-51, 2009.

Craig, C.L.; Riekel, C.; Herberstein, M.E.; Weber, R.S.; Kaplan, D.; Pierce, N.E. Evidence for diet effects on the composition of silk proteins produced by spiders. **Mol Biol Evol.** 17(12):1904-13, 2000.

de Lima, M.E.; et al. The toxin Tx4(6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na+ current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3. **J. Insect Physiol**., 48, 53-61, 2002.

Deribe, Y.L.; Pawson, T.; Dikic, I. Post-translational modifications in signal integration. **Nat Struct Mol Biol.** 17(6):666-72, 2010.

de Souza, C.L.; dos Santos-Pinto, J.R.A.; Esteves, F.G.; Perez-Riverol, A.; Fernandes, L.R.G.; Zollner, R.L.; Palma, M.S. Revisiting *Polybia paulista* wasp venom using shotgun proteomics - Insights into the N-linked glycosylated venom proteins. **J. Proteom.** 200, 60-73, 2019.

Doley, R., Mackessy, S., Manjunatha, R.M. Role of accelerated segment switch in exons to alter targeting (ASSET) in the molecular evolution of snake venom proteins. **BMC Evol Biol.** 9, 146, 2009.

dos Santos-Pinto, J.R.A.; et al. Structure and post-translational modifications of the web silk protein spidroin-1 from Nephila spiders. **Journal of Proteomics**, 105, 174-185, 2014.

dos Santos-Pinto, J.R.A.; et al. Structural Model for the Spider Silk Protein Spidroin-1. **Journal of Proteome Research**, 14, 3859-3870, 2015.

dos Santos-Pinto, J.R.A.; et al. Silkomics: Insight into the Silk Spinning Process of Spiders, **J Proteome Res** 15(4) 1179-1193, 2016a.

dos Santos-Pinto, J.R.A.; et al. Structural characterization of the major ampullate silk spidroin-2 protein produced by the spider *Nephila clavipes*. **Biochim Biophys Acta.** 1864(10):1444-1454, 2016b.

dos Santos-Pinto, J.R.A.; et al. Spider silk proteome provides insight into the structural characterization of Nephila clavipes flagelliform spidroin. **Scientific Reports** 8:14674, 2018.

dos Santos-Pinto, J.R.A.; et al. A proteotranscriptomic study of silk-producing glands from the orb-weaving spiders. **Molecular Omics** 15:256-270, 2019.

Eisner, T.; Alsop, D.; Meinwald, J. **Secretions of Opilionids, whip-scorrpions and pseudoscorpions. In Arthropod Venoms**; Bettini, S., Ed.; Sprinegr-Verlag: Berlin, Germany, p 972, 1978.

Esteves, F.G.; dos Santos-Pinto, J.R.A.; Ferro, M.; Sialana, F.J.; Smidak, R.; Rares, L.C.; Nussbaumer, T.; Rattei, T.; Bilban, M.; Bacci Júnior, M.; Lubec, G.; Palma, M.S. Revealing the Venomous Secrets of the Spider's Web. **J Proteome Res.** 19(8):3044-3059, 2020.

Esteves, F. G. **Caracterização proteometabolômica dos componentes da teia da aranha Nephila clavipes utilizados na estratégia de captura de presas**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017.

Eyers, C.E.; Gaskell, S.J. Mass spectrometry to identify post-translational modifications. **Wiley Encyclopedia of Chemical Biology**. doi:10.1002/9780470048672.wecb469, 2008.

Fry, B.G., Vidal, N., Norman, J.A. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature** 439, 584-588, 2006.

Garb, J.E., Hayashi, C.Y. Molecular evolution of α-Latrotoxin, the exceptionally potent vertebrate neurotoxin in black widow spider venom. **Mol. Biol. Evol.** 30, 999-1014, 2013.

Gregory, T.R.; Shorthouse, D.P. Genome size of spiders. **J. Heredity**, 94, 285-290, 2003.
Gremski, L. H.; et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon** 83, 91-120, 2014.

Haas, W.; et al. Optimization and use of peptide mass measurement accuracy in shotgun proteomics. **Mol Cell Proteomics** 5(7),1326-37, 2006.

Haney, R.A., Ayoub, N.A., Clarke, T.H., Hayashi, C.Y., Garb, J.E. Dramatic expansion of the black widow toxin arsenal uncovered by multi-tissue transcriptomics and venom proteomics. **BMC Genomics** 15, 366, 2014.

Helenius, A.; Aebi, M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. **Annu. Rev. Biochem**. 73, 1019-1049, 2004.

Henneken, J.; Goodger, J.Q.D.; Jones, T.M.; Elgar, M.A. Variation in the web-based chemical cues of *Argiope keyserlingi*. **J Insect Physiol.** 101:15-21, 2017.

Higgins, L. E.; Tillingast, E. K.; Townley, M. A. Rankin, J. Variation in the chemical composition of orb webs built by the spider Nephila clavipes (araneae, tetragnathidae). **Arachol**, v. 29, p. 82, 2001.

Huemmerich, D.; et al. Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. **Biochemistry** 43:13604-13612, 2004.

Humenik, M.; Scheibel T.; Smith, A. Spider silk: understanding the structure-function relationship of a natural fiber. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 103, p. 131-185, 2011.

Jensen, O.N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. **Curr. Opin. Chem. Biol**. 8:33-41, 2004.

Jin L, et al. An insecticidal toxin from Nephila clavata spider venom. **Amino Acids** 49(7):1237-1245, 2017.

Johnson, H.; Eyers, C.E. Analysis of post-translational modifications by LC-MS/MS. **Methods Mol Biol.** 658,93-108, 2010.

Jungo, F., Estreicher, A., Bairoch, A., Bougueleret, L., Xenarios, I. Animal Toxins: How is Complexity Represented in Databases? **Toxins** *2*(2), 262-282, 2010.

Kallal, R.J.; Dimitrov, D.; Arnedo, M.A.; Giribet, G.; Hormiga, G. Monophyly, Taxon Sampling, and the Nature of Ranks in the Classification of Orb-Weaving Spiders (Araneae: Araneoidea). **Syst. Biol.** 69, 401-411, 2020.

Kalia J, et al. From foe to friend: Using animal toxins to investigate ion channel function. **J. Mol. Biol.** 427:158-175, 2014.

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

King, G.F.; Escoubas, P.; Nicholson, G.M. Peptide toxins that selectively target insect Na(V) and Ca(V) channels. **Channels (Austin).** 2(2):100-16, 2008b.

King, G.F., Hardy, M.C. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. **Annu Rev Entomol.** 58:475-96, 2013.

Klint, J.K. et al. Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: pharmacological tools and potential therapeutic leads. **Toxicon**. 60, 478-91, 2012.

Kuntner, M.; Arnedo, M.A.; Trontelj, P.; Lokovšek, T.; Agnarsson I. A molecular phylogeny of nephilid spiders: evolutionary history of a model lineage**. Mol Phylogenet Evol.** 69(3):961-79, 2013.

Langellotto, G. A.; Denno, R. F. Responses of invertebrate natural enemies to complex-structured habitats: a meta-analytical synthesis. **Oecologia**. 139, 1-10, 2004.

Larsen, M.R.; Trelle, M.B.; Thingholm, T.E. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. **BioTechniques**, 40:790-798, 2006.

Lubec, G.; Afjehi-Sadat, L.; Yang, J.W.; John, J.P. Searching for hypothetical proteins: Theory and practice based upon original data and literature. **Prog. Neurobiol.** 77, 90-127, 2005.

Li, D.; Xiao, Y.; Hu, W.; Xie, J.; Bosmans, F.; Tytgat, J.; Liang, S. Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. **FEBS Lett.** 555(3):616-22, 2003.

Ma L, et al. Novel venom-derived inhibitors of the human EAG channel, a putative antiepileptic drug target. **Biochemical Pharmacology**, 158, 60-72, 2018.

Mann, M.; Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nat. Biotechnol.** 21:255-261, 2003.

Manzoli-Palma, M.F.; Gobbi, N.; Palma, M.S. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis** 9, 2, 174-185, 2003.

Marques, M.R.; et al. Structure Determination of a Tetrahydro-β-Carboline of Arthropod Origin: A Novel Alkaloid Toxin Subclass from the Web of Spider *Nephila clavipes.* **Chemistry & Biodiversity** 2, 525-534, 2005.

Matavel, A.; Cruz, J.S; Penaforte, C.L.; Araújo, D.A.; Kalapothakis, E.; Prado, V.F.; Diniz, C.R.; Cordeiro, M.N.; Beirão, P.S. Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2-6. **FEBS Lett**. 523 (1-3), 219-23, 2002.

Michal, C.A.; Simmons, A.H.; Chew, B.G.; Zax, D.B.; Jelinski, L.W. Presence of phosphorus in *Nephila clavipes* dragline silk. **Biophys J** 70,489-493, 1996.

Morelle, W.; Michalski, J.C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. **Nat. protoc. 2**, 1585-1602, 2007.

Mozafari, M.R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. **Cell. Mol. Biol. Lett**, 10, 711-719, 2005.

Ni, M.W., et al. Modified FASP Method Increases Peptide and Protein Identifications for Shotgun Proteomics. **Rapid Commun Mass Spectrom.** doi: 10.1002/rcm.7779. 2016.

Nentwin, W. the prey spiders. In Nentwing, W. **Ecophysiology of spiders**. Springer-Verlag, Berlin, 249-63, 1987.

Pathan, M.; Keerthikumar, S.; Ang, C.S.;, Gangoda, L.; Quek, C.Y.; Williamson, N.A.; Mouradov, D.; Sieber, O.M.; Simpson, R.J.; Salim, A.; Bacic, A.; Hill, A.F.; Stroud, D.A.; Ryan, M.T.; Agbinya, J.I.; Mariadason, J.M.; Burgess, A.W.; Mathivanan, S. FunRich: An

open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. **Proteomics** 15(15):2597-601, 2015.

Platnick, N.I. 2008: **The world spider catalog**, version 8.5 American Museum of Natural History. Disponível em: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog>.

Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **J. Cell Biol**., 200, 373-383, 2013.

Rates, B.; et al. μ-Theraphotoxin-An1a: primary structure determination and assessment of the pharmacological activity of a promiscuous anti-insect toxin from the venom of the tarantula *Acanthoscurria natalensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae). **Toxicon** 70:123-34, 2013.

Raubenheimer D, Simpson SJ. Mayntz D. Nutrition, ecology and nutritional ecology: toward an integrated framework. **Funct. Ecol**. 23, 4-16, 2009.

Ribet, D.; Cossart, P. Post-translational modifications in host cells during bacterial infection. **FEBS Letters** 584, 2748-2758, 2010.

Roepstorff, P. Mass spectrometry-based proteomics, background, status and future needs. **Protein Cell.** 3(9), 641-7, 2012.

Römer, L.; Scheibel, T. The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high performance fiber. **Prion.** 2(4):154-61, 2008.

Rousseau, M.E.; Lefèvre, T.; Pézolet, M. Conformation and orientation of proteins in various types of silk fibers produced by Nephila clavipes spiders. **Biomacromolecules.** 10(10):2945-53, 2009.

Sachkova, M.Y., Slavokhotova, A.A., Grishin, E.V., Vassilevvski, A.A. Structure of the yellow sac spider Cheiracanthium punctorium genes provides clues to evolution of insecticidal two-domain knottin toxins. **Insect Molecular Biology** 23, 527-538, 2014.

Salles, H.C., et al. Venomous Secrets of the Web Droplets from the Viscid Spiral of the Orb-Weaver Spider *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnatidae). **Chemistry & Biodiversity** 3, 727-741, 2006.

Sanggaard, K.W., Bechsgaard, J.S., Fang, X., Duan, J., Dyrlund, T.F. Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk. **Nature Communications** 5, 3765, 2014.

Seo, J.; Jeong, J.; Kim, Y.M.; Hwang, N. Strategy for comprehensive identification of post-translational modifications in cellular proteins, including low abundant modifications: application to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **J Proteome Res.** 7(2),587-602, 2008.

Schulz, S. Composition of the silk lipids of the spider *Nephila clavipes*. **Lipids** 36:637-647, 2001.

Steinberg, T.H.; Top, K.; Berggren, K.N. Rapid and simple single nanogram detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots. **Proteomics**, 841-855, 2001.

Stowe, M.K. Prey specialization in Araneidae. In: Shear, W.A. Spider: WEBS, Behavior and Evolution. Stanford, CA.: Stanford University, Press, p. 101- 131, 1986.

Torres, A.F.; et al. Transcriptome analysis in venom gland of the predatory giant ant Dinoponera quadriceps: Insights into the polypeptide toxin arsenal of hymenopterans. **PLoS One**, 9(1), e87556, 2014.

Tso, I.M.; Wu, H.C.; Hwang, I.R. Giant wood spider *Nephila clavipes* alters silk protein in response to prey variation. **J. Exp. Biol.** 208, 1053-1061, 2005.

Uchitel, O.D. Toxins affecting calcium channels in neurons. **Toxicon** 35(8):1161-91, 1997.

Vassilevski, A. A.; Kozlov, S. A.; Grishin, E. V. Molecular diversity of spider venom. **Biochemistry**, 74, 1505-1534, 2009.

Vetter, I., et al. Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. **Amino Acids**, 40, 15-28, 2011.

Vollrath, F. Spider webs and silk. **Sci. Am.** 266, 70-76, 1992.

Vollrath, F. Strength and structure of spiders' silks. **J. Biotechnol.**, 74, 67, 2000.

Volsi, E.C.F.R.; et al. Multiple bradykinin-related peptides from the capture web of the spider *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnatidae). **Peptides** 27, 690-697, 2006.

Walsh, C.T.; Garneau-Tsodikova, S.; Gatto, G.J. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. **Angew Chem Int Ed Engl.** 44(45),7342-72, 2005.

Walter, A.; et al. Characterisation of protein families in spider digestive fluids and their role in extra-oral digestion. **BMC Genomics** 18, 600, 2017.

Windley, M.J.; Herzig, V.; Dziemborowicz, S.A. Hardy, M.V.; King, G.F.; Nicholson, G.M. Spider venom peptides as bioinsectides. **Toxins**, v. 4, p. 191-227, 2012.

Yan L., Adams M.E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. **J. Biol. Chem**. 273, 2059-2066, 1998.

Zhang, S., Teck, H.K., Wee, K.S., Yee, H.L., Mark A.E., Daiqin, L. A novel property of spider silk: chemical defence against ants. **Proc. R. Soc. B.** 279, 1824-1830, 2012.

Zhong, Y., et al. A Novel Neurotoxin from Venom of the Spider, Brachypelma albopilosum. **Plos one**, 9, 1-6, 2014.

Pós-doutorado - PNPD/CAPES
Relatório Acadêmico (01/2019 a 02/2022)

1. Produção científica/tecnológica
1.1. Artigos publicados em periódicos

- de Souza, Caroline Lacerra; **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Esteves, Franciele Grego; Perez-Riverol, Amilcar; Fernandes, Luís Gustavo Romani; de Lima Zollner, Ricardo; Palma, Mario Sergio. Revisiting *Polybia paulista* wasp venom using shotgun proteomics - Insights into the N-linked glycosylated venom proteins. Journal of Proteomics, 200, 60-73, **2019** (Qualis A2).

- **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Esteves, Franciele Grego; Sialana, Fernando J.; Ferro, Milene; Smidak, Roman; Rares, Lucaciu Calin; Nussbaumer, Thomas; Rattei, Thomas; Bilban, Martin; Bacci Júnior, Maurício; Palma, Mario Sergio; Lübec, Gert. A proteotranscriptomic study of silk-producing glands from the orb-weaving spiders. Molecular Omics, 5, 256-270, **2019** (Qualis pendente).

- Costa-Leonardo, Ana Maria; Silva, Iago Bueno; Janei, Vanelize; Esteves, Franciele Grego; **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Palma, Mario Sergio. Worker Defensive Behavior Associated with Toxins in the Neotropical Termite *Neocapritermes braziliensis* (Blattaria, Isoptera, Termitidae, Termitinae). Journal of Chemical Ecology, 1, 1-13, **2019** (Qualis A3).

- Perez-Riverol, A.; Lasa, A. M.; **dos Santos-Pinto, J.R.A.**; Palma, M.S. Insect venom phospholipases A1 and A2: roles in the envenoming process and allergy. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 105, 10-24, **2019** (Qualis A2).

- Esteves, Franciele Grego; **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Ferro, Milene; Sialana, Fernando J.; Smidak, Roman; Rares, Lucaciu Calin; Nussbaumer, Thomas; Rattei, Thomas; Bilban, Martin; Bacci Junior, Mauricio; Palma; Mario Sergio; Gert Lübec. Revealing the venomous secrets of the spider's web. Journal of Proteome Research, doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00086, **2020** (Qualis A2).

- Roat, Thaisa C.; **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Miotelo, Lucas; de Souza, Caroline Lacerra; Palma, Mario Sergio; Malaspina, Osmar. Using a toxicoproteomic approach to investigate the effects of thiamethoxam into the brain of *Apis mellifera*. Chemosphere, 258, 127362, **2020** (Qualis A2).

- Almeida, Natália Ellen Castilho; Esteves, Franciele Grego; **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Paula, Carla Peres; Cunha, Anderson Ferreira; Malavazi, Iran; Palma, Mario Sergio; Rodrigues-Filho, Edson. Digestion of intact gluten proteins by Bifidobacterium species: reduction of cytotoxicity and proinflammatory responses. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(15), 4485-4492, **2020** (Qualis A2).

- Costa-Leonardo, Ana Maria; Silva, Iago Bueno; Poiani, Silvana Beani; **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Esteves, Franciele Grego; da Silva; Luiza Helena

Bueno; Palma, Mario Sergio. Proteomic-components provide insights into the defensive secretion in térmite workers of the soldierless genus *Ruptitermes*. Journal of Proteomics, 213, 103622, **2020** (Qualis A2).

- Perez-Riverol, Amilcar; Musacchio-Lasa, Alexis; Fernandes, Luis Gustavo Romani; **dos Santos-Pinto, Jose Roberto Aparecido**; Esteves, Franciele Grego; Bazon, Murilo Luiz; Zollner, Ricardo de Lima; Palma, Mario Sergio; Brochetto-Braga, Márcia Regina. Improved production of the recombinant phospholipase A1 from *Polybia paulista* wasp venom expressed in bacterial cells for use in routine diagnostics. 3 Biotech, 10,217, **2020** (Qualis B1).

- Costa-Leonardo, Ana Maria; Silva, Iago Bueno; Janei, Vanelize; Poiani, Silvana Beani; **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Esteves, Franciele Grego; Palma, Mario Sergio. Salivary glands in workers of *Ruptitermes* spp. (Blattaria, Isoptera, Termitidae, Apicotermitinae): a morphological and proteomic approach. Cell and Tissue Research, DOI: 10.1007/s00441-021-03469-w, **2021** (Qualis B1).

- **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Esteves, Franciele Grego; Tormena, Cláudio Francisco; Perez-Riverol, Amilcar; Lasa, Alexis Musacchio; Bueno, Odair Correa; Palma, Mario Sergio. Proteomic characterization of the fibroin-based silk fibers produced by weaver ant *Camponotus textor*. Journal of Proteomics, 261, 104579, **2022** (Qualis A2).

1.2. Trabalhos publicados em anais de eventos

- Costa-Leonardo, Ana Maria; Silva, Iago Bueno; Poiani, Silvana; **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Esteves, Franciele Grego; Palma, Mario Sergio. Mass spectrometry-based proteomics reveals the abundance of mucin-like proteins in the defensive secretion of *Ruptitermes spp*. Workers. In: V Symposium of Termitology - SymTermes, São Bernardo do Campos, **2019**.

- Moraes, Gabriel Hideki Izuka; Perez-Riverol, Amílcar; **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Palma, Mario Sergio. Identificação e caracterização estrutural da fosfolipase A1 do veneno da vespa neotropical *Apoica pallens*. In: XXXI CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Rio Claro, **2019**.

- Amilcar Perez-Riverol, **José Roberto Aparecido dos Santos-Pinto**, Alexis Musacchio Lasa, Luís Gustavo Romani Fernandes, Gabriel Hideki Izuka Moraes, Debora Moitinho Abram, Edzard Spillner, Thilo Jakob, Ricardo de Lima Zollner, Mario Sergio Palma. Identification df B-cell linear epitopes in major venom allergens from clinically relevant hymenoptera. In: ISMA - International Symposium on Molecular Allergology, Amsterdam, **2019**.

- Esteves, Franciele Grego; **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Souza, Caroline Lacerra; Palma, Mario Sergio. Using OMICs approaches to investigate venomic insights into the spider web silk. In: XIV International Research Conference on Protein Bioinformatics and Systems Biology - ICPBSB, Roma, Itália, **2020**.

1.3. Midia científica online

- Some spiders may spin poisonous webs laced with neurotoxins. Publicado pela Science News, **08/2020**.

https://www.sciencenews.org/article/spiders-poisonous-webs-neuro-toxins-genes

- Trama venenosa. Publicado pela Revista Pesquisa FAPESP, 297, **11/2020**. https://revistapesquisa.fapesp.br/trama-venenosa/

- Web Design: An Orb-weaver's Sticky Toxic Lair. Publicado por Janaki Lenin, coluna científica, **11/2020**. https://round.glass/sustain/columns/orb-weavers-web/

2. Participação como revisor de periódicos

- The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases (Online).
- Amino Acids (Wien. Print).
- Medical Science Monitor (Online).
- Pest Management Science (Online).
- Scientific Reports (Online).
- Chemosphere (Online).
- Pesticide Biochemistry and Physiology.
- Frontiers in Allergy.

3. Orientações

- Franciele Grego Esteves. Perfilagem peptidômica e caracterização estrutural-funcional das vesículas lipidicas presentes na teia da aranha *Nephila clavipes*. **Tese** (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", FAPESP. (**Co-orientador**). Início: **2017 - 2021**.

- Caroline Lacerra de Souza. Perfilagem fosfoproteômica das glândulas produtoras de seda da aranha *Nephila clavipes*. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", FAPESP. (**Co-orientador**). Início: **2019 - 2021**.

4. Participação em bancas de defesa

- **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**. Participação em banca de Gabriel Hideki Izuka de Moraes. **TCC - Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação - Ciências Biológicas) - UNESP - Campus de Rio Claro-SP, **2019**.

- **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**. Participação em banca de Patricia Sitta Innocente. **Dissertação de Mestrado** (Pós-Graduação em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) - UNESP - Campus de Jaboticabal-SP, **2019**.

- **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**. Participação em banca de Larissa Prado Maia. **Tese de Doutorado** (Pós-Graduação em Genética e Bioquímica) - Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia-MG, **2019**.

- **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**. Participação em banca de Letícia Ferreira Ramos. **Dissertação de Mestrado** (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) - UNESP - Campus de Rio Claro-SP, **2020**.

- **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**. Participação em banca de Nestor Dario Franco Marulanda. **Tese de Doutorado** (Pós-Graduação em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) - UNESP - Campus de Jaboticabal-SP, **2020**.

- **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**. Participação em banca de Murilo Luiz Bazon. **Exame de Qualificação - Doutorado** (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) - UNESP - Campus de Rio Claro-SP, **2021**.

- **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**. Participação (Suplente) em banca de Murilo Luiz Bazon. **Tese de Doutorado** (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) - UNESP - Campus de Rio Claro-SP, **2021**.

5. Participação no desenvolvimento de Projetos de Pesquisas

- Perfilagem fosfoproteômica das glândulas produtoras de seda da aranha *Nephila clavipes*. Mestrado de Caroline Lacerra de Souza, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UNESP, Rio Claro-SP, FAPESP. **2019 - 2021.**

- Synthetic B-cell linear epitopes of allergens from clinically relevant hymenoptera for improved molecular diagnosis and immunotherapy of venom allergy. Pós-doutorado no exterior de Amílcar Perez-Riverol, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Projeto BEPE-FAPESP, University Medical Center Giessen and Marburg, Alemanha. **2019 - 2020.**

- Unraveling the spider web silk droplets proteopeptides content and functional characterization of web toxins. Doutorado no exterior de Franciele Grego Esteves, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Projeto BEPE-FAPESP, University of Queensland, UQ, Austrália. **2019 - 2020.**

- Identificação e síntese de peptídeos correspondentes a epítopos lineares de células-B de alérgenos do veneno de Hymenoptera sociais: desenvolvimento de insumos para diagnóstico e imunoterapia de alergia. Pós-doutorado de Amílcar Perez-Riverol, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UNESP, Rio Claro-SP, FAPESP. **2018 - 2021.**

- Avaliação dos efeitos do Antígeno 5 do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) na forma recombinante sobre a produção de mediadores inflamatórios e imunológicos in vitro para o desenvolvimento de kit diagnóstico. Projeto de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Márcia Regina Brochetto Braga, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UNESP, Rio Claro-SP, FAPESP. **2018 - 2021.**

- Morfologia e perfilagem proteômica das secreções defensivas presentes em cupins Neotropicais dos gêneros *Ruptitermes sp*. e *Neocapritermes sp*. Projeto de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Ana Maria Costa Leonardo, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UNESP, Rio Claro-SP. **2018 - 2021.**

- Perfilagem peptidômica e caracterização estrutural-funcional das vesículas lipídicas presentes na teia da aranha *Nephila clavipes*. Doutorado de Franciele Grego Esteves, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UNESP, Rio Claro-SP, FAPESP. **2017 - 2021.**

6. Disciplinas / aulas ministradas

- Aula de Proteômica ministrada para as turmas do noturno e integral da graduação em Ciências Biológicas, UNESP-RC/SP, dentro da disciplina Biologia Molecular sob responsabilidade da Profª. Drª. Patrícia Parise Maltempi, Carga horária: 6 h, **2019**.

- Professor responsável pela disciplina "Os estudos de modificações pós-traducionais e suas aplicações biotecnológicas" para o curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, junto ao Instituto de Biociências - IB, UNESP-RC/SP. Carga horária: 45 h, **2019**.

- Professor responsável pela disciplina "Os estudos de modificações pós-traducionais e suas aplicações biotecnológicas" para o curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, junto ao Instituto de Biociências - IB, UNESP-RC/SP. Carga horária: 45 h, **2020**.

- Professor responsável pela disciplina "Os estudos de modificações pós-traducionais e suas aplicações biotecnológicas" para o curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, junto ao Instituto de Biociências - IB, UNESP-RC/SP. Carga horária: 45 h, **2021**.

7. Outras atividades

7.1. Palestras / Seminários

- **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**. Utilizando a abordagem proteômica nos estudos biomédicos, farmacológicos e toxicológicos. **Palestra** ministrada no 14º Congresso Científico, realizado no Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto - FHO, **2019**.

- **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**. A biochemical view of the spider web silk - proteins and posttranslational modifications. **Palestra** ministrada na Disciplina de Pós-Graduação Tópicos Avançados em Produtos Naturais, realizado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo - USP, **2020**.

7.2. Formação complementar

- Curso sobre Basics of Extracellular Vesicles, oferecido pela The University of California, Irvine, UCI através da plataforma de cursos on-line *Coursera*. Carga horária: **15h**, **2020**.

- Curso sobre Industrial Biotechnology, oferecido pela The University of Manchester através da plataforma de cursos on-line *Coursera*. Carga horária: **11h**, **2020**.

- Curso sobre Drug discovery, development and commercialization, oferecido pela The University of California San Diego através da plataforma de cursos on-line *Coursera*. Carga horária: **24h**, **2020**.

- Curso sobre Population Health During a Pandemic: Contact Tracing and Beyond, oferecido pela University of Houston através da plataforma de cursos on-line *Coursera*. Carga horária: **22h**, **2020**.

- Curso sobre Epidemics - the Dynamics of Infectious Diseases, oferecido pela The Pennsylvania State University através da plataforma de cursos on-line *Coursera*. Carga horária: **20h**, **2020**.

- Curso sobre COVID-19 Contact Tracing, oferecido pela Johns Hopkins University através da plataforma de cursos on-line *Coursera*. Carga horária: **6h**, **2020**.

- Curso sobre Epidemiology: The Basic Science of Public Health, oferecido pela The University of North Carolina at Chapel Hill através da plataforma de cursos on-line *Coursera*. Carga horária: **5h**, **2020**.

- Curso sobre COVID-19: What You Need to Know, oferecido pela Osmosis.org Health Professional através da plataforma de cursos on-line *Coursera*. Carga horária: **4h**, **2020**.

- Curso sobre Measuring and Maximizing Impact of COVID-19 Contact Tracing, oferecido pela Johns Hopkins University através da plataforma de cursos on-line *Coursera*. Carga horária: **3h**, **2020**.

- Curso on-line sobre Mind Control: Managing Your Mental Health During COVID-19, oferecido pela University of Toronto através da plataforma de cursos *Coursera*. Carga horária: **3h**, **2020**.

- Curso sobre Biossegurança e Gestão Laboratorial, oferecido pelo Centro Universitário São Camilo através da plataforma de cursos on-line. Carga horária: 40h, **2021**.

8. Premiação, menção honrosa

- Palma, Mario Sergio; **dos Santos-Pinto, José Roberto Aparecido**; Esteves, Franciele Grego; Souza, Caroline Lacerra. Prêmio Científico, categoria Inovação 2020, outorgado pela International Association of Advanced Material - IAAM, referente ao conjunto de trabalhos científicos que abordam a complexidade e produção das fibras da seda da teia de aranhas por uma abordagem proteômica. 152th Advanced Materials Lecture Series, Ulrika, Suécia, **2020**.

9. Indicadores quantitativos

- ✓ Publicações em periódicos: **38**
- ✓ Capítulos de livros: **1**
- ✓ Tese de doutorado orientada e defendida: **1**
- ✓ Dissertação de mestrado orientada e defendida: **2**
- ✓ Trabalho de conclusão de curso orientado e finalizado: **1**
- ✓ Participação em bancas de TCC, mestrado e doutorado: **12**
- ✓ Quantidade de citações recebidas na literatura científica internacional, segundo o **Google Scholar - 798 citações;** Indíce ***h* = 18**.

10. Link para a página MyCitations (Google Scholar):
http://scholar.google.com/citations?hl=en&user=w0tzZqIAAAAJ