
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PERFILAGEM FOSFOPROTEÔMICA DAS GLÂNDULAS PRODUTORAS DE
SEDA DA ARANHA *TRICHONEPHILA CLAVIPES***

CAROLINE LACERRA DE-SOUZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PERFILAGEM FOSFOPROTEÔMICA DAS GLÂNDULAS PRODUTORAS DE
SEDA DA ARANHA *TRICHONEPHILA CLAVIPES***

CAROLINE LACERRA DE-SOUZA

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Coorientador: Dr. José Roberto Aparecido dos Santos-Pinto.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

D278p De-Souza, Caroline Lacerra
Perfilagem fosfoproteômica das glândulas produtoras de seda da aranha *Trichonephila clavipes* / Caroline Lacerra De-Souza. -- Rio Claro, 2021
115 p. + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Mario Sergio Palma
Coorientador: José Roberto Aparecido dos Santos - Pinto

1. Proteômica. 2. Glândulas de seda. 3. Fosforilação. 4. Espidroínas. 5. Proteínas semelhantes à toxinas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Perfilagem fosfoproteômica das glândulas produtoras de seda da aranha *Trichonephila clavipes*

AUTORA: CAROLINE LACERRA DE SOUZA

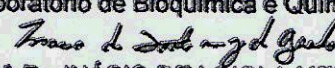
ORIENTADOR: MARIO SERGIO PALMA

COORDENADOR: JOSÉ ROBERTO APARECIDO DOS SANTOS PINTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro


Prof. Dr. WAGNER FONTES (Participação Virtual)
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas / Universidade de Brasília


Prof. Dr. INÁCIO DE LÓIOLA MEIRELLES JUNQUEIRA DE AZEVEDO (Participação Virtual)
x / Instituto Butantan

Rio Claro, 07 de junho de 2021

Agradecimentos

Durante esses anos de mestrado, muito estudo, esforço e dedicação, gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam e mostraram-se fundamentais para o meu amadurecimento pessoal, profissional e para a conclusão de mais uma etapa neste ciclo da vida. As palavras aqui ditas são poucas para agradecer todo o apoio que vocês me deram, mas vamos lá!

Primeiramente agradeço a Deus por ouvir as minhas preces e atender aos meus pedidos, obrigada por abençoar a minha vida.

Aos meus pais Silvana e Nivaldo, por sempre respeitarem minhas escolhas, me incentivarem e transmitirem valores tão preciosos, os quais me permitiram chegar até aqui. Ao meu irmão, melhor amigo, Bruno, pela parceria de sempre, conselhos e pelo apoio nos momentos de dificuldade. Eu amo muito vocês!

A minha avó, a qual não está mais entre nós fisicamente, porém, sempre torceu pelo meu sucesso e vibrou com as minhas conquistas. Dedico este trabalho a você, vovó Mariquinha.

Ao meu parceiro Igor pelo carinho, paciência, incentivo e por dar sempre o melhor de si para me ver feliz.

Às minhas amigas Unespianas, construídas ao longo desses anos, em especial, um muito obrigada à minha amiga e confidente, Debinha (Débora), que me acompanhou desde o início desta linda jornada. Obrigada por estar sempre ao meu lado e acreditar em meu potencial, minha amiga.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Sergio Palma, pela oportunidade que me foi concedida, ensinamentos, dedicação e por todo conhecimento transmitido durante a realização deste trabalho e que agregou muito à minha formação.

Ao grupo do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, por toda ajuda direta ou indiretamente concedida e pela troca de experiências.

Ao meu co-orientador Dr. José Roberto (Beto), pela atenção e cuidado durante o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço de coração a paciência despendida e todo conhecimento científico transmitido a mim. Você foi fundamental para o meu amadurecimento profissional. Obrigada também pela amizade construída.

À Franciele (Francisca/Francineide), pela troca de experiências profissionais e pela amizade que construímos na alegria e no desespero. Sou extremamente grata por ter tido a chance de trabalhar com você e com o Beto, vocês têm todo meu carinho, admiração e respeito!

À Universidade pela infraestrutura, pelo apoio acadêmico e aos funcionários por todos os serviços prestados. Ao CEIS pela infraestrutura e materiais cedidos.

*Às aranhas *Trichonephila clavipes* que contribuíram com suas glândulas de seda para a realização deste estudo, em prol do desenvolvimento científico.*

Processo nº 2019/04538-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Ser forte não significa exercitar os músculos. Significa encontrar seu próprio brilho sem fugir, vivendo ativamente com a natureza selvagem de uma maneira própria. Significa ser capaz de aprender, ser capaz de defender o que sabemos. Significa se manter e viver”

*Clarissa Pinkola
Mulheres que correm com os lobos*

RESUMO

Apesar do grande interesse pelas propriedades mecânico-elásticas das fibras da seda produzida pelas aranhas, visando o seu uso em aplicações biomédicas e biotecnológicas devido as suas propriedades de resistência, elasticidade e biocompatibilidade, pouco se conhece sobre os detalhes das glândulas produtoras de seda e o processo de fiação que ocorre para a produção das fibras.

Dessa forma, alguns estudos têm demonstrado que as glândulas produtoras de seda apresentam diversas proteínas relacionadas com o envolvimento na secreção das proteínas da seda, transporte, regulação de atividades proteolíticas e preservação das proteínas da seda contra o estresse oxidativo e degradação, durante todo o processo de fiação; além disso, estudos também já demonstraram nas fibras de seda da teia, a presença de toxinas de ação geral e de neurotoxinas, comuns em venenos animais, sugerindo que essas toxinas/neurotoxinas contribuem para a paralisia e captura de presas. Porém, esses estudos não têm considerado a possível presença de modificações pós-traducionais (PTMs) que podem atuar sobre a atividade biológica e função dessas moléculas. 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. Portanto, no presente estudo adotamos o uso da cromatografia de afinidade com TiO_2 como método de enriquecimento de fosforilação, combinados com a abordagem proteômica livre de gel - shotgun, utilizando técnicas avançadas de espectrometria de massas *in-tandem* (μLC -ESI-micrOTOF-Q-III-CID) a fim de identificar o perfil fosfoproteômico das glândulas que secretam a seda da aranha *Trichonephila clavipes*. Os resultados obtidos com a análise fosfoproteômica do conjunto de glândulas produtoras de seda da ranha *T. clavipes*, mostrou a identificação de 1316 proteínas fosforiladas sendo que 155 foram identificadas na glândula agregada, 580 na ampulada maior, 143 na flageliforme e 438 na ampulada menor. Estas fosfoproteínas foram classificadas de acordo com a sua função geral e subdividas em sete diferentes grupos de proteínas: (i) proteínas estruturais que compõem as fibras da seda – as espidroínas; ii) proteínas relacionadas com o transporte de íons e oxigênio nas glândulas para manter a estabilidade das espidroína; (iii) proteínas relacionadas com o dobramento/conformação e modificação das espidroínas; (iv) proteínas relacionadas com a preservação das espidroínas contra o estresse oxidativo; (v) proteínas

relacionadas com a preservação das características fibrilares das espidroínas no meio ambiente; (vi) proteínas *housekeeping* e (vii) proteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas. Para o último grupo, foram identificadas 284 proteínas semelhantes a toxinas, neurotoxinas, enzimas proteolíticas, e defensinas em sua forma fosforilada.

O enriquecimento funcional destas proteínas nos permitiu avaliar a contribuição de suas funções às características físico-químicas das proteínas estruturais da seda, bem como a interação entre os grupos funcionais das proteínas listadas envolvidas com o processo de fiação da seda; assim como também a influência sobre a atividade tóxica das toxinas. Os resultados também permitiram identificar uma série de sequências peptídicas fosforiladas que não apresentaram resultados de Identificação com proteínas depositadas nos bancos de dado e foram obtidas utilizando da abordagem de sequenciamento *de novo* e submetidas a um alinhamento de sequencias utilizando a ferramenta BLASTP. O ensaio de inseto-toxicidade realizado ao final do estudo, nos permitiu verificar a toxicidade do extrato bruto fosforilado das glândulas ampulada maior e agregada, que apresentaram os valores de dose letal, $DL_{50}=28,40$ ng/mg de inseto (*A. mellifera*) para a glândula ampulada maior e $DL_{50}=23,07$ ng/mg de inseto (*A. mellifera*) para a glândula agregada.

Dessa forma, demonstramos que a combinação do uso de métodos baseados em cromatografia de afinidade, como a estratégia de enriquecimento de proteínas/peptídeos fosforilados, e o uso de uma abordagem proteômica com estudos de PTMs se mostrou uma estratégia eficiente na investigação de amostras complexas, como as glândulas produtoras de seda da teia de aranhas. Um estudo com modificações pós-traducionais das proteínas presentes nas glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes*, como demonstrado no presente trabalho, nos possibilitou obtermos informações biológicas e químicas das características dessas moléculas, contribuindo para uma melhor compreensão sobre o perfil fosfoproteômico das glândulas analisadas.

Palavras chave: glândulas de seda; espidroínas; proteínas semelhantes a toxinas; fosforilação; bioensaio de inseto-toxicidade; abordagem proteômica.

ABSTRACT

Despite the great interest in the mechanical-elastic properties of the silk fibers produced by spiders, aiming their use in biomedical and biotechnological applications due to their properties of resistance, elasticity and biocompatibility, little is known about the details of the silk-producing glands and the spinning process that takes place for the production of the fibers.

Studies have shown that the silk producing glands, present several proteins related to the involvement in the secretion of silk proteins, transport, regulation of proteolytic activities and preservation of silk proteins, against oxidative stress and degradation, throughout the spinning process; in addition, studies have also demonstrated in the silk web fibers, of general action toxins-like and neurotoxins-like common in animal venom, suggesting that these proteins contribute to paralysis and prey capture. However, these studies have not considered the possible presence of post-translational modifications (PTMs) that can act over biological activity and function of these molecules. The determination of PTMs is fundamental for the processes elucidation that control cellular events, such as cell growth, division and differentiation, including the interaction between proteins. Therefore, in the present study we adopted the use of TiO₂ affinity chromatography as a phosphorylation enrichment method, combined with the gel-free proteomic approach - shotgun, using advanced techniques of in-tandem mass spectrometry (μ LC-ESI-micrOTOF-Q -III-CID) in order to identify the phosphoproteomic of glands profile that secrete the spider silk *Trichonephila clavipes*.

The results obtained with the phosphoproteomic analysis of the set of silk producing glands of the *T. clavipes* spider, demonstrated the identification of 1316 phosphorylated proteins, of which 155 were identified in the aggregated gland, 580 in the major ampulate, 143 in the flagelliform and 438 in the minor ampulate. These phosphoproteins were classified according to their general function and subdivided into seven different groups of proteins: (I) structural proteins that make up the fibers of silk - the spidroins; (II) proteins related to the transport of ions and oxygen in the glands to keep the spidroins stability; (III) proteins related to the folding/shaping and modification of spidroins; (IV) proteins related to the preservation of spidroins against oxidative stress; (V) proteins related to the preservation of the fibrillar characteristics of spidroins in the environment; (VI) housekeeping proteins and (vii) proteins related to prey

capture and pre-digestion. For the last group, 284 toxin, neurotoxins, proteolytic enzymes, and defensins-like proteins, in their phosphorylated form were identified.

The functional enrichment of these proteins allowed us to evaluate the contribution of their functions to the physicochemical characteristics of structural silk proteins, as well as the interaction between the functional groups of the listed proteins involved with the silk spinning process; And also the influence on the toxic activity of the toxins. The results also made it possible to identify a series of phosphorylated peptide sequences that did not present identification results with proteins deposited in the data banks and were obtained using the sequencing approach *de novo* and subjected to a sequence alignment using the BLASTP tool. The insect-toxicity assay carried out at the end of the study allowed us to verify the toxicity of the crude phosphorylated extract of the major ampulate and aggregated glands, which showed the lethal dose values LD₅₀ = 28.40 ng/mg of insect (*A. mellifera*) for the major ampulate gland and LD₅₀ = 23.07 ng/mg of insect (*A. mellifera*) for the aggregated gland.

Thus, we demonstrate that the combination of using methods based on affinity chromatography, such as the strategy of enriching proteins / phosphorylated peptides, and the use of a proteomic approach with studies of PTMs proved to be an efficient strategy in the investigation of complex samples, like the silk-producing glands in the spider web. A study with post-translational modifications of proteins present in the spider producing glands of the spider *T. clavipes*, as demonstrated in the present work, enabled us to obtain biological and chemical information on the characteristics of these molecules, contributing to a better understanding of the phosphoproteomic profile of the glands. analyzed.

Keywords: silk glands; spidroins; toxin-like proteins; phosphorylation; insect-toxicity bioassay; proteomic approach.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aranha construtora de teia aérea orbital, A - <i>Trichonephila clavipes</i> , coletada no campus da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” localizado na cidade de Rio Claro, São Paulo. B - glândulas de seda da aranha <i>T. clavipes</i> destacando a glândula ampulada maior, indicada por uma seta; C - seda da teia da aranha <i>T. clavipes</i> . Imagens modificadas de dos Santos-Pinto et al., 2016.	21
Figura 2. Esquema representativo das glândulas produtoras de seda das aranhas tecedoras de teias orbitais (adaptado de Vollrath, 2000).	22
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 cobrem/protegem 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).	24
Figura 4. <i>Biosteel Spidersilk Fibers</i> produzida pela AMSilk® <i>high performance materials</i>	29
Figura 5. Cosméticos produzidos pela AMSilk® <i>high performance materials</i> contendo as propriedades da seda de aranhas comercialmente disponíveis.	30
Figura 6. A - Esquema representativo da regulação da fosforilação de uma proteína. A enzima quinase é responsável pela adição do grupo fosfato à proteína, enquanto que a enzima fosfatase é responsável pela remoção do grupo. B - fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina.	35
Figura 7. A – <i>Trichonephila clavipes</i> , coletada no campus da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” localizado na cidade de Rio Claro, São Paulo. B – glândulas de seda da aranha <i>T. clavipes</i> destacando a glândula ampulada maior, indicada por uma seta– Imagens modificadas de dos Santos-Pinto et al., 2016.....	43
Figura 8. Análise de enriquecimento funcional demonstrando a função molecular das fosfoproteínas identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada	

menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.	47
Figura 9. Análise de enriquecimento funcional demonstrando o componente celular das fosfoproteínas identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.	48
Figura 10. Análise de enriquecimento funcional demonstrando o processo biológico das fosfoproteínas identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.	49
Figura 11. Distribuição do total de fosfoproteínas identificadas nas quatro glândulas combinadas – agregada, ampulada maior, flageliforme e ampulada menor da aranha <i>T. Clavipes</i> de acordo com o seu papel funcional.	52
Figura 12. Diagrama de Venn destacando as fosfoproteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas identificadas e compartilhadas (que apresentam o mesmo código de acesso) entre as quatro glândulas produtoras de seda da aranha <i>T. clavipes</i> . AGRE – glândula agregada, AMA – glândula ampulada maior, FLAG – glândula flageliforme, AME – glândula ampulada menor.	62
Figura 13. Análise de enriquecimento funcional, demonstrando a função molecular das fosfoproteínas do grupo vii (toxinas, neurotoxinas, defensinas e enzimas proteolíticas) identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.	65
Figura 14. Análise de enriquecimento funcional demonstrando o componente celular das fosfoproteínas do grupo vii (toxinas, neurotoxinas, defensinas e enzimas proteolíticas) identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.	66
Figura 15. Análise de enriquecimento funcional demonstrando o processo biológico das fosfoproteínas do grupo vii (toxinas, neurotoxinas, defensinas e enzimas proteolíticas) identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.	67

Figura 16. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico AAAGGAGQGGYGGGLGFGG**SK**, selecionando-se o íon m/z 860.3679 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de serina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na glândula ampulada maior da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *spidroin 1* através do banco de dados Araneae. 75

Figura 17. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **SMT**AAPGLGGYGGAGGAGGAAAA**TK**, selecionando-se o íon m/z 706.6445 $[M + 3H]^{3+}$, como precursor, e mostrando os sítos de oxidação no resíduo de metionina ($\Delta = +15$ Da) e no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na glândula agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae. 76

Figura 18. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico STGGYGGQAGAGGGGLGGYGGAGGA**TK**, selecionando-se o íon m/z 741.6457 $[M + 3H]^{3+}$, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae.....77

Figura 19. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **CGG**AGGAGAGGGAVGAGGA**TK**, selecionando-se o íon m/z 820.855 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na glândula agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *flagelliform silk protein* através do banco de dados Araneae.....78

Figura 20. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **CKGGAGAGAGGGLGGAGG****TK**, selecionando-se o íon m/z 820.8555 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *zinc finger protein 608-like* através do banco de dados Scorpion. 79

Figura 21. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **TSGGADCGGQGAGAGGGLGGYGGAGGA****TK**, selecionando-se o íon m/z 826.3333 $[M + 3H]^{3+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae. 80

Figura 22. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **CGAGGAGGAGGGALGGAGG****TK**, selecionando-se o íon m/z 856.3702 $[M + 3H]^{3+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *flagelliform silk protein* através do banco de dados Araneae. 81

Figura 23. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **CAGAGQGAGGAGGLGGAGG****TK**, selecionando-se o íon m/z 891.8881 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa

sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae.....82

Figura 24. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **C**AGGAGGAGAGGGLGGAAAGG**T**K, selecionando-se o íon m/z 891.8891 [M + 2H]²⁺, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *flagelliform silk protein* através do banco de dados Araneae.....83

Figura 25. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico MGGGYGGAGGGLGGYGGAGG**T**K, selecionando-se o íon m/z 919.8828 [M + 2H]²⁺, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *ctenidin-3-like* através do banco de dados Scorpiones. 84

Figura 26. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico STGGYGGQGGLGGYGGAGG**T**K, selecionando-se o íon m/z 955.4012 [M + 2H]²⁺, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *fibroin 1* através do banco de dados Araneae. 85

Figura 27. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico STNYGGAGGAGGAGGLGGYGG**S**K, selecionando-se o íon m/z 976.9002 [M + 2H]²⁺, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de serina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em

azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *flagelliform silk protein* através do banco de dados Araneae.....86

Figura 28. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico STNYGGQGGLGGYGGGGAAATK, selecionando-se o íon m/z 990.9171 [M + 2H]²⁺, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de serina (Δ = +80 Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *fibroin 2* através do banco de dados Araneae. 87

Figura 29. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico QKCASGLGGYGGQGAGGAAAAATK, selecionando-se o íon m/z 706.6435 [M + 3H]³⁺, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína (Δ = +57 Da) e fosforilação no resíduo de treonina (Δ = +80 Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae.....88

Figura 30. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico STGGYGGAGGGLGGYGGAGSK, selecionando-se o íon m/z 884.366 [M + 2H]²⁺, como precursor, e mostrando o sítio fosforilação no resíduo de serina (Δ = +80 Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *fibroin 2* através do banco de dados Araneae. 89

Figura 31. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico CAGAGAGGAGQGGLGGAGGAATK, selecionando-se o íon m/z 927.4062 [M + 2H]²⁺, como precursor, e mostrando os sítios de carbamidometilação no resíduo de cisteína (Δ = +57 Da) e fosforilação nos resíduo de treonina (Δ = +80 Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa

sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae.....90

Figura 32. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico STGGYGGAGGAGAGGGLGGYGGQGA**TK**, selecionando-se o íon m/z 1111.9609 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando o sítio fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *dragline silk spidroin 1* através do banco de dados Araneae. 91

Figura 33. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **CGQGGLGGGAGGAGAATK**, selecionando-se o íon m/z 763.8358 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae. 92

Figura 34. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico FSRP**S**FGYGGQGAGGAAAAAAGAG**SR**, selecionando-se o íon m/z 844.0377 $[M + 3H]^{3+}$, como precursor, e mostrando os dois sítos de carbamidometilação de fosforilação em resíduos de serina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *spidroin-1* através do banco de dados Araneae.....93

Figura 35. Ensaio de inseto-toxicidade com o extrato bruto das glândulas ampulada maior e agregada da aranha *T. clavipes*. Representação esquemática do ensaio de inseto-toxicidade. 94

Figura 36. Gráfico da curva de dose resposta do ensaio de inseto-toxicidade através da injeção do extrato bruto da glândula ampulada maior da aranha *T. clavipes* na hemocele de abelhas *A. mellifera* recém emergidas. Foram injetadas cinco

concentrações – 7,69ng/mg; 15,38ng/mg; 30,76ng/mg; 61,53ng/mg; 123,07ng/mg, além do grupo controle além do grupo controle representado pelo primeiro ponto da curva próximo a 0 (solução salina NaCl 0,9 % (m/v)). $DL_{50}=28,40 \pm 0,09$ ng/mg de inseto.....95

Figura 37. Gráfico da curva de dose resposta do ensaio de inseto-toxicidade através da injeção do extrato bruto da glândula agregada da aranha *T. clavipes* na hemocèle de abelhas *A. mellifera* recém emergidas. Foram injetadas cinco concentrações – 3,84ng/mg; 7,69ng/mg; 15,38ng/mg; 30,76ng/mg; 61,53ng/mg, além do grupo controle representado pelo primeiro ponto da curva próximo a 0 (solução salina NaCl 0,9 % (m/v)). $DL_{50}=23,07 \pm 0,09$ ng/mg de inseto. 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre as diferentes propriedades mecânicas de sedas de aranhas, seda do bicho da seda, fibras naturais e polímeros sintéticos (adaptado de Hinman et al., 2000; Lewis, 2006).	26
Tabela 2. Algumas das mais comuns e importantes PTMs (adaptado de Mann et al., 2003).	34
Tabela 3. Identificação das proteínas estruturais da teia (grupo “i”), em suas formas fosforiladas – as espidroínas. MM: Massa Molecular; PIP (%) – score, probabilidade de Identificação da Proteína; Glândulas de seda: AGRE – agregada, AMA- ampulada maior, FLAG – flageliforme, AME- ampulada; (+) presença da proteína, (-) ausência da proteína.	53
Tabela 4. Identificação das proteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas (grupo “vii”), em suas formas fosforiladas. MM: Massa Molecular; PIP (%) – score, probabilidade de Identificação da Proteína; Glândulas de seda: AGRE – agregada, AMA- ampulada maior, FLAG – flageliforme, AME- ampulada; (+) presença da proteína, (-) ausência da proteína.	61
Tabela 5. Sequências de peptídeos trípticos fosforilados, oriundos da análise individual das glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme, da aranha <i>T. clavipes</i> , e obtidos utilizando a abordagem de sequenciamento <i>de novo</i> através do software Peaks study 7 (Complete software for proteomics and PTMs). Essas sequências apresentaram identificações em bancos de dados através da ferramenta de alinhamento BLASTp. A tabela mostra as informações como sequência peptídica e localização glandular, ALC (Average Local Confidence) - % de confiabilidade de identificação da sequência pelo sequenciamento <i>de novo</i> , valores de m/z (massa/carga) observados, carga (z), RT – tempo de retenção, massa do peptídeo (Da); PTMs detectadas nos fragmentos – fosforilação nos resíduos de serina (S), tirosina (Y) e treonina (T) ($\Delta = +80$ Da), oxidação no resíduo de metionina (M) ($\Delta = +15$ Da), carbamidometilação nos resíduos de cisteína (C) ($\Delta = +57$ Da). Informações oriundas do alinhamento utilizando a ferramenta BLASTp: código de acesso da proteína identificadas, nome da proteína, taxonomia, banco de dados, % de identificação ID), E-value, e % de cobertura. Valores de massas de PTMs podem ser encontrados em http://www.unimod.org	70

SUMÁRIO

1.Introdução.....	21
1.1. As glândulas produtoras de seda da teia das aranhas construtoras de teia orbital	21
1.2. Aplicações biotecnológicas da seda.....	25
1.3. Composição bioquímica das glândulas produtoras de sedas das aranhas	31
1.4. O estudo das modificações pós-traducionais (PTMs)	33
2.Objetivos	37
3. Material e Métodos	38
3.1. Obtenção das glândulas de seda da aranha <i>Trichonephila clavipes</i>	38
3.2. Extração das proteínas.....	38
3.3. Quantificação da amostra.....	38
3.4. Enriquecimento das proteínas fosforiladas.....	38
3.5. Preparação das amostras para análise proteômica com a estratégia do tipo Shotgun.	39
3.6. Análises de espectrometria de massas.	39
3.7. Identificação das proteínas.....	40
3.8. Identificação das modificações pós-traducionais (PTMs).....	41
3.9. Análise e interpretação dos dados utilizando atribuição funcional por consulta à base do Gene Ontology (GO).....	41
3.10. Identificação das sequências peptídicas através da ferramenta de bioinformática BLASTp.....	41
3.11. Bioensaio de Inseto-toxicidade via hemocèle de abelhas <i>Apis mellífera</i>	41
3.11.1. Obtenção das abelhas	41
3.11.2. Ensaio de inseto-toxicidade por injeção via hemocèle	42
3.11.3. Análise estatística	42
4. Resultados e discussão.....	43
4.1. Análise proteômica com a identificação da modificação de fosforilação	43
4.2. Bioensaio de inseto-toxicidade das amostras fosforiladas	94
4.3 Qual seria a relevância da presença da fosforilação nas espidroínas e nas proteínas semelhantes a toxinas/neurotoxinas?	99
5.Conclusão	102
6. Referências bibliográficas.....	103

1.Introdução

1.1. As glândulas produtoras de 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 fúslas. 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 está a aranha *Nephila clavipes* (Figura 1), também conhecida como aranha construtora de teia aérea orbital. A família Nephilidae é composta por 58 espécies, cuja distribuição geográfica é predominantemente subtropical (Kuntner et al., 2013). Recentemente, a partir de estudos de filogenia, essa aranha passou a pertencer ao gênero *Trichonephila* e, portanto, passou a ser chamada de *Trichonephila clavipes* (Kuntner et al., 2019; Kallal et al., 2020).

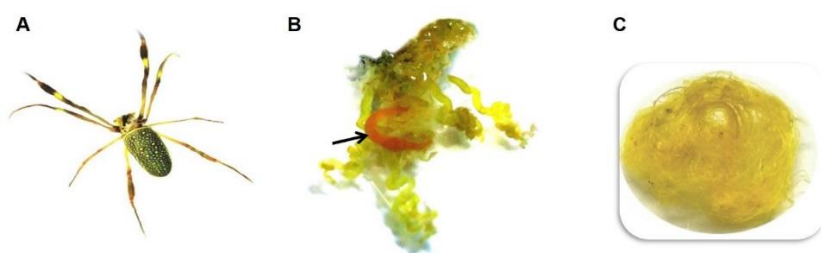


Figura 1. Aranha construtora de teia aérea orbital, **A** - *Trichonephila clavipes*, coletada no campus da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” localizado na cidade de Rio Claro, São Paulo. **B** - glândulas de seda da aranha *T. clavipes* destacando a glândula ampulada maior, indicada por uma seta; **C** - seda da teia da aranha *T. clavipes*. Imagens modificadas de dos Santos-Pinto et al., 2016.

As aranhas do gênero *Trichonephila* apresentam uma dieta carnívora e localizam-se nos espaços entre a vegetação e em áreas de florestas nas margens de rios. As teias são construídas estrategicamente entre os galhos das árvores, em uma altura em que costumam voar insetos, os quais ficam presos na teia servindo de alimento para as aranhas. Também são encontradas em áreas externas às moradias, construindo refúgio junto às paredes próximo de luminárias, o que facilita a captura de presas (Comstock, 1975; Humenik et al., 2011). No Brasil, estas aranhas são encontradas por toda a Mata Atlântica (Brescovit et al., 2004); são animais peçonhentos, entretanto, não são agressivos, dificilmente abandonam suas teias e a ação de seu

veneno não tem importância médica, causando no homem apenas vermelhidão e leve dor no local da picada (Allmeling et al., 2006).

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 de seda nas aranhas, e cada uma é responsável pela produção de um tipo específico deste material (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 *Triconephila*, possuem um conjunto de glândulas abdominais composto por até sete tipos diferentes de glândulas (Figura 2): glândulas ampulada maior, ampulada menor, flageliforme, cilíndrica ou tubuliforme, aciniforme, piriforme e agregada (Rousseau et al., 2009). Acredita-se que essas diferentes glândulas evoluíram a partir de um único tipo ancestral, e se divergiram na anatomia, no conteúdo do lúmen e na morfologia (Vollrath, 1992).

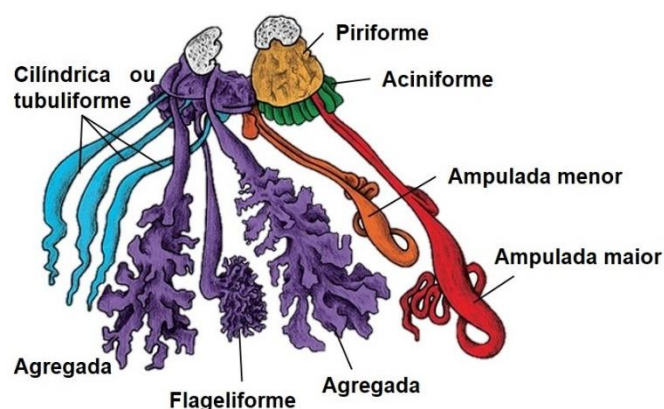


Figura 2. Esquema representativo das glândulas produtoras de seda das aranhas tecedoras de teias orbitais (adaptado de Vollrath, 2000).

A glândula ampulada maior é a mais volumosa e de fácil acesso de todas as glândulas produtoras de seda, sendo, portanto a mais utilizada como modelo nos estudos para se compreender e decifrar as características morfológicas e funcionais do mecanismo de fiação. Estudos demonstraram que essa glândula é composta

basicamente de três partes: a cauda, na qual as proteínas, chamadas espidroínas, são sintetizadas; a ampola, onde as proteínas são armazenadas em uma solução aquosa; e o ducto de fiação onde ocorre a formação das fibras (Knight et al., 2000; Lefèvre et al., 2011).

A habilidade de tecer uma fibra sólida a partir de uma solução altamente viscosa, porém aquosa, é única e incomparável na química dos polímeros. A aranha utiliza um mecanismo que evita a auto-organização e a interação das proteínas, antes de serem liberadas pelo ducto de fiação para a formação das fibras sólidas. Para compreender esse mecanismo, e dessa forma, reproduzir como a aranha produz a seda é necessário conhecimento, não só sobre as propriedades mecânicas das fibras da seda, mas também como das espidroínas individuais que constituem as fibras que são secretadas e armazenadas nas glândulas; e ainda, como essa seda é expelida em uma fibra sólida a partir de uma solução líquida cristalina de fiação, sem usar solventes extremos ou outras condições ambientais. 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 (Figura 3); e possuem aplicações em tarefas específicas como captura de presas, reprodução, e como linha de segurança “escape” para fugir de predadores (Vollrath, 2000). As glândulas de seda presentes na aranha *Trichonephila clavipes* representam uma conquista fundamental para o desenvolvimento dessa espécie, uma vez que a seda é utilizada, não só na construção das teias de captura, como também nos cuidados com a prole e para atrair os machos no processo de acasalamento (Bittencourt et al., 2012; Rising et al., 2005).

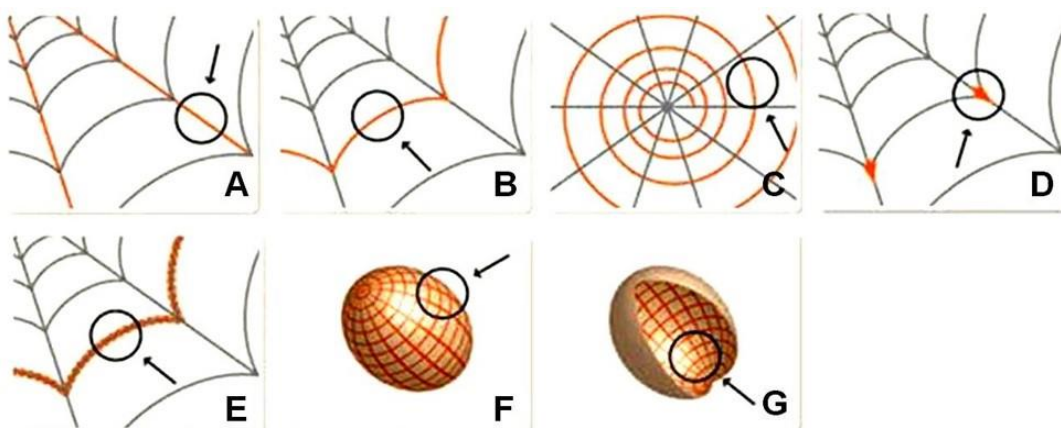


Figura 3. Tipos de fios de seda secretados pelas aranhas tecedoras de teias orbitais. A - glândula ampulada maior secreta os fios de seda dos raios da teia orbital, do frame e da linha de segurança “escape”; B - glândula flageliforme secreta os fios de seda da espiral de captura; C - glândula ampulada 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 cobrem/protegem 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).

Essa organização em um complexo de glândulas para produção de seda apresentado pelas aranhas, não apenas permite que a seda seja produzida para usos específicos como também, proporciona a produção de múltiplas fibras simultaneamente. Mais de 130 formas diferentes de teias de aranha são conhecidas. Os frames e os raios da teia orbital são construídos a partir de uma seda forte e bastante rígida, apresentando uma combinação excepcional de resistência e extensibilidade (Vollrath, 2000). As proteínas dessa seda são produzidas nas glândulas ampuladas maiores, enquanto que a espiral de captura de uma teia orbital compreende fibras de seda de apenas um tipo de proteína produzida na glândula flageliforme. Essa seda é altamente elástica e dissipa perfeitamente a energia produzida pelo impacto das presas se colidindo contra a teia. A enorme resistência dessas fibras é importante para a captura e detenção de presas, que às vezes são maiores do que as próprias aranhas (Römer et al., 2008). Além das fibras de seda produzidas pelas glândulas ampulada maior e flageliforme, as aranhas utilizam ainda as fibras de seda produzidas pela glândula ampulada menor para auxiliar a construção

da espiral de captura. As propriedades mecânicas dessa seda são semelhantes aos da seda produzida pela ampulada maior, apesar de sua resistência ser menor e a elasticidade maior (Blackledge et al., 2006). As conexões entre as sedas e a fixação da teia sobre um substrato (árvores, arbustos, alvenaria, etc.), são realizadas por uma fibra de seda sofisticada, composta por proteínas produzidas pela glândula piriforme. A espiral de captura apresenta um revestimento adesivo aquoso secretado pela glândula agregada; os ovos são protegidos/cobertos externamente, após a postura, por uma bolsa de seda produzida pela glândula tubuliforme e protegidos internamente por fios de seda secretados pela glândula aciniforme (Gosline, 1986; Römer et al., 2008).

1.2. Aplicações biotecnológicas da seda

A exploração das aplicações da seda produzida pelas aranhas tem se mostrado potencialmente equivalente àquelas já conhecidas para a seda produzida pelo “bicho da seda” (*Bombyx mori*), que tem sido domesticado a mais de cinco mil anos (Kluge et al., 2008). Atualmente a seda do “bicho da seda” é utilizada em larga escala pela indústria têxtil, demonstrando também aplicações biomédicas e desenvolvimento de novos biomateriais (Chen et al., 2010). Essas aplicações também podem ser estabelecidas para a seda de aranhas, oferecendo um grande potencial em aplicações biomédicas devido à combinação de propriedades mecânicas, biocompatibilidade e lenta biodegradabilidade (Altman et al., 2003).

Diferente do “bicho da seda”, as aranhas não foram domesticadas para produzirem fibras em escala industrial. Essa diferença deve-se à dificuldade de se obter grandes populações de aranhas, devido a sua natureza solitária, predadora, e dependente da sazonalidade. Além disso, as sedas de aranhas são produzidas em pequena quantidade e não podem ser enoveladas como uma fibra simples, de forma semelhante ao que ocorre com o casulo do “bicho da seda” (Altman et al., 2003). Entretanto, as características físicas das sedas de aranhas são muito superiores às encontradas nas sedas de *Bombyx mori*. As sedas de aranhas são biomateriais leves, extremamente fortes e elásticas, e apresentam características mecânicas comparáveis às melhores fibras sintéticas já produzidas pela alta tecnologia (Hinman et al., 2000). A tabela 1 mostra a comparação entre as diferentes propriedades mecânicas de alguns tipos de sedas produzidas pelas aranhas do gênero *Trichonephila*, em relação a alguns materiais naturais ou sintéticos.

Tabela 1. Comparação entre as diferentes propriedades mecânicas de sedas de aranhas, seda do bicho da seda, fibras naturais e polímeros sintéticos (adaptado de Hinman et al., 2000; Lewis, 2006).

Tipos de materiais	Tensão (Pa)	Extensibilidade (%)	Energia para romper (J/Kg)
Seda produzida pela glândula ampulada maior	4×10^9	35	1×10^5
Seda produzida pela glândula ampulada menor	1×10^9	5	3×10^4
Seda produzida pela glândula flageliforme	1×10^9	>200	1×10^5
Seda produzida pelo “bicho da seda”	1.3×10^9	-----	-----
Kevlar	4×10^9	5	3×10^4
Borracha	1×10^6	600	8×10^4
Nylon tipo 6	7×10^7	200	6×10^4

Diversos estudos comparam a seda de aranhas com materiais sintéticos mais resistentes, como por exemplo, o kevlar, uma fibra de poliamida aromática produzida pela empresa DuPont. O kevlar é uma inovação tecnológica, e assim como as fibras da seda de aranhas, é extremamente resistente e apresenta baixo peso molecular por isso é de grande interesse industrial, podendo ser produzida de diferentes formas

dependendo de sua aplicação. Sendo assim, é possível que alguns materiais à base de biopolímeros de seda de aranha possam ser desenvolvidos com uma grande aceitação e aplicabilidade (Hinman et al., 2000; Lewis, 2006; Slotta et al., 2012).

Considerando as suas propriedades mecânicas e físico-químicas, a seda de aranha é perfeitamente adequada para inúmeras aplicações industriais. A produção em larga escala das fibras da seda de aranha tornaria possível a elaboração de uma nova geração de biomateriais com elevado grau de biodegradabilidade, envolvendo aplicações práticas em diferentes segmentos do setor industrial. Alternativamente a inabilidade de domesticar as aranhas, de forma a produzirem quantidades necessárias e suficientes de proteínas para propiciar estudos e utilização comercial, a seda de aranha tem sido produzida como proteínas recombinantes utilizando a tecnologia do DNA recombinante e a engenharia de organismos hospedeiros (Hardy et al., 2008; Rising et al., 2011; Eisoldt et al., 2011; Cranford et al., 2012; Slotta et al., 2012).

O campo de aplicações para o uso da seda tem se tornado cada vez mais amplo, porém as áreas mais promissoras têm sido as áreas médica e de engenharia de tecidos. Em estudos de Allmeling et al. (2006), fibras de seda de aranha foram coletadas e semeadas com células de Schwann humanas, para se investigar uma possível biocompatibilidade, sugerindo uma promissora estratégia para um futuro tratamento das lesões nervosas periféricas. Utilizados em conjunto, os biomateriais a base de seda tem se mostrado promissores na engenharia de tecidos esqueléticos como ossos, ligamentos e cartilagens, tecidos conjuntivos, atuando como fios de sutura mais finos e mais resistentes, curativos e suportes para a recuperação ou a substituição de tendões e ligamentos (Scheller et al., 2004; Kluge et al., 2008). Estudos de biocompatibilidade *in vivo* e *in vitro* demonstraram que um recombinante, rS1/9 *scaffolds*, análogo à proteína espidroína-1 presente na seda, pode ser potencialmente aplicável na regeneração de tecidos *in vivo* (Moisenovich et al., 2011; Moisenovich et al., 2012).

As proteínas da seda têm se mostrado totalmente solúveis em água, solventes orgânicos e líquidos iônicos, indicando uma versatilidade de opções disponíveis na qual podem ser transformadas em novos biomateriais como fibras, filmes, géis, esponjas porosas e outros sistemas de aplicabilidade biomédica (Vepari et al., 2007). E finalmente, a seda de aranha pode ser aplicada também na indústria têxtil. Segundo pesquisadores da indústria têxtil DuPont, o fio de seda da aranha é tão resistente que

seria capaz de “parar um Boing 747 em pleno vôo”, e ao mesmo tempo, ser tão maleável que poderia ser utilizado como tecido para roupas (Fiber engineers, meet thy master, 1996)

Estudos têm demonstrado a eficácia da utilização dessa seda para coletes à prova de balas, tornando-os mais leves, flexíveis e resistentes; assim como componentes para aviões e pára-choques de automóveis (Teia de aranha pode ser matéria prima para a indústria, 2002).

A utilidade para os fios da seda variam, desde a confecção de casco de navios, airbags para automóveis, fibras ópticas até lingerie confortáveis (Helmer, 2001). Outras aplicações se referem a produtos cosméticos como shampoos, sabonetes e cremes, realçando o brilho, maciez e resistência do produto (Yang et al., 2005; Slotta et al., 2007).

A AMSilk® *high performance materials* é uma empresa alemã, fundada em 2008, que desenvolveu um processo patenteado para a produção de seda de aranhas em escala industrial, com o desenvolvimento de novos produtos com qualidade superior e características anteriormente inatingíveis, com base nas propriedades mecânicas e físico-químicas da seda de aranhas. As proteínas da seda AMSilk mimetizam as espidroínas que constituem as fibras da seda de aranhas, com diversas propriedades desejáveis que não são encontradas em comum com o “bicho da seda” *Bombyx mori*. Essas proteínas são não imunogênicas, biocompatíveis e possuem propriedades únicas de revestimento; e podem ser produzidas com um elevado grau de pureza e qualidade. A tecnologia AMSilk® abrange diferentes setores e aplicações, incluindo aplicações biomédicas, farmacêuticas e desenvolvimento de fibras.

A AMSilk® desenvolveu uma fibra única produzida através de proteínas recombinantes da seda de aranhas. Essa fibra foi apresentada com a marca de *Biosteel* (Figura 4), que como outras fibras sintéticas pode ser fabricada como um monofilamento ou multifilamento. Trata-se de uma fibra branca com um brilho sedoso e permeável à água; mostra-se suave sobre a pele e, como a seda normal, pode ser processada e corada. Utilizando métodos biotecnológicos, a matéria-prima - inicialmente na forma de pó - é produzida em grande quantidade e alta qualidade. O processo é baseado nas descobertas do Professor Dr. Thomas Scheibel da Universidade de Bayreuth, Alemanha, que foram desenvolvidas tecnologicamente pela AMSilk®.

O *Biosteel Spidersilk Fibers* permite que as propriedades versáteis da seda de aranhas possam ser utilizadas comercialmente. As características únicas das proteínas da seda podem ser adaptadas e orientadas para a fabricação de produtos sob medida. Estudos mostraram que o material é adequado para aplicações biomédicas, como por exemplo, material de sutura, curativos e outras aplicações cirúrgicas.



Figura 4. *Biosteel Spidersilk Fibers* produzida pela AMSilk® high performance materials.

Em paralelo com o desenvolvimento da fibra *Biosteel*, a AMSilk® está expandindo a produção de matérias-primas para apoiar o desenvolvimento de aplicações em diversas áreas, buscando uma ampla gama de produtos baseados na plataforma *Spidersilk*, incluindo revestimentos de implantes mamários de silicone, filmes, tecidos, grânulos, fibras e cosméticos a base de seda. Estudos pré-clínicos mostraram que os implantes mamários de silicone são mais bem aceitos pelo corpo quando revestido com *BioShield-S1*, um filme especial de seda de aranha não imunogênica. Especificamente, a fibrose capsular e a inflamação são significativamente reduzidas (AMSilk® - <http://www.amsilk.com>; dos Santos-Pinto 2014). A empresa está desenvolvendo também um novo conceito de tratamento de ferimentos baseado nas proteínas da seda de aranhas. Um produto denominado de *SanaSilk* está sendo desenvolvido para efetivamente hidratar a pele e criar um filme de seda com a função de proteger a pele. Um outro produto é o *TruSilk® Deluxe Line* um cosmético inovador para a pele que contém verdadeiras proteínas oriundas da seda de aranhas que transfere os seus benefícios para a pele. Misturado com ingredientes naturais, o creme protege a pele deixando uma camada lisa e macia de

seda sobre a pele com efeitos de equilíbrio da umidade; dessa forma a pele mostra-se fresca, macia e com brilho (AMSilk® - <http://www.amsilk.com>). A AMSilk® já começou a disponibilizar a seda de aranhas (Figura 5) como ingrediente para cosméticos sendo a primeira seda funcional no mercado testada e aprovada para formulações de cosméticos.

A AMSilk® é uma marca registrada da AMSilk GmbH, Alemanha, União Europeia e os EUA que vem crescendo muito desde a sua fundação e atualmente possui mais de 18 aplicações de patentes, das quais diversas já foram concedidas. Apresenta diversas publicações sobre as mais diversas aplicabilidades para a seda de aranhas (Hardy et al., 2009; Lammel et al., 2011; Spiess et al., 2010; Hagn et al., 2011; Humenik et al., 2011; Eisoldt et al., 2011; Leimer et al., 2012; AMSilk® - <http://www.amsilk.com>).



Figura 5. Cosméticos produzidos pela AMSilk® *high performance materials* contendo as propriedades da seda de aranhas comercialmente disponíveis.

(http://www.amsilk.com/fileadmin/content/TechInsight_Cosmetics.pdf).

Como pode ser notado, a seda da teia de aranhas se encaixa perfeitamente dentro da prática bioprospectiva do processo de transformação de recursos biológicos para a obtenção de produtos com uma aplicabilidade biotecnológica possibilitando o desenvolvimento de diversos produtos baseados nas propriedades mecânicas e físico-químicas da seda.

1.3. Composição bioquímica das glândulas produtoras de sedas das aranhas

Apesar do grande interesse pelas propriedades mecânicas da seda das aranhas, visando o seu uso em aplicações biomédicas e biotecnológicas devido às suas propriedades de resistência, elasticidade e biocompatibilidade (Vollrath et al., 2002; Numata, 2020), surpreendentemente ainda pouco se conhece sobre os detalhes das glândulas produtoras de seda e o processo de fiação que ocorre para a produção das fibras. Alguns estudos têm abordado não só as propriedades mecânicas da seda, mas também como se dá a produção natural das espidroínas constituintes da seda, o processo de fiação e ainda a morfologia e composição das glândulas produtoras de seda (Eisoldt et al., 2011; Slotta et al., 2012; Andersson et al., 2013; Chaw et al., 2015; dos Santos-Pinto et al., 2016, 2019).

Nos últimos anos alguns estudos utilizando de uma abordagem “ômica”, ou então a combinação entre as diferentes abordagens, têm apresentado resultados que possibilitam uma compreensão sobre o processo de fiação da seda pelas glândulas. Nos estudos de Chaw et al. (2015), utilizando uma abordagem de transcriptoma foram relatados 48 diferentes formas de proteínas relacionadas com a seda, presente nas glândulas ampulada maior e menor e na glândula tubuliforme da aranha *L. hesperus*, sugerindo que as aranhas podem apresentar diferentes formas para contruir as suas teias utilizando diferentes propriedades da seda. Também nesse estudo foram identificadas algumas proteínas como sendo similares aos componentes de venenos.

Em estudos de dos Santos-Pinto et al. (2016), realizados em nosso laboratório, utilizando uma abordagem proteômica *bottom-up gel-based* e *gel-free shotgun*, relataram a identificação de 469 proteínas presentes em seis glândulas de seda (ampulada maior e menor, tubuliforme, agregada, flageliforme e aciniforme) da aranha *T. clavipes*. Essas proteínas foram relacionadas com o envolvimento na secreção das proteínas da seda, transporte, regulação de atividades proteolíticas e preservação das proteínas da seda contra o estresse oxidativo e degradação, durante todo o processo de fiação. Além disso, nesse estudo também foram identificadas algumas toxinas e neurotoxinas comuns em venenos animais tais como proteínas semelhantes à delta-latroinsectotoxin-Lt1a, alpha-latrotoxin-Lt1a, toxin acra I-3, conotoxin MiEr95, e M-lycotoxin-Ls4a, sugerindo que essas proteínas podem contribuir para a paralisia e captura de presas; dessa forma esses resultados corroboram a hipótese de que a teia da aranha *T. clavipes* desempenha um papel ativo na captura de suas presas.

Recentemente, dos Santos-Pinto e colaboradores (2019), exploraram o conteúdo das glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes* por meio de uma análise proteotranscriptômica em larga escala, a fim de conhecer melhor a composição glândular desta aranha. Os resultados do transcriptoma demonstraram a presença de 46 transcritos que codificam proteínas homólogas às espidroínas. Devido a grande quantidade de dados fornecidos pelo transcriptoma, decidiu-se utilizar o banco de dados de proteínas baseado no transcriptoma das glândulas de seda da aranha *T. clavipes* para identificar padrões de expressão de proteínas individualmente produzidas nas glândulas de seda; e para isso, a abordagem proteômica shotgun (livre de gel) foi utilizada. Os resultados da análise proteômica mostraram que 1961 proteínas estavam sendo expressas pela glândula ampulada maior, 860 na glândula ampulada menor, 843 na flageliforme e 927 na agregada. O estudo, portanto, revelou um extenso repertório de proteínas desconhecidas até então, que possivelmente estão envolvidas no processo de secreção das proteínas para a fiação dos fios de seda.

Além da constituição proteica, a teia da aranha *T. clavipes* apresenta gotículas viscosas (secretadas pela glândula agregada) em sua superfície, que desempenham um papel importante na captura de presas. Essas gotículas são constituídas por diferentes compostos químicos solução aquosa, e uma camada lipídica na qual ocorre uma suspensão de vesículas contendo polipeptídeos e/ou lipídios (Salles et al., 2006). Volsi et al. (2006) relatam a identificação e a caracterização bioquímica de três peptídeos relacionados à bradicinina (nephilacinas I a III), a partir do extrato aquoso de lavagem da teia da aranha *T. clavipes*, aparentemente utilizados como toxinas para captura de presas. Em 2020, o estudo realizado por Esteves et al., também com a aranha *T. clavipes*, forneceram resultados com base nas abordagens proteômica e transcriptômica de base quantitativa, que evidenciaram um extenso repertório de proteínas semelhantes a toxinas e neurotoxinas, já relatados anteriormente em venenos de aranhas; estes resultados em conjunto aqueles encontrados nos ensaios de inseto-toxicidade demonstraram o potencial tóxico desses componentes como armas químicas letais e/ou na paralisia de presas. E ainda nos estudos de Esteves (2021) foram identificados um total de 11 peptídeos (de sequências conservadas em relação a algumas toxinas e neurotoxinas); esses peptídeos foram sintetizados e submetidos aos ensaios de inseto-toxicidade. Os resultados desses ensaios demonstraram que seis desses peptídeos apresentaram atividade inseto-tóxicas.

Marques e et al., (2005), demonstraram que existem algumas toxinas de baixas massas moleculares que são sintetizadas por certas glândulas produtoras de seda, e somente depositadas sobre a seda da teia da aranha *Trichononephila clavipes* em determinados períodos do ano, como primavera / verão ou outono / 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 / verão.

Muitos desses compostos, identificados como semelhantes a toxinas e neurotoxinas, podem apresentar um potencial no desenvolvimento de bioinseticidas. Dessa forma, atualmente muitas toxinas de diferentes fontes vêm sendo estudadas como potenciais inseticidas bioativos (Peferoen et al., 1997; Shu et al., 2007, Hurst et al., 2007, Matsushita et al., 2007, Ribeiro et al., 2008; Yoshimoto et al., 2019; Baptista & Konno, 2020).

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

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

As modificações pós-traducionais que consistem em modificações químicas de proteínas após a tradução, e se tornaram 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 múltiplos sítios, podendo ocorrer em muitos resíduos de aminoácidos do mesmo grupo; ou em uma série de cascatas que são cruciais para a função da proteína (Walsh et al., 2005). Atualmente são conhecidas mais de 300 PTMs, entre as quais estão incluídas a adição de grupos químicos, como

por exemplo, o fosfato ou acetado, ou moléculas mais complexas como carboidratos ou lipídeos, 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 (Tabela 2).

Tabela 2. Algumas das mais comuns e importantes PTMs (adaptado de Mann et al., 2003).

PTMs	Δ Massa (Da)*	Estabilidade durante a fragmentação por MS/MS**
Fosforilação		
Tyr	+80	+++
Ser/Thr	+80	+ / ++
Acetilação	+42	+++
Metilação	+14	+++
Glicosilação		
N-	>800	+ / ++
O-	203, >800	+ / ++
Hidroxiprolina	+16	+++
Pontes dissulfeto	-2	++
Deamidação	+1	+++
Ubiquitinação	>1,000	+ / ++
Nitrotirosina	+45	+ / ++

* Valores de Δ Massa (Da) de PTMs podem ser encontrados em:

<http://www.unimod.org/>

**Estabilidade: + instável; ++ moderadamente estável; +++ estável.

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).

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 (Figura 6). Diversos tipos de fosforilações têm sido relatados, sendo os mais freqüentes a fosforilação do grupo hidroxila dos resíduos de treonina, serina e tirosina (Ribet et al., 2010).

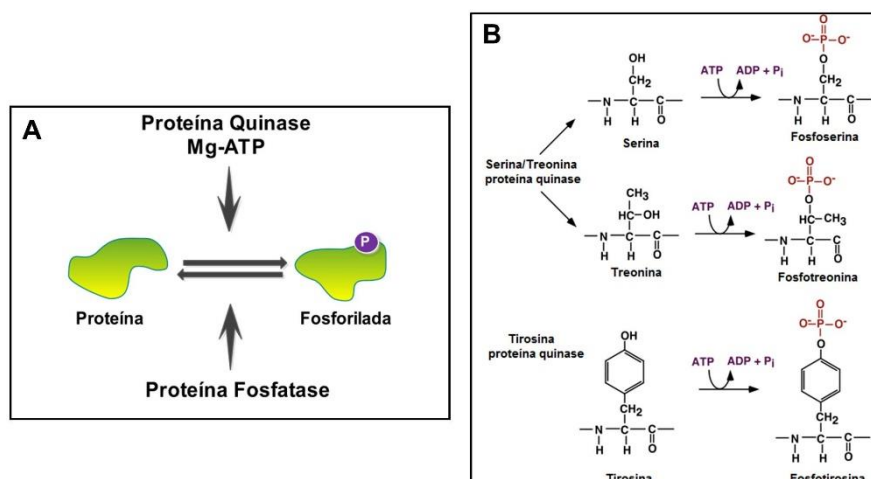


Figura 6. A - Esquema representativo da regulação da fosforilação de uma proteína. A enzima quinase é responsável pela adição do grupo fosfato à proteína, enquanto que a enzima fosfatase é responsável pela remoção do grupo. **B** - fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina.

A glicosilação é também uma das PTMs mais comuns em certas proteínas secretadas por 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. A caracterização de PTMs por LC-MS/MS é atualmente viável (Mann et al., 2003; Johnson & Evers 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 através das 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 condições de quantificar as mudanças relativas das PTMs em locais distintos. Nenhuma outra técnica apresenta todas essas vantagens características (Larsen et al., 2006).

A caracterização de PTMs por LC-MS/MS é atualmente viável utilizando uma série de abordagens complementares como: (i) espectrometria de massas sequencial (MS/MS) utilizando um ou mais de um métodos de fragmentação disponíveis como CID (dissociação induzida por colisão), ECD (dissociação por captura de elétrons), e/ou ETD (dissociação por transferência de elétrons) tanto para a determinação da sequência de aminoácidos quanto para a determinação do tipo e localização da PTM; (ii) remoção da PTM entre análises consecutivas de espectrometria de massas; (iii) enriquecimento seletivo de proteínas ou peptídeos baseados no grupo funcional modificado antes das análises de MS/MS; e (iv) utilização de várias estratégias de MS para a determinação de PTMs específicas (Johnson & Eyers et al., 2010). Portanto, não existe uma estratégia universal para identificar as PTMs e todas as abordagens utilizadas apresentam as suas limitações. No entanto, o uso de cromatografia de afinidade, como o método de enriquecimento de fosforilação, combinado 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 as glândulas de seda de aranhas. 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 e nano-ESI-MS/MS (Haas et al., 2006; Roepstorff, 2012; Ni et al., 2016).

Como mencionado anteriormente, as estratégias de enriquecimento podem ajudar a aumentar o número de identificações de sequências que apresentam

modificações pós-traducionais em amostras complexas. As estratégias de enriquecimento para a identificação das modificações de fosforilação em amostras complexas, por exemplo, vêm sendo muito utilizadas atualmente; e podem ocorrer principalmente por meio de cromatografia de afinidade, que requer um ligante de afinidade acoplado a uma matriz. Dentre estas técnicas estão: a cromatografia de imunoafinidade - nessa estratégia, anticorpos são utilizados como reagentes de afinidade e, portanto, esta abordagem é limitada pela disponibilidade comercial de anticorpos contra resíduos fosforilados Ser, Tyr e Thr (resíduos em que ocorrem as modificações) (Paradela & Albar, 2008; Batalha et al., 2012); temos também a cromatografia de afinidade de metal imobilizado (IMAC) - em que os fosfopeptídeos apresentam afinidade por íons metálicos (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Zr^{4+}) (Block et al., 2009); a cromatografia de afinidade de óxido de metal (MOAC) - esta estratégia normalmente utiliza dióxido de titânio (TiO_2), que se torna ponto de ancoragem para os fosfopeptídeo (Leitner, 2010); e recentemente uma nova técnica, SIMAC (eluição sequencial de IMAC) foi relatada como uma versão melhorada da combinação entre IMAC e TiO_2 (Thingholm, et al., 2009; Batalha et al., 2012).

No presente estudo, considerando a complexidade das glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes*, e o importante papel dessas glândulas na produção de diferentes tipos de fibras, utilizamos de uma combinação de métodos de enriquecimento de fosforilação, por afinidade com óxido de metal (TiO_2) e análises de espectrometria de massas (LC-MS/MS) para identificar proteínas fosforiladas extraídas das glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes*. A abordagem biológica de sistemas busca novas aplicações farmacológicas e biotecnológicas para as moléculas estudadas, ao se levar em consideração o papel funcional das mesmas, sendo que a determinação de PTMs é fundamental para uma melhor compreensão sobre a atuação das proteínas identificadas.

2.Objetivos

Considerando a presença da modificação pós-traducional de fosforilação nas amostras, o objetivo do presente estudo foi identificar o perfil fosfoproteômico das proteínas presentes nas secreções das glândulas produtoras de seda da aranha *Trichonephila clavipes*.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção das glândulas de seda da aranha *Trichonephila clavipes*.

As aranhas *T. clavipes* foram coletadas em regiões rurais das cidades de Cordeirópolis, Santa Gertrudes e Rio Claro, do Estado de São Paulo, de maneira georreferenciada (22°23'43.6"S 47°32'38.9"W), para que fossem dissecadas para a retirada das glândulas produtoras de seda, mais especificamente aquelas que estão associadas a produção das fibras que constituem a seda da teia, que são as glândulas ampulada maior, ampulada menor, agregada e flageliforme.

3.2. Extração das proteínas.

As glândulas foram dissecadas e armazenadas individualmente em frascos distintos. Logo em seguida, foram maceradas individualmente contra a parede do ependorff, na presença de tampão acetato de amônio 10 mM, pH 6.8 contendo um coquetel de inibidores de proteases (Sigma) 0.2% (v/v), PMSF 1mM, e inibidores de fosfatase (Sigma) 0.2% (v/v); liberando dessa forma, o conteúdo do lavado do lumen da glândula. As amostras foram então centrifugadas à 8000 x g por 10 min, 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 permaneceram armazenados a -20°C, até o momento de serem utilizados individualmente.

3.3. Quantificação da amostra.

A quantificação de proteínas das amostras individuais, foi determinada pelo kit Qubit® Protein Assay (Life Technologies – Qubit® 3.0 fluorometer), conforme instruções do fabricante.

3.4. Enriquecimento das proteínas fosforiladas.

Com a finalidade de favorecer a identificação das modificações de fosforilação nas proteínas das amostras, foi realizado o tratamento de enriquecimento individualmente em cada uma das amostras utilizando o kit High-Select TiO₂ Phosphopeptide Enrichment (Thermo Scientific™), conforme as instruções do protocolo do fabricante.

3.5. Preparação das amostras para análise proteômica com a estratégia do tipo Shotgun.

Para a realização da estratégia de shotgun, as amostras individuais (400 µg de extrato seco) de proteínas enriquecidas, de cada uma das glândulas produtoras de seda, foram solublizadas em bicarbonato de amônio 50mM, pH 7.9 contendo urea 7.5 M, e incubada por 60 min a 25°C sob leves agitações periódicas, para que em seguida fosse realizado o tratamento de redução e alquilação com a adição de DTT 10mM por 60 min à 37°C; e iodoacetamida 40mM também por 60 min a 25°C. 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 a 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 fragmentos peptídicos gerados da digestão foram eluídos da coluna com ACN 80%/TFA 0.1%, secos em *speedvac* e solubilizados em ACN 2%/ácido fórmico 0.5% para serem analisados.

3.6. 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 (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 a 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).

3.7. Identificação das proteínas.

Para a identificação das proteínas foi utilizado o servidor MASCOT 2.3.02 (Matrix Science, London, UK) realizando buscas contra os bancos de dados Arachnida, Araneae e ArachnoServer database. 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. Dessa forma foram utilizados os seguintes parâmetros:

- a) Enzima: Tripsina
- b) Carbamidometilação (C) como modificação fixa
- c) Oxidação (M), Fosforilação (Y) e Fosforilação (ST) como modificação variável
- d) Nº de clivagens perdidas pela enzima: 2
- e) Massa molecular do tipo: Monoisotópica
- f) Massa molecular: sem restrições
- g) Erro de tolerância de peptídeos $\pm 0.2\text{Da}$ e erro de tolerância de $\text{MS}^n \pm 0.5\text{ Da}$
- h) Protonação: +1, +2, +3 para o estado da carga dos peptídeos
- i) Tipo de instrumento: ESI-Trap
- j) Protein Scores significativos ($p < 0.05$) foram admitidos para a identificação das proteínas.
- k) Número mínimo de peptídeos: 2

Além disso, 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%). 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 de 95%.

3.8. Identificação das modificações pós-traducionais (PTMs).

Os espectros MSⁿ foram adquiridos e uma lista de picos foi gerada utilizando o software DataAnalysis 4.1. As modificações de fosforilação (Y, S, T) foram selecionadas nos parâmetros de busca, e adicionadas para a busca de PTMs nos fragmentos peptídicos dos espectros de MSⁿ 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.

3.9. 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* (Schmidt et al., 2014; <http://geneontology.org/>, The Gene Ontology Consortium, 2015), e de acordo com os termos do algoritmo FunRich 3.0 – Functional Enrichment Analysis Tool (Pathan et al., 2015). Com base nos termos GO - componente celular, processo biológico e função molecular destas proteínas, foi proposto um agrupamento funcional para para as proteínas identificadas nas sedas das aranhas (dos Santos-Pinto et al., 2016).

3.10. Identificação das sequências peptídicas através da ferramenta de bioinformática BLASTp.

As sequências peptídicas obtidas que não apresentaram resultados nas buscas contra os bancos de dados mencionados acima, foram novamente submetidas às buscas nos bancos de dados Araneae, Scorpiones, Arachnida e Arthropoda, NCBI nr, por meio da ferramenta de bioinformática de alinhamento de sequências de proteínas (BLASTP) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) Somente foram consideradas as identificações que apresentaram valores de E-value $\leq 1.10^{-4}$ e cobertura de sequência $\geq 70\%$.

3.11. Bioensaio de Inseto-toxicidade via hemocèle de abelhas *Apis mellífera*

3.11.1. Obtenção das abelhas

Abelhas recém-emergidas foram obtidas de colmeias saudáveis de *Apis mellífera* africanizada, Linnaeus 1758 (Moure, 2012) no apiário do Departamento de Biologia da UNESP, Rio Claro / Brasil. Para a obter as abelhas recém-emergidas, três

recipientes com ninhadas lacradas (próximos à emergência dos adultos) foram coletados e mantidos em câmara de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) a 34 ± 2 ° C, umidade relativa de $80 \pm 10\%$ e no escuro. Usando este procedimento, obtivemos espécimes de uma idade conhecida (0-24h).

3.11.2. Ensaio de inseto-toxicidade por injeção via hemocèle

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Manzoli Palma et al. 2003, no qual as cinco concentrações foram definidas através da relação do extrato seco das glândulas ampulada maior e agregada pelo peso do inseto (ng/mg) - neste caso foram utilizadas as abelhas *Apis mellifera* recém emergidas de 65mg. Sendo assim, inicialmente foi injetado 1 µL do extrato da glândula ampulada maior nas concentrações - 7,69ng/mg; 15,38ng/mg; 30,76ng/mg; 61,53ng/mg; 123,07ng/mg e para a glândula agregada nas concentrações – 3,84ng/mg; 7,69ng/mg; 15,38ng/mg; 30,76ng/mg; 61,53ng/mg. Posteriormente, para o grupo controle foi injetado 1 µL de solução salina (NaCl 0,9 % (m/v)). É importante mencionar que as concentrações foram injetadas com auxílio de uma seringa (Hamilton®) de 50 µL inserida em um dispenser (Hamilton® PB600) na inserção entre o primeiro e o segundo terço, diretamente na hemolinfa da abelha.

Após a injeção, as abelhas recém-emergidas foram mantidas em câmaras plásticas de 250 ml e alimentadas em grupos por meio de pequenos recipientes contendo uma solução pastosa de açúcar (50%) e mel. Os recipientes foram mantidos em BOD a 32 ± 2 ° C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e em escuridão constante. Deve-se considerar que, para cada concentração, foram realizadas três réplicas de 10 abelhas recém-emergidas e para cada réplica a mortalidade foi verificada após 24 horas da injeção. Portanto, a DL_{50} foi calculada a partir da concentração em “ng de extrato seco/mg inseto” necessária para matar 50% da população testada. Além disso, também foram observadas as seguintes respostas ao extrato: animal ativo, movimentos lentos, paralisia e morte, conforme descrito por Zlotkin (1983).

3.11.3. Análise estatística

Com base na mortalidade de cada concentração testada, após o período de 24h, foi determinada a dose letal média (DL_{50} - a concentração necessária para matar 50% da população testada). Os dados de dose resposta foram analisados com modelos binomiais generalizados. As funções de ligação logit, probit, log-log complementar e

cauchit foram testadas (Venables, W. N. & Ripley, B. D., 2002; Moral R.A., Hinde J., Demétrio C.G.B., 2017). O modelo logístico binomial com a função de ligação Logit foi o que melhor se ajustou aos dados de mortalidade de 24 horas para as amostras das glândulas ampulada maior e agregada. O ajuste do modelo foi confirmado utilizando “Gráficos meio-normais com envelope de simulação” com o uso do software R versão 3.5.0 com o pacote *HNP (Half- NormL Plots)*.

4. Resultados e discussão

4.1. Análise proteômica com a identificação da modificação de fosforilação

Com a finalidade de obter informações fundamentais para uma melhor compreensão funcional das proteínas fosforiladas que podem estar envolvidas com o processo de fiação da seda, manutenção e até mesmo com a captura de presas na teia, as proteínas constituintes das glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes* (Figura 7) foram submetidas a um enriquecimento de fosforilação, utilizando o método de afinidade com dióxido de titânio (TiO_2), seguido por uma análise proteômica *gel-free* do tipo *shotgun*. Essa estratégia permite concentrar as proteínas que apresentam a modificação de fosforilação, proporcionando assim, um aumento no número de identificações de proteínas menos abundantes e com menores valores de massa em amostras complexas como as glândulas produtoras de seda de aranhas.

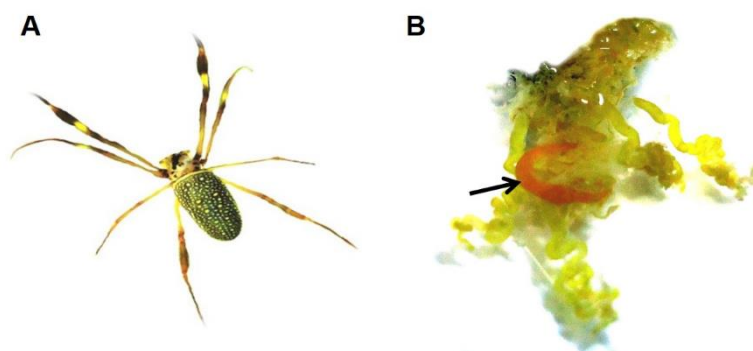


Figura 7. A – *Trichonephila clavipes*, coletada no campus da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” localizado na cidade de Rio Claro, São Paulo. **B –** glândulas de seda da aranha *T. clavipes* destacando a glândula ampulada maior, indicada por uma seta— Imagens modificadas de dos Santos-Pinto et al., 2016.

As modificações de fosforilação que ocorrem em proteínas, são reversíveis, podendo ocorrer de forma incessante e assim desempenhar um papel crucial na regulação de muitos processos celulares. As fosfoproteínas, modificadas após a tradução, tendem a coexistir com suas proteoformas não fosforiladas dentro da célula; sendo assim, o enriquecimento é uma forma de tornar a sua identificação mais viável (Fíla & Honys, 2012).

A partir das análises e processamento de dados, realizados no presente estudo, um total de 1316 proteínas fosforiladas foram identificadas. Desse total, 155 foram identificadas na glândula agregada, 580 na ampulada maior, 143 na flageliforme e 438 na ampulada menor. As buscas para a identificação das proteínas fosforiladas foram realizadas nos bancos de dados Araneae, Arachnida e ArachnoServer. Considerando-se a grande quantidade de dados que foram gerados e processados após as análises, e para que a redação da dissertação pudesse ocorrer de forma contínua, de modo que sua leitura não fosse interrompida, a relação completa de todas as proteínas identificadas constando todas informações dos dados oriundos da análise proteômica das quatro amostras analisadas estão demonstrados no Apêndice 1, tabelas A1-A4 em arquivo excel.

Todas as proteínas foram inicialmente classificadas de acordo com as funções atribuídas pelas análises no *Gene Ontology – GO* (componente celular, processo biológico e função molecular). Uma vez que as amostras do presente estudo são produtos da secreção das diferentes glândulas produtoras de seda, envolvidas no processo de fiação, é importante considerar que a busca dos papéis funcionais de proteínas na base de dados G.O. prevê função molecular, processo biológico e componente celular (quando a informação está disponível), com base em relatórios de papéis intracelulares destas proteínas. Os papéis funcionais de proteínas secretadas não são bem preditos pelas pesquisas de enriquecimento no GO (dos Santos-Pinto et al., 2016); 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. O mecanismo de secreção das glândulas de seda de aranhas não é bem conhecido; algumas glândulas podem secretar os seus produtos exócrinos através de mecanismos holócrinos, enquanto outras glândulas podem secretar suas proteínas através de um mecanismo merócrino e/ou apócrino (Bell et al., 1969). Sendo assim, o secretoma das glândulas de seda podem conter uma mistura complexa de proteínas

exócrinas, com típicas proteínas intracelulares (geralmente designadas como “proteínas *housekeeping*”). Há relatos freqüentes sobre a existência de citocromo-oxidase, chaperoninas e outras enzimas mitocondriais localizadas em regiões extra-mitocondrial, sugerindo a possibilidade da existência de mecanismos ainda desconhecidos de translocação de proteínas para outros destinos celulares, ou mesmo para o meio extracelular (Soltys et al., 1999; Soltys et al., 2000; Gupta et al., 2008). Dessa forma, consideramos o processo biológico específico da amostra, 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 as proteínas em diferentes grupos funcionais.

Baseado nas análises de dados do *Gene Ontology* – G.O e de acordo com os termos do algoritmo FunRich 3.0 – Functional Enrichment Analysis Tool (Pathan et al., 2015), as fosfoproteínas foram organizadas em sete diferentes grupos funcionais, relacionados com o seu papel na teia: – (i) proteínas estruturais que compõem as fibras da seda – as espidroínas; ii) proteínas relacionadas com o transporte de íons e oxigênio nas glândulas para manter a estabilidade das espidroína; (iii) proteínas relacionadas com o dobramento/conformação e modificação das espidroínas; (iv) proteínas relacionadas com a preservação das espidroínas contra o estresse oxidativo; (v) proteínas relacionadas com a preservação das características fibrilares das espidroínas no meio ambiente; (vi) proteínas *housekeeping* e (vii) proteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas.

Considerando-se a grande quantidade de dados que foram gerados e processados após as análises, e para que a redação do trabalho pudesse ocorrer de forma contínua, de modo que sua leitura não fosse interrompida, a relação completa de todas as proteínas identificadas e classificadas nos grupos funcionais constando todas informações dos dados oriundos da análise do GO estão demonstradas no Apêndice 2, tabelas A1-A7 em arquivo excel.

Os dados fosfoproteômicos de cada uma das glândulas foram analisados separadamente, posteriormente combinados na análise de enriquecimento, uma vez que a maioria das proteínas identificadas estão, de alguma maneira, relacionadas com o processo de fiação e proteção das proteínas estruturais das teias, exceto aquelas classificadas como *housekeeping*.

As figuras 8, 9 e 10, demonstram os resultados obtidos para as análises de enriquecimento funcional para todas as fosfoproteínas identificadas nos grupos

funcionais (ii), (iii), (iv) e (v), considerando que estes grupos estão envolvidos com o processo de fiação da seda dentro das glândulas. Para o grupo funcional (i) proteínas estruturais que constituem as fibras da seda, as espidroínas, não existe um processo biológico atribuído a essas proteínas na base de dados GO; dessa forma, foi atribuída a função molecular de “proteínas da seda”, portanto esse grupo funcional não foi considerado para essa análise. Já para o grupo funcional (vii) proteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas, a análise de enriquecimento funcional foi realizado separadamente e esses resultados serão apresentados mais adiante, no momento da discussão desse grupo.

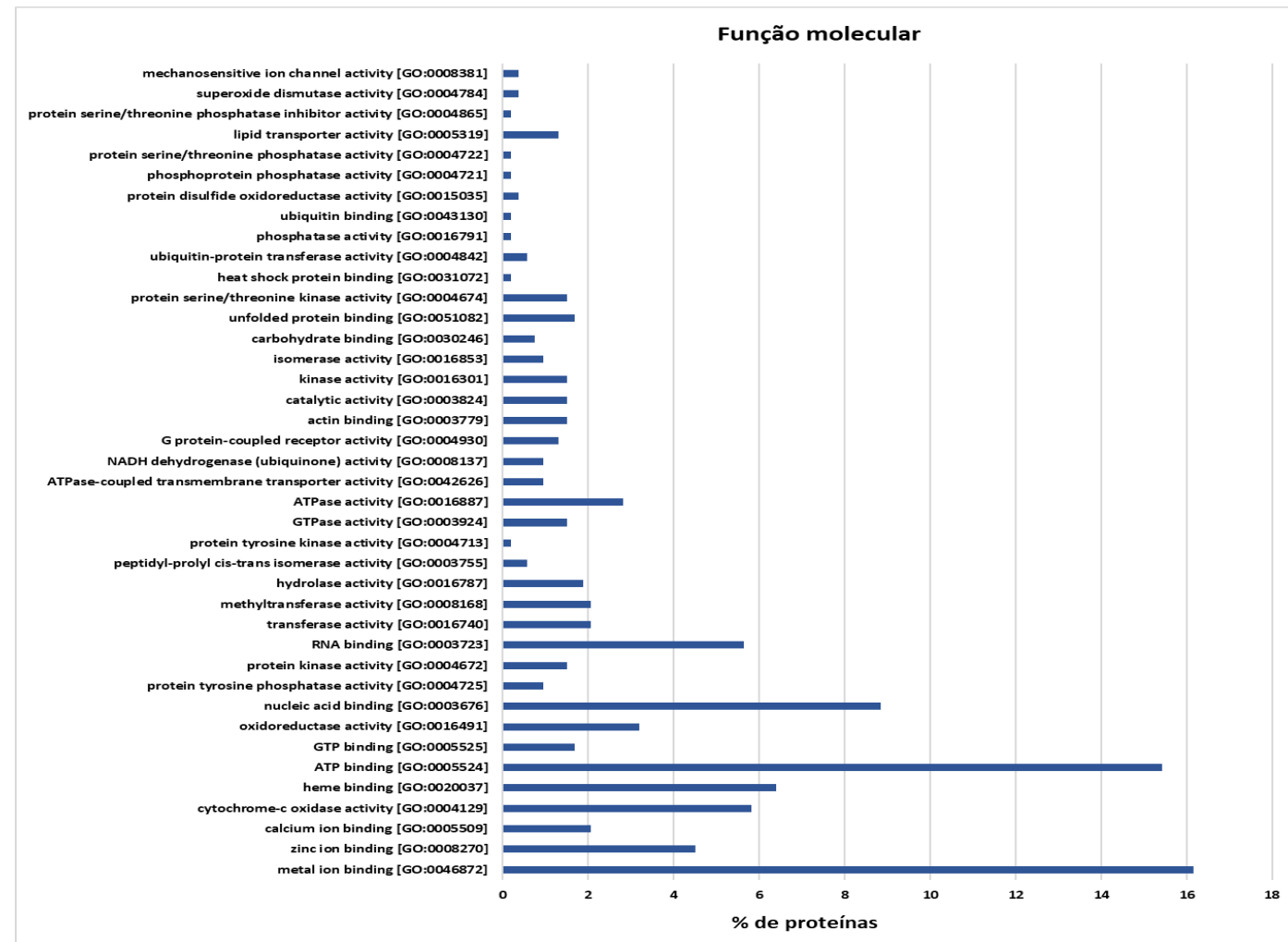


Figura 8. Análise de enriquecimento funcional demonstrando a **função molecular** das fosfoproteínas identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.

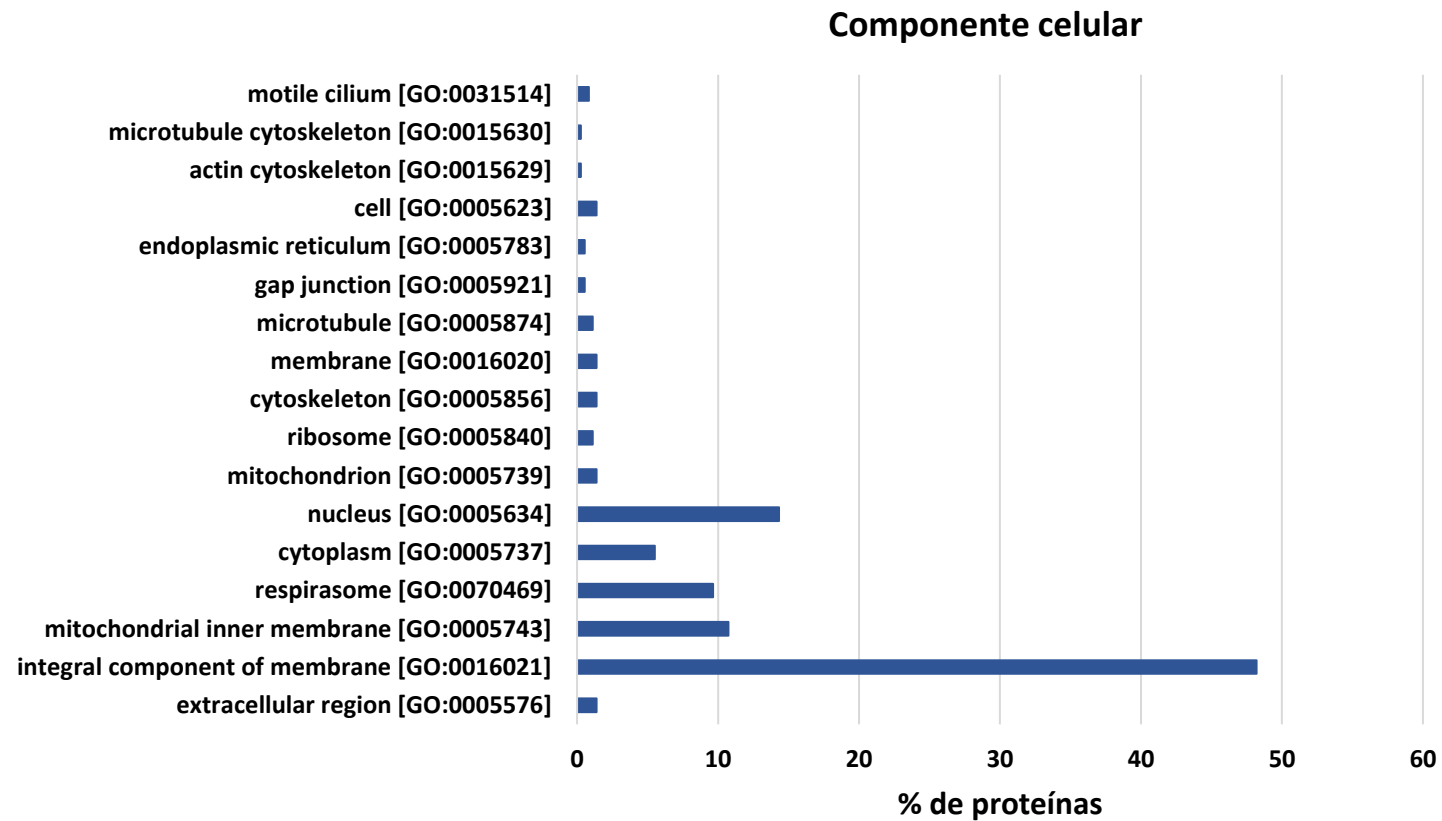


Figura 9. Análise de enriquecimento funcional demonstrando o **componente celular** das fosfoproteínas identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.

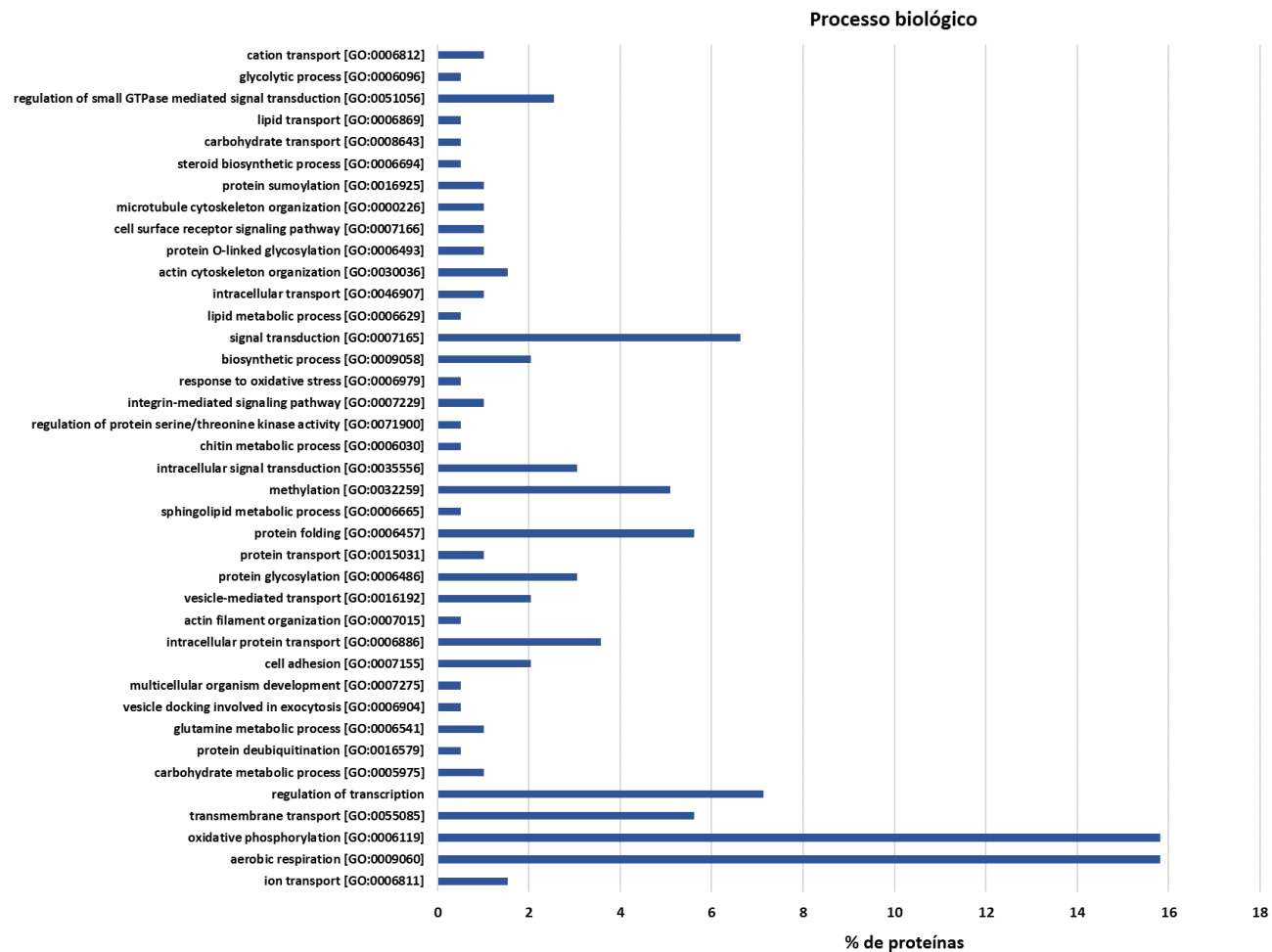


Figura 10. Análise de enriquecimento funcional demonstrando o **processo biológico** das fosfoproteínas identificadas nas glândulas agregada, amputada maior, amputada menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.

Pode-se observar na figura 8 que cerca de 16% das proteínas fosforiladas identificadas apresentam função de *metal ion binding* [GO:004687] e *ATP binding* [GO:0005524]. Os íons metálicos podem ser cruciais para a estrutura e função de proteínas e ajudam a estabilizar a estrutura das proteínas estruturais da teia. Esses íons estão envolvidos em eventos de catálise nucleofílica, na indução das mudanças conformacionais em proteínas, no transporte de elétrons, no dobramento e estabilização de estruturas protéicas (Akcapinar & Sezerman, 2017); desta forma, possivelmente esses íons podem induzir mudanças conformacionais das espidroínas após a ligação dos mesmos, e garantir a estabilização dessas proteínas. O ATP está correlacionado com a transdução de energia em uma célula, e além disso, desempenha um papel central na sinalização celular. O ATP atua como um doador do grupo fosfato para a ativação do substrato em reações metabólicas; na regulação da função das proteínas, o ATP pode servir como um doador de grupos fosfato para modificações pós traducionais (Rajedran et al., 2016). Além destes termos GO, outros termos relevantes como, *kinase activity* [GO:0016301]; *protein kinase activity* [GO:0006672]; *protein phosphatase* [GO:0004725], apesar de representarem baixas porcentagens de proteínas, cerca de 2%, mostram-se relevantes para o estudo uma vez que, podem a partir da ligação ou retirada do grupo fosfato da cadeia lateral dos aminoácidos das proteínas, alterar significativamente a conformação das espidroínas e desta forma afetar as interações entre as proteínas estruturais da seda (Hardy & Scheibel, 2010; dos Santos-Pinto et al., 2014). A elevada porcentagem de proteínas fosforiladas presentes na membrana celular (>40%), apresentada na figura 9 corrobora com o que foi mencionado anteriormente, de que há mecanismos, até então pouco conhecidos que atuam na translocação de proteínas para outros destinos celulares e até mesmo para o meio extracelular (Soltys et al., 1999; Soltys et al., 2000; Gupta et al., 2008), para que no meio extracelular estas moléculas possam desempenhar suas funções biológicas. Uma pequena porcentagem (<1%) são proteínas que demonstraram estarem presentes na região extracelular. Os resultados da análise de enriquecimento funcional para o processo biológico das fosfoproteínas apresentados na figura 10 mostram que as funções mais abundantes são: *oxidative phosphorylation* [GO:0006119] e *aerobic respiration* [GO:0009060], que juntas representam aproximadamente 32% das identificações; isso é um forte indicativo de que a produção aeróbica de ATP é muito importante para suprir gastos metabólicos com as atividades glandulares. Pode-se observar também que existem em menor

porcentagem, proteínas responsáveis pelo metabolismo de lipídeos (<2%) que estão relacionados com a preservação das características fibrilares das espidroínas, seguida por dobramento de proteínas (<6%), transporte celular e transporte de íons, essas últimas estão relacionadas com o constante transporte de íons e oxigênio nas glândulas durante o processo de fiação da teia (<2%).

A figura 11 demonstra a distribuição de fosfoproteínas, de acordo com os grupos funcionais identificados no resultado da combinação das glândulas de seda da aranha *T. clavipes*. Como podemos notar, a grande maioria das fosfoproteínas, 65% do total identificado nas quatro glândulas, correspondem as proteínas *housekeeping*. Este elevado número está relacionado ao processo de produção de energia, possivelmente para suportar a grande síntese de proteínas nas glândulas, e dos seus produtos que são secretados. Considerando-se a complexidade da amostra, 18% das fosfoproteínas identificadas, aparentemente estão envolvidas no processo de captura e pré-digestão de presas, e foram classificadas como toxinas, neurotoxinas e defensinas. Até então, muito 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); a presença destes compostos tem portanto, 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. Os estudos ainda não consideraram a presença de possíveis PTMs, como a fosforilação nas proteínas das glândulas produtoras da seda e o quanto essa modificação pode determinar a conformação estrutural, atividade biológica, solubilidade, interação e função dessas moléculas. As proteínas estruturais da seda – as espidroínas, representam aproximadamente 0,6% do total da amostra.

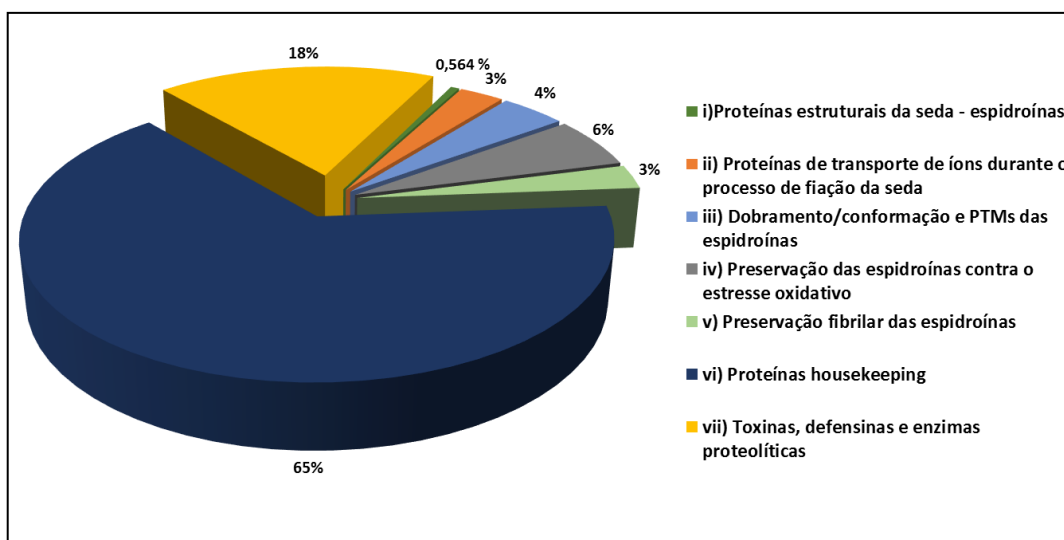


Figura 11. Distribuição do total de fosfoproteínas identificadas nas quatro glândulas combinadas – agregada, ampulada maior, flageliforme e ampulada menor da aranha *T. Clavipes* de acordo com o seu papel funcional.

A seguir, estão discutidas as características bioquímicas, das principais proteínas identificadas em cada grupo funcional, conforme classificação mencionada acima:

(i) **Proteínas estruturais que compõem as fibras da seda:** este primeiro grupo é composto pelas proteínas constituintes das fibras da seda, as espidroínas. Nesse grupo foram incluídas 5 espidroínas fosforiladas identificadas na glândula ampulada maior, 1 espidroína fosforilada identificada na glândula agregada, e 1 na glândula ampulada menor. Estas proteínas foram encontradas em diferentes proteoformas, como *aciniform spidroin 1*, *major ampullate spidroin*, *minor ampullate spidroin*, *spidroin 1*, *egg case protein variant 1*, e *egg case silk protein*. Esses resultados estão demonstrados na tabela 3, constando algumas das informações dos dados oriundos da análise proteômica. Não foram observadas espidroínas fosforiladas produzidas pela glândula flageliforme neste estudo, possivelmente porque não havia nenhuma síntese de espidroínas fosforiladas por essa glândula no momento da coleta da aranha, e/ou essas proteínas não estavam presentes em quantidades suficientes para serem detectadas. Os resultados apresentados revelam diferentes proteoformas de espidroínas, que ainda não têm suas funções bem conhecidas, possibilitando dessa forma futuras investigações na área de biomateriais a base de seda de aranhas.

Tabela 3. Identificação das proteínas estruturais da teia (grupo “i”), em suas formas fosforiladas – as espidroínas. MM: Massa Molecular; PIP (%) – score, probabilidade de Identificação da Proteína; Glândulas de seda: AGRE – agregada, AMA- ampulada maior, FLAG – flageliforme, AME- ampulada; (+) presença da proteína, (-) ausência da proteína.

Código de acesso	Fosfoproteínas	MM (kDa)	Taxonomia	PIP (%)	Glândulas de seda			
					AGRE	AMA	FLAG	AME
AFX83562.1	Aciniform spidroin 1	33	<i>Latrodectus hesperus</i>	100	+	-	-	-
AAT08436.1	Major ampullate spidroin	70	<i>Agelenopsis aperta</i>	96	-	+	-	-
ADM14317.1	Major ampullate spidroin protein	31	<i>Diguetia canities</i>	100	-	+	-	-
ARA91171.1	Minor ampullate spidroin	21	<i>Latrodectus tredecimguttatus</i>	100	-	+	-	-
AAC38957.1	Spidroin 1	44	<i>Trichonephila clavipes</i>	100	-	+	-	-
AOC60773.1	Egg case protein variant 1	25	<i>Argiope argentata</i>	100	-	+	-	-
ABC68105.1	Egg case silk protein 2	80	<i>Latrodectus hesperus</i>	100	-	-	-	+

Os principais constituintes da seda das aranhas são proteínas fibrosas denominadas espidroínas, constituídas predominantemente pelos aminoácidos alanina e glicina (Kaplan et al., 1992; Sponner et al., 2005). As espidroínas são sintetizadas pelas células epiteliais nas glândulas produtoras de seda e secretadas no lúmen glandular, onde são armazenadas como uma solução líquida cristalina altamente concentrada (Scheibel et al., 2004) para serem processadas em fibras. Como podemos observar na tabela 3, foram obtidas proteoformas diferentes de espidroínas fosforiladas dentro das glândulas produtoras dos fios de seda. As proteínas *spidroin 1* e *major ampullate spidroins* são secretadas pela glândula ampulada maior e constituem as fibras da seda dos raios da teia orbital, do *frame* e da linha de segurança “escape”, utilizada para escapar de possíveis predadores; essa fibra possui alta resistência à tração combinada com alta viscoelasticidade (Vollrath, 2000; Sponner et al., 2005; Römer et al., 2008); e podem ser codificadas por diferentes genes (Beckwitt & Arcidiacono 1994; Römer et al., 2008; Rising et al., 2007; Ayoub et al., 2008). Suas propriedades mecânicas dependem das sequências altamente repetitivas, composta por blocos ricos em glicina, alternados com blocos ricos em alanina (Rising et al., 2007; dos Santos Pinto et al., 2014). A resistência à tração mencionada anteriormente é dada pelas repetições (A)_n e/ou (GA)_n que formam estruturas cristalinas de folha β intra- e intermoleculares na fibra, enquanto a viscoelasticidade está relacionada às repetições ricas em glicinas (GGX e GPGXX) (Gatesy et al., 2001; dos Santos-Pinto et al., 2014; 2015). Curiosamente Winkler et al., 2000, demonstraram que é possível controlar a montagem da folha β via

fosforilação/desfosforilação enzimática de proteínas recombinantes curtas (25kDa) inspiradas em espidroínas produzidas pela aranha *T. clavipes*. Em 2014 dos Santos-Pinto et al., realizou um estudo com a seda da teia das aranhas *T. clavipes*, *Nephila edulis* e *Nephila madagascariensis*, em que a estratégia de espectrometria de massas *gel-based* foi utilizada a fim de sequenciar e determinar a presença/localização de modificações pós traducionais na proteína *spidroin -1*, foram reportados 11 sítios de fosforilação nas espidroínas do gênero *Trichonephila* sendo que 8 destes apresentaram maior confiabilidade. Posteriormente, em outros estudos realizados por nosso grupo (dos Santos-Pinto et al., 2015 e 2016), com o intuito de compreender a estrutura das espidroínas na seda de *T. clavipes*, em condições naturais, incluindo a identificação das PTMs mais abundantes, foram relatados um total de 15 e 16 sítios de fosforilação nas proteínas *spidroin 1-A* e *1-B* respectivamente; bem como a contribuição dessas PTMs na modelagem 3D dessas proteínas. Além disso, os autores também relataram a presença de um total de 36 sítios de fosforilação na proteína *spidroin-2*, e diversas outras PTMs como glicosilação, hidroxilação e nitrotirosilação.

Os resultados apresentados acima, revelam diferentes proteoformas de espidroínas fosforiladas que estão sendo transitoriamente expressas por essas glândulas, e dessa forma sendo detectadas durante a análise proteômica. A maioria dessas PTMs estão localizadas dentro dos motivos estruturais que seriam responsáveis pelas propriedades mecânicas da seda; e de acordo com os estudos mencionados, o significado biológico da grande quantidade de fosforilação observada nas proteínas da seda da aranha *T. clavipes*, ainda é desconhecido. Porém, corroborando com os dados já descritos na literatura, sugerem que a fosforilação pode estar envolvida na determinação da conformação estrutural das espidroínas, uma vez que a maioria dos sítios de fosforilação foram observados dentro dos motivos estruturais GGX e (A)n, em espidroínas ; e desta forma, alterando a estrutura dessas moléculas, as PTMs podem também atuar na ligação e interação entre as proteínas da seda ao influenciar as propriedades físico-químicas da fibra (Eyers & Gaskell, 2008; Hardy et al., 2010, dos Santos-Pinto et al., 2015, 2016). Foi postulado também que os resíduos de fosfato podem desempenhar papéis importantes no armazenamento das proteínas da seda em altas concentrações na glândula de seda e também, na organização das proteínas durante o processo de fiação da fibra (Vollrath & Knight, 1999; Hueimmerich et al., 2004; dos Santos Pinto et al., 2014, 2015).

(ii) **Proteínas de transporte de íons e moléculas relacionadas com a estabilidade das espidroínas:** neste grupo foram identificadas 20 fosfoproteínas na glândula ampulada maior, 5 na glândula agregada, e 11 na ampulada menor. Não foi identificada nenhuma fosfoproteína desse grupo funcional na glândula flageliforme. Diferentes proteoformas de *chloride channel protein*, *potassium voltage-gated channel protein Shal protein*, *calcium-activated potassium channel slowpoke-like isoform X10*, foram identificadas nas três glândulas mencionadas. A tabela A2, do Apêndice 2, apresenta a relação completa de todas as proteínas identificadas, constando as informações dos dados oriundos da análise proteômica e análise GO.

A presença destes canais iônicos para o futuro processo de fiação da seda é importante para a estabilidade das espidroínas que é geralmente afetada pelos íons circundantes. A partir de alguns estudos realizados, íons como sódio e cloreto, presentes nas glândulas inibem a agregação das proteínas da seda, e consequentemente a formação das fibras impedindo a separação da fase líquido-líquido (Scheibel et al., 2009). Enquanto que íons como potássio e fosfato promovem a agregação das proteínas e formação da estrutura organizada. Essa mudança de íons, agindo sinergicamente com a diminuição do pH no meio favoreceria o desdobramento e β -cristalização das proteínas da seda (Knight et al., 2000; Vollrath et al., 2001). Estudos de Knight et al. (2001), sugerem que a capacidade de transportar prótons e íons para dentro do lúmen da glândula, enquanto transporta água para fora pode ser fundamental para a formação das fibras da seda, visto que a aranha ativa e controla cuidadosamente o ambiente iônico durante o processo de fiação, o que proporciona consequências importantes durante o dobramento das espidroínas (Dos Santos-Pinto et al., 2016).

(iii) **Proteínas relacionadas com o dobramento/conformação e modificações pós traducionais (PTMs) das espidroínas:** no terceiro grupo foram identificadas 15 fosfoproteínas na glândula agregada, 29 na ampulada maior e 10 na ampulada menor. Não foi identificada nenhuma fosfoproteína desse grupo funcional na glândula flageliforme. Foram identificadas neste grupo diferentes proteoformas de *serine/threonine-protein kinase*, *heat shock protein* e *tyrosine-protein phosphatase 10D protein*. A tabela A3, do Apêndice 2, apresenta a relação completa de todas as proteínas identificadas, constando as informações dos dados oriundos da análise

proteômica e análise GO. Sob condições normais, essas proteínas facilitam o transporte de proteínas entre compartimentos celulares, o dobramento de proteínas recém-sintetizadas e a degradação de proteínas instáveis (Parcellier et al., 2003). As proteínas de choque térmico também foram identificadas nos estudos de Hou et al. (2007) com a glândula de seda de *Bombix mori*. Embora a função das proteínas de choque térmico seja incerta, no presente estudo, é sugerido que desempenham a função no dobramento e transporte das espidroínas, durante o processo de formação das fibras no ducto de fiação da glândula; e ainda na seda podem estar relacionadas na manutenção da estabilidade e integridade das proteínas da seda, uma vez que as mesmas podem ser expostas as variações ambientais e consequentemente alterar a conformação estrutural dessas proteínas na teia. As diferentes proteínas quinases aqui identificadas, podem estar relacionadas com as modificações de fosforilação presentes nas espidroínas, conforme já mencionado nos estudos de dos Santos-Pinto et al., (2015 e 2016) com a seda da aranha *T. clavipes*. Estas proteínas pertencem a grande família de quinases e junto com as fosfatases, e é responsável pelo mecanismo de fosforilação e ativação de cascatas a partir da fosforilação de diferentes aminoácidos da cadeia polipeptídica (Alberts et al., 2007; Ardito et al., 2017). A ativação ou desativação da quinase ocorre de diferentes maneiras: pela própria quinase com cis-fosforilação/autofosforilação, pela ligação com proteínas ativadoras ou inibidoras ou verificando sua localização na célula em relação ao seu substrato (Roskoski, 2012). Outro importante grupo de proteínas são as proteínas fosfatases, estas atuam opostas às quinase e desta forma, removem o grupo fosfato das fosfoproteínas por meio da hidrólise de monoésteres do ácido fosfórico em um grupo fosfato e uma molécula com um grupo hidroxila livre (Barford, 1996; Ardito et al., 2017). Em nossos resultados, foi identificada uma proteoforma da proteína *tyrosine – protein phosphatase 10 D protein*. A super família das proteínas tirosina fosfatase compreendem 103 enzimas (Alonso et al., 2004) que catalizam a desfosforilação do substrato através de um intermediário enzimático covalente, envolvendo a ligação de um tiofosfato a partir do sítio ativo de um resíduo de cisteína (Yu & Zhang, 2018). Essa família de proteínas atua em conjunto com as proteínas tirosina quinases e modulam o nível de fosforilação de resíduos de tirosina celular. Um nível apropriado de tirosinas fosforilada é essencial para regular o crescimento celular, diferenciação, metabolismo, ciclo celular, comunicação célula-célula, migração celular, transcrição de genes, atividade dos canais iônicos, a resposta imune, e apoptose (Neel & Tonks,

1997; Hunter, 2000; Zhang, 2002). No estudo de dos Santos-Pinto et al., (2019), em que foi realizada uma análise proteotranscriptômica das glândulas de seda, 7.52% do proteoma total é representado por proteínas que pertencem a este grupo, ou seja, proteínas relacionadas com as modificações pós-traducionais e dobramento das espidroínas.

(iv) **Proteínas relacionadas com a proteção das espidroínas contra o estresse oxidativo:** neste grupo foram identificadas 3 fosfoproteínas na glândula agregada, 48 na ampulada maior e 27 na ampulada menor. Não foi identificada nenhuma fosfoproteína desse grupo funcional na glândula flageliforme. A tabela A4, do Apêndice 2, apresenta a relação completa de todas as proteínas identificadas, constando as informações dos dados oriundos da análise proteômica e análise GO. Neste grupo foram incluídas diferentes proteoformas de *cytochrome oxidase subunit*, *NADH dehydrogenase subunit 5* e uma proteoforma de *peroxidase*, que possivelmente estão envolvidas na preservação das espidroínas contra o estresse oxidativo, quando as mesmas estão sendo produzidas/sintetizadas pelas glândulas de seda. A atividade de peroxidases já havia sido descrita na glândula ampulada maior das aranhas do gênero *Trichonephila*, e foi proposto que essa atividade das peroxidases poderia catalisar a formação de ligações cruzadas de ditirosina, e dessa forma ajudar na estabilização das proteínas das fibras na seda. No entanto, até então essa formação de ligações cruzadas nas fibras da seda não tem sido relatada, permanecendo por ser elucidada (Vollrath e Knight, 1999; Pouchkina et al., 2003). As peroxidases também foram identificadas nas glândulas de seda de *Bombix mori* e possivelmente estão envolvidas em ligações cruzadas, na reticulação da matriz extracelular da glândula de seda (Suderman et al., 2006; Thein et al., 2009; Dong et al., 2013).

(v) **Proteínas relacionadas com a preservação das características fibrilares da seda:** neste quinto grupo foram identificadas 4 fosfoproteínas na glândula agregada, 16 na glândula ampulada maior e 15 na ampulada menor. Não foi identificada nenhuma fosfoproteína desse grupo funcional na glândula flageliforme. A tabela A5, do Apêndice 2, apresenta a relação completa de todas as proteínas identificadas, constando informações dos dados oriundos da análise proteômica e análise GO. Diferentes proteoformas de *fatty acyl-CoA reductase 1*, *fatty-acid amide*

hydrolase 2-like protein, *fatty acid synthase* e *mucin*. As proteínas desse grupo podem estar envolvidas em processos metabólicos, como catálise e oxidação de ácidos graxos (Thorpe et al., 1995). Estudos relatam que as fibras da seda de aranhas são revestidas com uma camada lipídica que é aderida sobre a fibra, após a sua formação pela aranha (Vollrath et al., 2001; Salles et al., 2006; Sponner et al., 2007). Assim como outras substâncias, os lipídeos encontram-se na solução viscosa, a qual é secretada pela glândula agregada e aderida sobre as fibras (Vollrath & Knight, 2001; Schulz, 2001; Romer et al., 2008). E análises de lipídeos sobre essas fibras tem indicado a presença de uma grande variedade de ácidos graxos. Estudos de análises de GC-MS realizados por Salles et al. (2006) com as fibras da teia da aranha *T. clavipes* demonstraram a presença de uma diversidade de ácidos graxos saturados e insaturados sobre estas fibras. Nos estudos realizados por dos Santos-Pinto et al. (2016), com as glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes*, essas proteínas foram identificadas na glândula agregada e podem estar envolvidas com o metabolismo dos ácidos graxos que são depositados sobre as fibras após a liberação da seda; e essa camada de ácidos graxos pode estar envolvida com a proteção das fibras contra a degradação (Schulz, 2001), e/ou até mesmo como um repelente para alguns insetos e também apresentar uma ação antimicrobiana (Avis et al., 2000; Salles et al., 2006). E ainda podemos sugerir que essa camada de ácidos graxos pode estar envolvida com a lubrificação da seda, protegendo contra as ações naturais do meio e dessa forma manter a estrutura conformacional das espidroínas e consequentemente as propriedades mecânicas das fibras. Além disso, os ácidos graxos também podem contribuir para aumentar a permeabilidade da barreira epicuticular de lipídios dos insetos presas, facilitando a difusão de toxinas presentes na seda da teia para o interior do inseto presa (Salles et al., 2006; dos Santos-Pinto et al., 2016; Esteves et al., 2020).

Além disso, em 2015, Chaw et al., evidenciaram a partir do transcriptoma das glândulas de seda da aranha *Latrodectus hesperus*, a presença de glicoproteínas como as mucinas que estão entre os componentes presentes na seda da aranha, que possivelmente estão presentes para a proteção fibrilar da seda.

(vi) **Proteínas *housekeeping***: neste grupo foram identificadas 99 fosfoproteínas na glândula agregada, 378 na ampulada maior, 4 na flageliforme, e 342 na ampulada menor. A tabela A6, do Apêndice A2, apresenta a relação completa de

todas as proteínas identificadas, constando as informações dos dados oriundos da análise proteômica e análise GO. Essas proteínas possivelmente foram secretadas das células constituintes das glândulas de seda, sendo, portanto, um contaminante no conteúdo glândular derivado do tecido muscular das glândulas, uma vez que elas foram maceradas para o extravasamento do conteúdo glandular durante o preparo dos extratos para as análises. A maioria das proteínas *housekeeping* estão associadas ao processo de produção de energia, provavelmente para sustentar a biossíntese dos produtos que são secretados, principalmente as proteínas constituintes da seda, as espidroínas.

Nos estudos realizados por dos Santos-Pinto et al., 2016 e 2019, com as glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes*, foram identificadas uma grande quantidade de proteínas que já foram relatadas na literatura (Rao et al, 2004; Savina et al., 2005; Cai et al., 2007) como proteínas relacionadas com a formação, transporte e secreção de exossomos. E assim como já relatado nesses estudos, na presente investigação também foram identificadas proteínas que possivelmente estão envolvidas na secreção de vesículas do tipo exossomos, entre elas, proteínas das famílias Ras e Rab, como, *Ras GTPase-activating protein-binding protein 2*, *ras GTPase activating protein with iq motif, putative*, *Putative rab subfamily protein of small gtpase*, *prenylated Rab acceptor*. Essas proteínas são conhecidas por desempenharem um papel na secreção de vesículas exossômicas e estão envolvidas no tráfego dessas vesículas entre compartimentos intracelulares. (Savina et al., 2005; Hsu et al, 2010). O termo exossomo foi proposto em 1987 para designar vesículas intraendossomais liberadas extracelularmente (Johnstone et al., 1987). Os exossomos são pequenas vesículas de membrana (40-100 nm de diâmetro) secretadas pela maioria dos tipos celulares a partir de endossomos multivesiculares. Essas vesículas de membrana são secretadas para o ambiente extracelular juntamente com seu conteúdo, composto de numerosas proteínas, lipídeos e até ácidos nucleicos, interferindo em processos de comunicação celular; e diversos estudos têm investigado o papel dessas vesículas como mensageiras intracelulares gerais (Cocucci et al., 2009).

Os exossomos originam-se de compartimento multivesicular interno, chamados corpos multivesiculares (MVBs) os quais são endossomos tardios. Apesar da biogênese dos exossomos ainda não estar bem elucidada, sabe-se que para a formação de MVBs é necessária a participação das proteínas ESCRT (complexo endossomal necessário para transporte), tetraspaninas e o lipídeo LBPA (ácido

lisobisfosfatídico) (Babst, 2005; Michelet et al., 2010). O processo final de secreção do exossomo ocorre através da fusão de MVBs com a membrana plasmática, muito provavelmente com auxílio de um complexo de proteínas SNARE de natureza ainda desconhecida (Rao et al, 2004). Os resultados das análises fosfoproteômica das glândulas produtoras de seda da teia de *T. clavipes* demonstraram a presença de proteínas relacionadas ao complexo de proteína SNARES: *synaptojanin-1-like*, *synapse-associated protein 1 protein*, *Regulating synaptic membrane exocytosis protein 2-like protein*. Estudos relatam que o processo de liberação, secreção e ancoramento de vesículas extracelulares em membranas-alvo requerem proteínas como actina e microtúbulos, cinesinas e miosinas, pequenas GTPases e proteínas relacionadas ao complexo-SNAREs (Cai et al., 2007). No presente estudo também foram identificadas muitas actinas, tropomiosinas, miosinas, microtúbulo e GTPases. Inicialmente essas proteínas estão sendo classificadas como *housekeeping*, pois ainda, não se conhece o processo pelo qual as vesículas extracelulares, que possivelmente estão presentes nas gotículas depositadas sobre a seda de aranhas, são produzidas, transportadas e secretadas sobre a teia.

(vii) **Proteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas:** o último grupo consiste em uma série de proteínas que apresentam-se em sua forma fosforilada e que são típicas de venenos animais, ou seja, neurotoxinas utilizadas para paralisia e morte de presas ou para prevenção de infecções microbianas (defensinas). Foram identificadas 28 proteínas fosforiladas semelhantes às toxinas, neurotoxinas, enzimas proteolíticas e defensinas na glândula agregada, 85 na glândula ampulada maior, 139 na flageliforme e 32 na glândula ampulada menor. A Tabela 4 apresenta algumas destas identificações encontradas nas amostras. A tabela A7, do Apêndice 2, apresenta a relação completa de todas as proteínas identificadas, constando as informações dos dados oriundos da análise proteômica e análise GO. Nos nossos resultados foram identificadas uma série de proteoformas de proteínas semelhantes à *alpha-latrotoxin*, *alpha-Latrocrustotoxin*, *aminopeptidase*, *astacin-like metalloprotease*, *theraphotoxin*, *ctenitoxin*, *lycotoxin*, *metalloprotease*, *metallopeptidase*, *SphingomyelinaseD*, *zodatoxin*, *Dermonecrotic toxin*, e *defensin precursor*.

Tabela 4. Identificação das proteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas (grupo “vii”), em suas formas fosforiladas. MM: Massa Molecular; PIP (%) – score, probabilidade de Identificação da Proteína; Glândulas de seda: AGRE – agregada, AMA- ampulada maior, FLAG – flageliforme, AME- ampulada; (+) presença da proteína, (-) ausência da proteína.

Código de acesso	Proteínas	MM (kDa)	Taxonomia	PIP (%)	% de cobertura	AMA	AGRE	FLAG	AME
Q9XZC0	Alpha-Latrocrustotoxin-Lt1a	156 kDa	<i>Latrodectus tredecimguttatus</i>	100%	19%	+	+	+	-
P23631	Alpha-Latrotoxin-Lt1a	157 kDa	<i>Latrodectus tredecimguttatus</i>	100%	0.60%	+	+	+	+
XP_023209417.1	Aminopeptidase N	109 kDa	<i>Centruroides sculpturatus</i>	100%	1.62%	-	+	-	-
A0FKN6	Astacin-like metalloprotease toxin precursor	30 kDa	<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	15.10%	-	+	+	-
B2ZBB0	U7-theraphotoxin-Hs3f	12 kDa	<i>Haplopelma schmidtii</i>	100%	16.50%	+	-	-	-
P85030	U18-ctenitoxin-Co1b	3 kDa	<i>Haplopelma schmidtii</i>	100%	100.00%	-	-	+	-
B6DD44	U15-lycotoxin-Ls1b	9 kDa	<i>Lycosa singoriensis</i>	100%	39.50%	-	-	+	-
ADY39609.1	Putative metalloprotease	7 kDa	<i>Hottentotta judaicus</i>	100%	44.90%	-	-	-	+
JAP68338.1	Putative metalloprotease	41 kDa	<i>Hyalomma excavatum</i>	100%	4.83%	-	+	-	-
Q8I914	SphingomyelinaseD(LISicTox-alphaIII1i)	35 kDa	<i>Loxosceles laeta</i>	100%	7.72%	-	-	+	-
Q1ELU4	M-zodatoxin-Lt4b	20 kDa	<i>Lachesana tarabaei</i>	100%	24%	-	+	+	-
Q1W694	Dermonecrotic toxin LISicTox-betaID1	35 kDa	<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	43.6	-	+	+	-
AAS90630.1	Defensin precursor	6 kDa	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	100%	73.20%	-	+	-	-

O diagrama de Venn, demonstrado na figura 12, apresenta uma análise de comparação das fosfoproteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme. 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 quatro amostras.

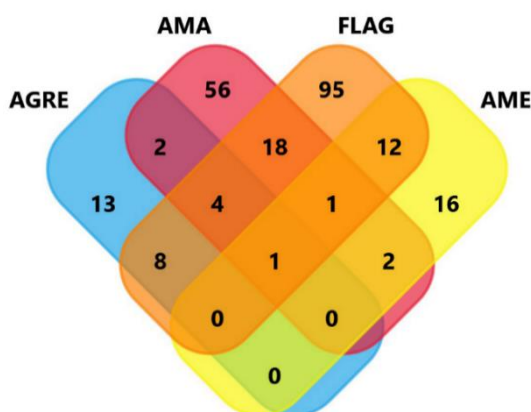


Figura 12. Diagrama de Venn destacando as fosfoproteínas relacionadas com a captura e pré-digestão de presas identificadas e compartilhadas (que apresentam o mesmo código de acesso) entre as quatro glândulas produtoras de seda da aranha *T. clavipes*. AGRE – glândula agregada, AMA – glândula ampulada maior, FLAG – glândula flageliforme, AME – glândula ampulada menor.

A intersecção entre as quatro glândulas – agregada $\cap$ ampulada maior $\cap$ ampulada menor $\cap$ flageliforme, demonstrou uma única proteína comum entre as quatro glândulas produtoras de seda: a fosfoproteína alpha-Latrotoxin-Lt1a, código de acesso P2363, pertencente à família das *Latrotoxins*, e originalmente descrita no veneno da espécie *Latrodectus tredecimguttatus*.

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 proteínas identificadas no sétimo grupo funcional do presente trabalho contêm componentes representativos de diferentes famílias de aranhas, são alguns deles:

- 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;
- 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);

- c) *Ctenitoxin Pn ou Pk* – peptídeos neurotóxicos presentes no veneno pertencentes a família *Ctenidae* (Glenn et al., 2008), 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 axônios isolado de insetos (Matavel et al., 2002);
- d) *Theraphotoxin* – proteínas neurotóxicas, isoladas do veneno das aranhas tarântulas da família *Theraphosidae*. Efeitos de ativação dos canais de potássio, inibição de canais de sódio, causando o bloqueio da transmissão neuromuscular e paralisia em insetos (Li et al., 2003);
- e) *Lycotoxins* – constitui uma família de peptídeos antimicrobianos típicos do veneno da aranha *Lycosa singoriensis* (Yan et al., 1998).

Os resultados do presente estudo demonstram que a aranha *T. clavipes* (Araneidae) está expressando toxinas 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. Tarabaei* (Zodariidae) e *lycotoxins* da aranha do gênero *Lycosa* da família *Lycosidae*. Atualmente, existem duas hipóteses sugerindo que as famílias Sicariidae e Theriidae evoluíram 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. Recentemente, Esteves et al., (2020), evidenciaram por meio de uma análise de proteotranscriptômica a presença de 217 proteínas semelhantes à toxinas e neurotoxinas, defensinas e enzimas proteolíticas presentes na seda da teia da aranha *Trichonephila chavipes*, sendo que 65 destas identificações são compartilhadas com as glândulas de seda. É sugerido que estas proteínas contribuem para um papel “químico-ativo” sobre as fibras da seda da teia, ou seja, na captura e paralisia de presas.

As figuras 13, 14 e 15 demonstram os resultados obtidos para as análises de enriquecimento funcional para todas as fosfoproteínas identificadas como semelhantes as toxinas, neurotoxinas, defensinas e enzimas proteolíticas.

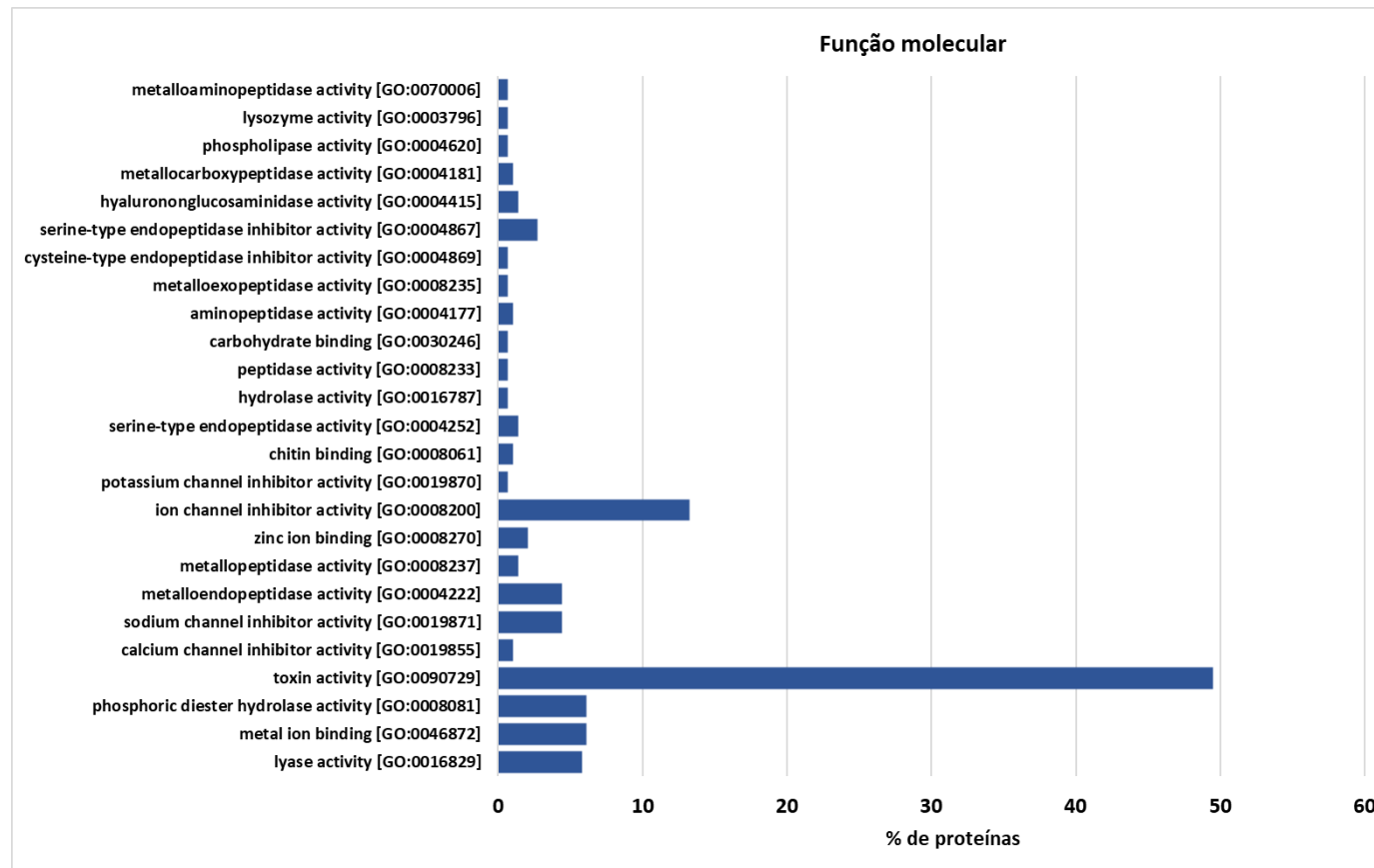


Figura 13. Análise de enriquecimento funcional, demonstrando a **função molecular** das fosfoproteínas do grupo vii (toxinas, neurotoxinas, defensinas e enzimas proteolíticas) identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.

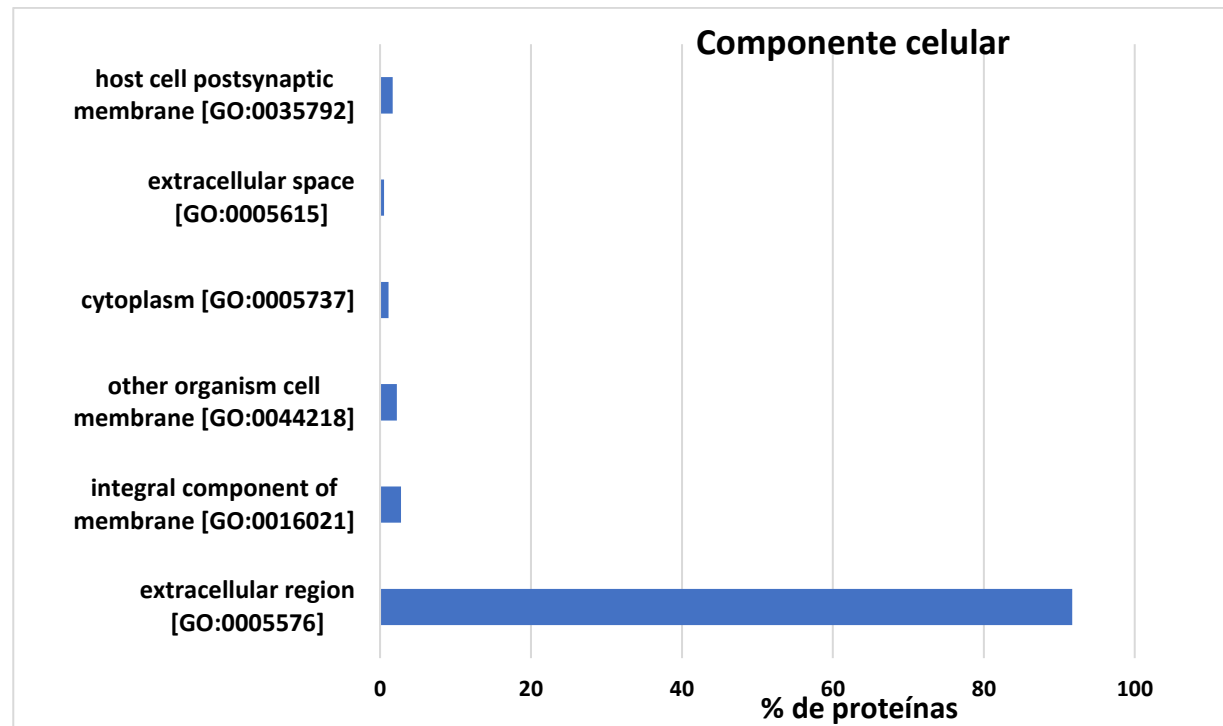


Figura 14. Análise de enriquecimento funcional demonstrando o **componente celular** das fosfoproteínas do grupo vii (toxinas, neurotoxinas, defensinas e enzimas proteolíticas) identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.

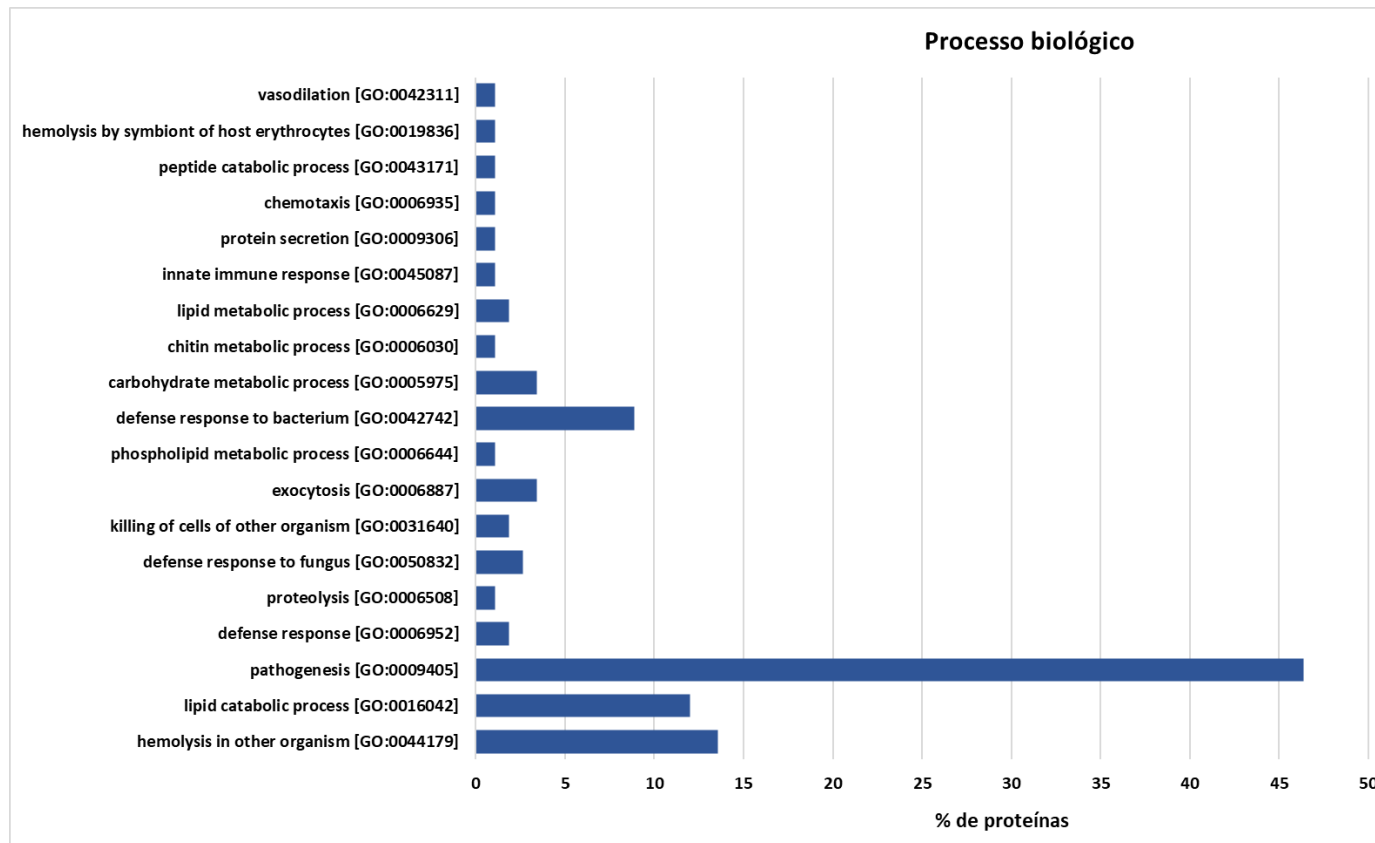


Figura 15. Análise de enriquecimento funcional demonstrando o **processo biológico** das fosfoproteínas do grupo vii (toxinas, neurotoxinas, defensas e enzimas proteolíticas) identificadas nas glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme. Esse resultado foi obtido pela combinação de todas as identificações de proteínas obtidas para cada glândula individualmente.

É possível observar, a partir dos dados obtidos do enriquecimento funcional da função molecular, que cerca de 50% das proteínas deste grupo apresentam *toxin activity* [GO:00900729]; e a segunda maior porcentagem, cerca de 15%, é composta por proteínas com funções de inibir os canais iônicos. Como mencionado anteriormente, muitas proteínas neurotóxicas atuam nestes canais a fim de paralisar suas presas, o que auxilia na estratégia de captura de presas dessas aranhas (Li et al., 2003; Rates et al., 2013; Cherki et al., 2014). Analisando os dados do enriquecimento funcional de componente celular, fica evidente que a maioria das proteínas (>80%) são oriundas da região extracelular, uma vez que essas proteínas são secretadas para o meio extracelular onde desenvolvem suas funções. De acordo com o processo biológico que estas proteínas assumem, pode-se observar que as quatro maiores porcentagens, são: patogênese (>50%); hemólise do organismo (>10%); processo catabólico de lipídeos (>10%); e resposta de defesa contra proliferação de bactérias (>5%). As defensinas que têm função antimicrobianas, identificadas neste trabalho são características de outros venenos animais e já foram descritas no veneno do escorpião *Centruroides limpidus limpidus* (Rodríguez et al., 2004). Essas proteínas relacionadas à defesa do organismo contribuem para preservar a presa sob digestão, livre de infecções por microorganismos (dos Santos-Pinto et al., 2016), assim como também a seda da teia.

A grande maioria das fosfoproteínas semelhantes às toxinas e neurotoxinas, relatadas no presente estudo, têm sido descritas com propriedades de inseticidas e ações 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 proteicas presentes nas amostras, poderia então proporcionar uma novidade evolutiva para a adaptação e diversificação das funções dessas moléculas, em um sistema tão complexo como são as glândulas produtoras de seda da teia de aranhas.

Além dos resultados já mencionados e discutidos anteriormente, os dados brutos dessas análises foram então submetidas ao sequenciamento *de novo* com o uso do software Peaks studio 7 (Complete software for proteomics and PTMs); foram detectadas 148 sequências peptídicas fosforiladas, que não resultaram na identificação funcional de proteínas. Desse total, 52 sequências foram detectadas na glândula agregada, 54 na ampulada maior, 28 na flageliforme e 14 na ampulada menor. No entanto, por meio da ferramenta de bioinformática de alinhamento de sequências de proteínas (BLASTP), foram realizadas buscas nos bancos de dados Araneae, Scorpiones, Arachnida e Arthropoda; 19 destas sequências apresentaram E-value, cobertura de sequência e identificações significativas para o presente estudo. A tabela 5 apresenta a relação completa dessas sequências; enquanto a tabela A5, do Apêndice 1, apresenta a relação completa de todas as sequências peptídicas fosforiladas identificadas nas quatro glândulas.

A grande maioria dessas sequências peptídicas possivelmente podem ter se originado de proteínas “não caracterizadas”, uma vez que se tratam de fragmentos oriundos de digestão enzimática, ou seja, não são peptídeos naturais / intactos presentes nas glândulas produtoras de seda. Proteínas “não caracterizadas” são designadas como proteínas de funções desconhecidas, devido à ausência de homologia com outras proteínas. No entanto podemos notar com este trabalho que ainda existe uma quantidade muito grande de proteínas fosforiladas, presentes nas glândulas produtoras de seda que apresentam funções desconhecidas e que possivelmente podem apresentar alguma atividade significativa para o processo de fiação da seda, assim como também, alguma atividade de toxina sobre a teia para a captura de presas.

Tabela 5. Sequências de peptídeos trípticos fosforilados, oriundos da análise individual das glândulas agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme, 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). Essas sequências apresentaram identificações em bancos de dados através da ferramenta de alinhamento BLASTp. A tabela mostra as informações como sequência peptídica e localização glandular, ALC (Average Local Confidence) - % de confiabilidade de identificação da sequência pelo sequenciamento *de novo*, valores de m/z (massa/carga) observados, carga (z), RT – tempo de retenção, massa do peptídeo (Da); PTMs detectadas nos fragmentos – fosforilação nos resíduos de serina (S), tirosina (Y) e treonina (T) ($\Delta = +80$ Da), oxidação no resíduo de metionina (M) ($\Delta = +15$ Da), carbamidometilação nos resíduos de cisteína (C) ($\Delta = +57$ Da). Informações oriundas do alinhamento utilizando a ferramenta BLASTp: código de acesso da proteína identificadas, nome da proteína, taxonomia, banco de dados, % de identificação ID), E-value, e % de cobertura. Valores de massas de PTMs podem ser encontrados em <http://www.unimod.org>.

Sequência Peptídica / glândula de seda	ALC (%)	m/z	Z	RT	Massa Molecular (Da)	PTM	Código	Nome da Proteína	Taxonomia	Banco de dados	% ID	E – value	% de cobertura
AAAGGAGQGGYGGLGFGG SK (ampulada maior)	79	860.3679	2	9.87	1718.7412	Fosforilação	P19837.3	Spidroin-1;	Trichonephila clavipes	Araneae	100%	3.00E-09	95%
CG QGGGLGGGAGGAGA ATK (agregada)	86	763.8358	2	8.95	1525.6345	Carbamidometilação; Fosforilação	ACC77633.1	major ampullate spidroin 1	<i>Trichonephila clavipes</i>	Araeane	88%	5.00E-04	88%
CG GAGGAGAGGGAVGAGG ATK (agregada)	90	820.8550	2	9.11	1639.6772	Carbamidometilação; Fosforilação	AAF36091.1	flagelliform silk protein	<i>Nephila inaurata madagascariensis</i>	Araneae	83%	5.00E-04	90%
CK GGAGAGAGGGLGGAGG TK (agregada)	88	820.8555	2	9.18	1639.7136	Carbamidometilação; Fosforilação	XP_023244543.1	zinc finger protein 608-like	<i>Centruroides sculpturatus</i>	Scorpiones	83%	1.00E-05	90%
CG AGGAGAGGGALGGAGG ATK (agregada)	91	856.3702	2	9.28	1710.7144	Carbamidometilação; Fosforilação	AAF36091.1	flagelliform silk protein	<i>Nephila inaurata madagascariensis</i>	Araneae	86%	7.00E-05	90%
CA GGAGGAGAGGGLGAAAGG TK (agregada)	89	891.8891	2	9.48	1781.7515	Carbamidometilação; Fosforilação	AAK30593.1	flagelliform silk protein	<i>Argiope trifasciata</i>	Araneae	72%	2.00E-04	91%
CA GAGQGAGGAGGLGGAGG ATK (agregada)	93	891.8881	2	9.57	1781.7515	Carbamidometilação; Fosforilação	GBM96188.1	Minor ampullate spidroin B	<i>Araneus ventricosus</i>	Araneae	85%	6.00E-04	90%
CA GAGAGGAGQGGLGGAGGA ATK (agregada)	90	927.4062	2	9.68	1852.7886	Carbamidometilação; Fosforilação	ADE74592.1	major ampullate spidroin 1l	<i>Peucetia viridans</i>	Araneae	68%	6.00E-05	91%
Q KCA SGLGGYGGQGAGGAAAA ATK (agregada)	89	706.6435	3	10.95	2116.9360	Carbamidometilação; Fosforilação	AAK30606.1	major ampullate spidroin 1	<i>Nephila inaurata madagascariensis</i>	Araneae	93%	4.00E-05	73%
SMT AAPGLGGYGGAGGAGGAAAA ATK (agregada)	80	706.6445	3	11.04	2116.9248	Oxidação da metionina; Fosforilação	ADE74592.1	major ampullate spidroin 1	<i>Peucetia viridans</i>	Araneae	82%	2.00E-04	84%
STGGYGGAGGAGAGGGLGGYGGQG ATK (agregada)	90	1111.9609	2	14.85	2221.9387	Fosforilação	AAV48945.1	dragline silk spidroin 1	<i>Nephila pilipes</i>	Araneae	65%	9.00E-06	85%
STGGYGGQGAGAGGGLGGYGGAGG ATK (agregada)	83	741.6457	3	14.88	2221.9387	Fosforilação	ADE74592.1	major ampullate spidroin 1	<i>Peucetia viridans</i>	Araenae	85%	6.00E-07	85%
STNYGGAGGAGGAGGLGGYGG SK (agregada)	91	976.9002	2	14.98	1951.8062	Fosforilação	AAF36091.1	flagelliform silk protein	<i>Nephila inaurata madagascariensis</i>	Araneae	89%	1.00E-04	82%
STGGYGGQGGLGGYGGAGG ATK (agregada)	93	955.4012	2	15.37	1908.8003	Fosforilação	AAK30598.1	fibroin 1	<i>Dolomedes tenebrosus</i>	Araneae	90%	1.00E-06	95%
MGGGYGGAGGGLGGYGGAGG TK (agregada)	90	919.8828	2	15.38	1837.7454	Fosforilação	XP_023210969.1	ctenidin-3-like	<i>Centruroides sculpturatus</i>	Scorpiones	84%	1.00E-05	86%
STNYGGQGGLGGYGGGGA ATK (agregada)	86	990.9171	2	15.4	1979.8374	Fosforilação	AAK30599.1	fibroin 2	<i>Dolomedes tenebrosus</i>	Araneae	80%	9.00E-06	95%

STGGYGGAGGGLGGYGGAGSK (agregada)	88	884.3660	2	15.41	1766.7261	Fosforilação	AAK30599.1	fibroin 2	Dolomedes tenebrosus	Arachnida	80%	2.00E-05	95%
TSGGADCGGQGAGAGGGLGGYGGAGGAATK (agregada)	82	826.3333	3	16.02	2476.0073	Carbamidometilação; Fosforilação	ADE74592.1	major ampullate spidroin 1	Peucetia viridans	Araneae	79%	7.00E-06	90%
FSRPSFGYGGQGAGGAAAAAAGAGSR (ampulada menor)	72	844.0377	3	12.95	2529.0586	Fosforilação	P19837.3	Spidroin-1;	[Trichonephila clavipes]	Arachnida	65%	3.00E-07	77%

Com base na tabela, podemos notar que a maioria das proteínas que apresentaram *E-value* significativo (menor que 1.00E-04) foram encontradas na glândula agregada. Como mencionado anteriormente as demais sequências encontradas nas glândulas, agregada, ampulada maior, ampulada menor e flageliforme, que não apresentaram *E-value* significativos, podem ser observadas na tabela A5 do apêndice. Podemos notar também a partir da tabela 4 que grande parte das proteínas que apresentaram uma identificação significativa através das buscas no BLASTP, são proteínas estruturais da seda, ou são peptídeos naturais oriundos dessas proteínas, as quais já foram discutidas anteriormente (Beckwitt & Arcidiacono 1994; Römer et al., 2008; Rising et al., 2007; Ayoub et al., 2008; dos Santos- Pinto et al., 2014). A espidroína *flagelliform silk protein*, por exemplo, não foi identificada inicialmente nas buscas pelos bancos de dados de proteínas, porém, foi identificada quando a sequência peptídica, obtida através da análise *de novo*, foi alinhada na ferramenta de buscas BLASTp. Isso demonstra que, as espidroínas podem ser constituídas por uma diversidade de fragmentos peptídicos que ainda não foram descritos na literatura, e depositados nos bancos de dados. E o uso da abordagem proteômica combinado com um estudo de PTMs possibilitou a identificação de um fragmento fosforilado que apresentou valores significativos de homologia com a sequência da espidroína *flagelliform silk protein*.

Alguns estudos com proteínas e peptídeos estruturais da seda de aranhas e outros artrópodes estão sendo realizados, e tem evidenciando a importância dessas proteínas e peptídeos no processo, por exemplo, de emulsificação. Os emulsificantes desempenham um papel central na formação e estabilização de emulsões que são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, cosmética, na catálise, no encapsulamento de drogas Florczak et al., 2014, e outras aplicações biomédicas. Recentemente, um estudo demonstrou que as nanofibras oriundas da fibroína da seda (FS), de *Bombyx mori*, são bons emulsificantes, se comparados com emulsificantes tradicionais, como os surfactantes e emulsificantes proteicos (Chen, et al., 2017). O estudo de Chen et al., (2017), demonstrou que as nanofibras da fibroína da seda (SNF) são robustas e versáteis, pois conseguem manter a estabilidade da emulsão mesmo em condições adversas de alta concentração salina e baixo valor de pH. Isso porque, essas SNF apresentam uma quantidade elevada de folhas-beta, densidade de carga, propriedades hidrofóbicas e dispersibilidade na água (Chen, et al., 2017). Os papéis funcionais destes peptídeos em suas formas naturais, ainda são desconhecidos; para

isso, será necessário sintetizá-los e submetê-los a diferentes ensaios de atividades biológicas.

Dentre as identificações obtidas nas análises *de novo* outra proteína que apresenta papel relevante neste estudo e que apresentou um *E-value* significativo foi a proteína *ctenidin-3-like* – Código de acesso: XP_023210969.1. O peptídeo *ctenidin* foi estudado recentemente e descrito em venenos de aranhas e escorpiões, como sendo rico em glicina, que desempenha importante papel na ação antimicrobiana (Wang & Wang, 2016). Como já mencionado anteriormente, as defensinas, ou seja, as proteínas que apresentam ação antimicrobiana contra patógenos, são muito importantes para prevenir as infecções microbianas (dos Santos-Pinto et al., 2016; Esteves et al., 2020) na teia, enquanto a presa está sendo digerida.

As figuras numeradas de 16 a 34 mostram alguns dos espectros de massas representativos obtidos para as modificações de fosforilação detectadas nos resíduos de serina, treonina e tirosina das sequências peptídicas exibidas na tabela 5.

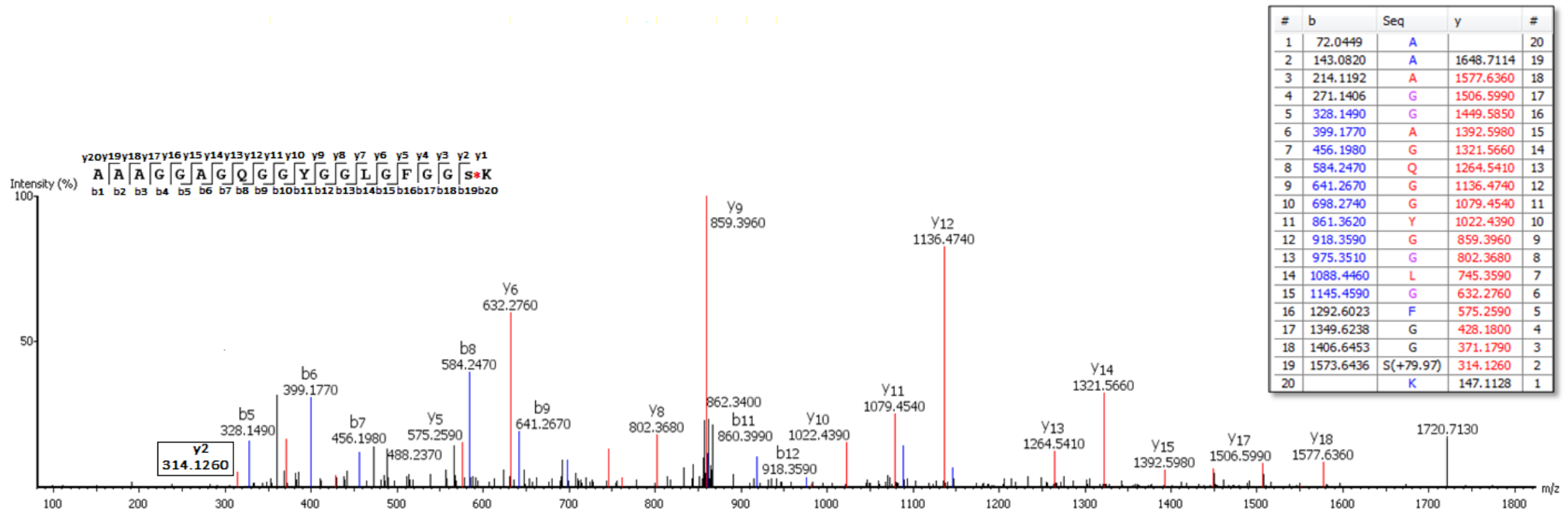


Figura 16. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico AAAGGAGQGGYGGLGFGG**S**K, selecionando-se o íon m/z 860.3679 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de serina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na glândula ampulada maior da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *spidroin 1* através do banco de dados Araneae.

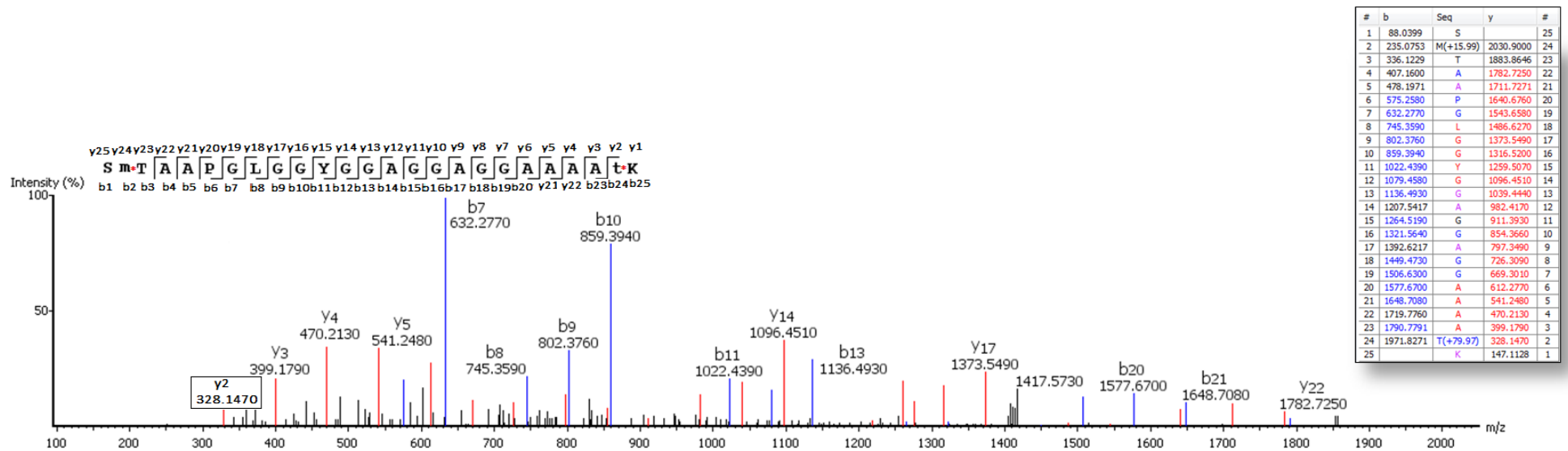


Figura 17. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **SMT**AAPGLGGYGGAGGAGGAGGAAAAT**K**, selecionando-se o íon m/z 706.6445 $[M + 3H]^{3+}$, como precursor, e mostrando os sítos de oxidação no resíduo de metionina ($\Delta = +15$ Da) e no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na glândula agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae.

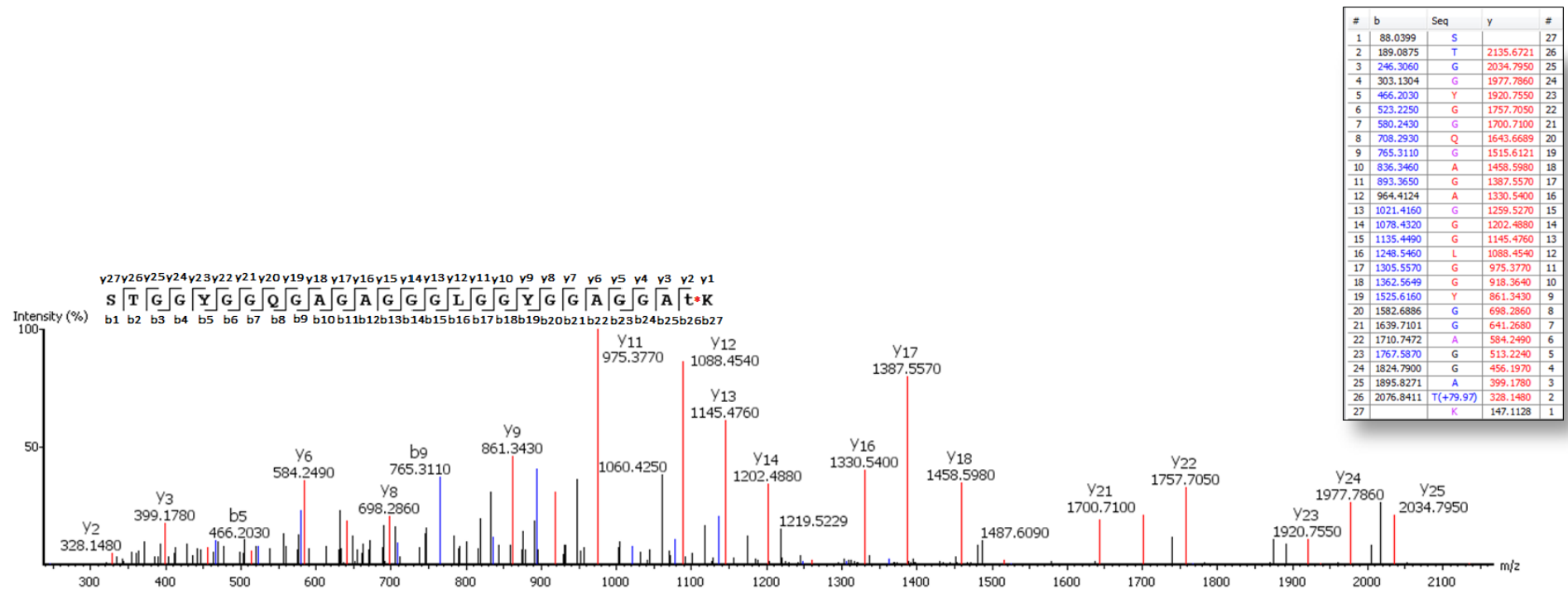


Figura 18. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico STGGYGGQGAGAGGGLGGYGGAGGATK, selecionando-se o íon m/z 741.6457 $[M + 3H]^{3+}$, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae.

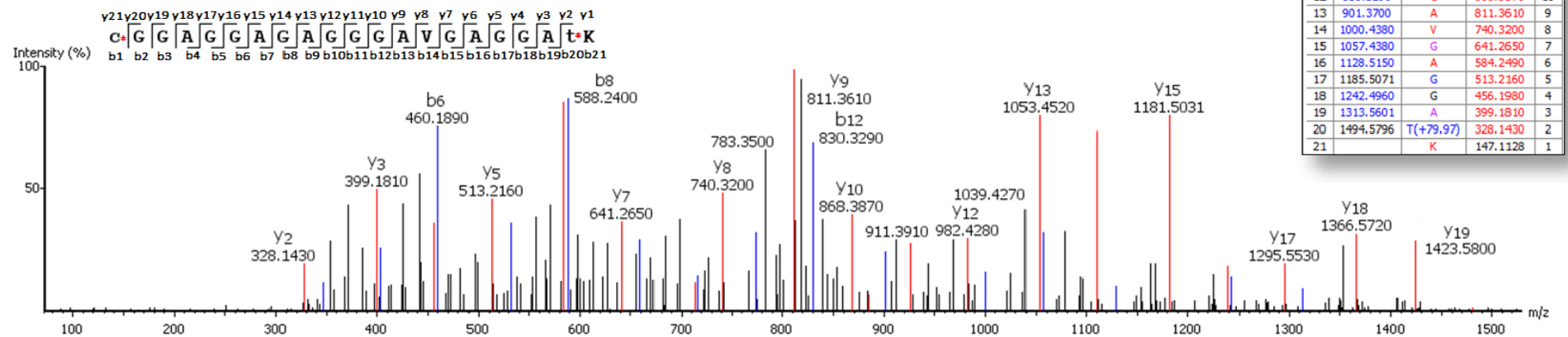


Figura 19. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **C**GGAGGAGAGGGAVGAGGA**T**K, selecionando-se o íon m/z 820.855 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando os sítio de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na glândula agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *flagelliform silk protein* através do banco de dados Araneae.

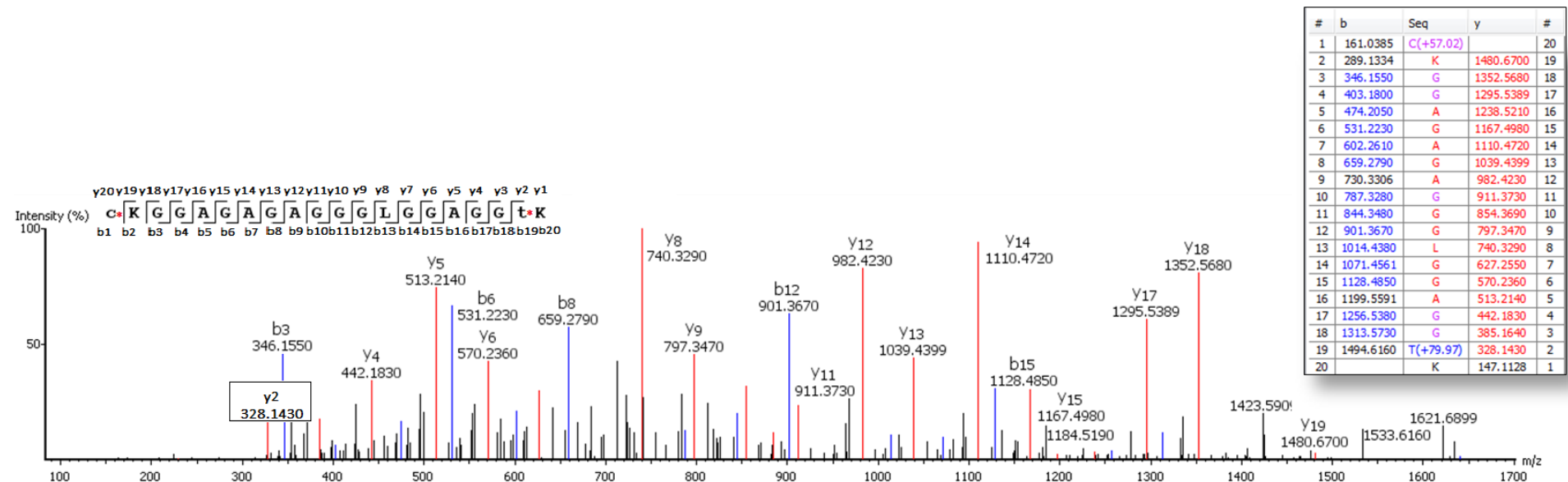


Figura 20. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **CKGGAGAGAGGGLGGAGGTK**, selecionando-se o íon m/z 820.8555 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *zinc finger protein 608-like* através do banco de dados Scorpion.

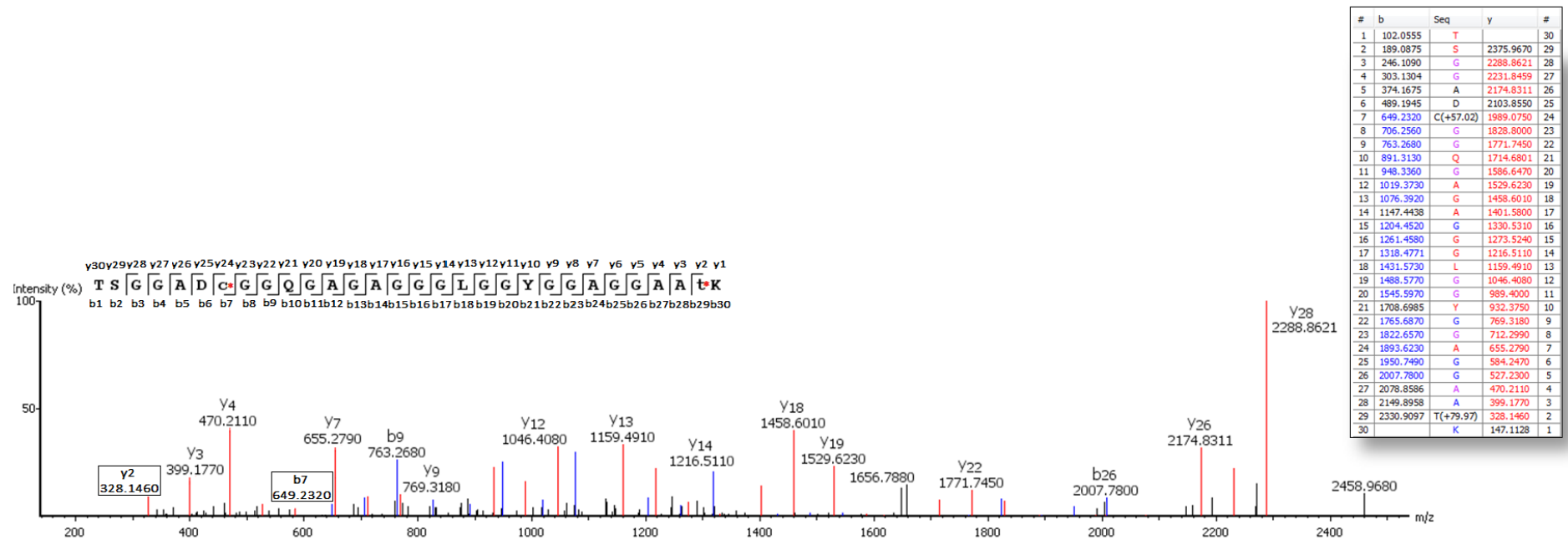


Figura 21. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico TSGGADCGGQGAGAGGGLGGYGGAGGAATK, selecionando-se o íon m/z 826.3333 $[M + 3H]^3+$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae.

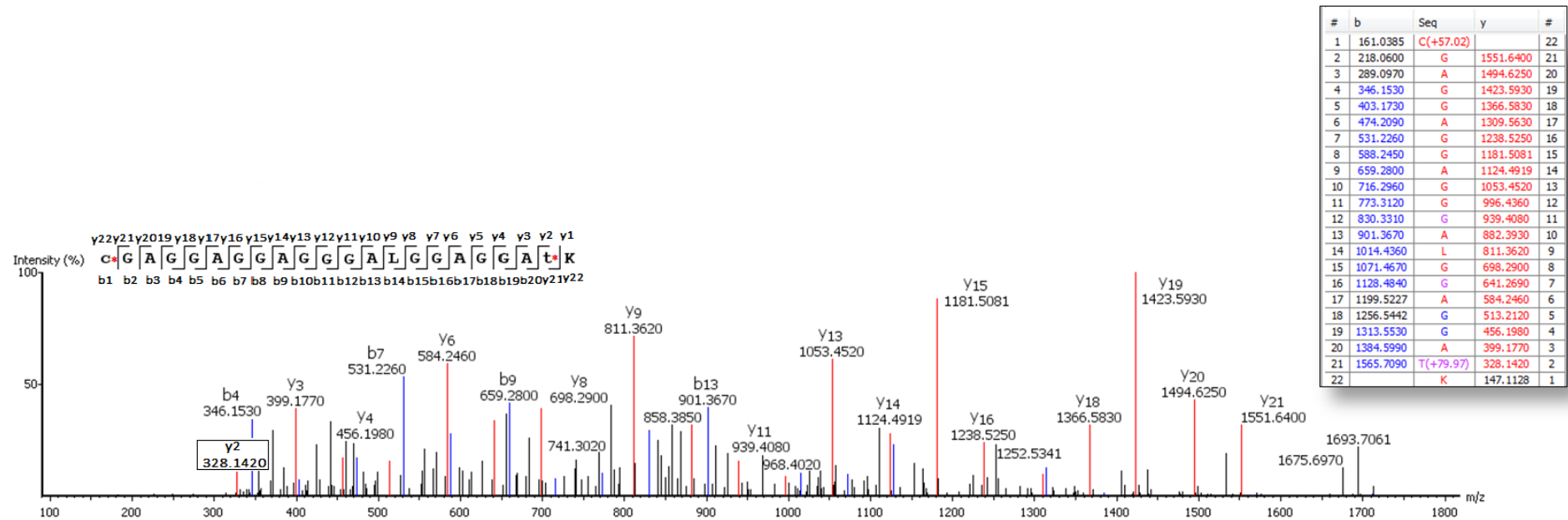


Figura 22. Espectro CID representativo do peptídeo trípico **C**AGAGAGGAGGGALGGAGG**A**T**K**, selecionando-se o íon m/z 856.3702 $[M + 3H]^{3+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *flagelliform silk protein* através do banco de dados Araneae.

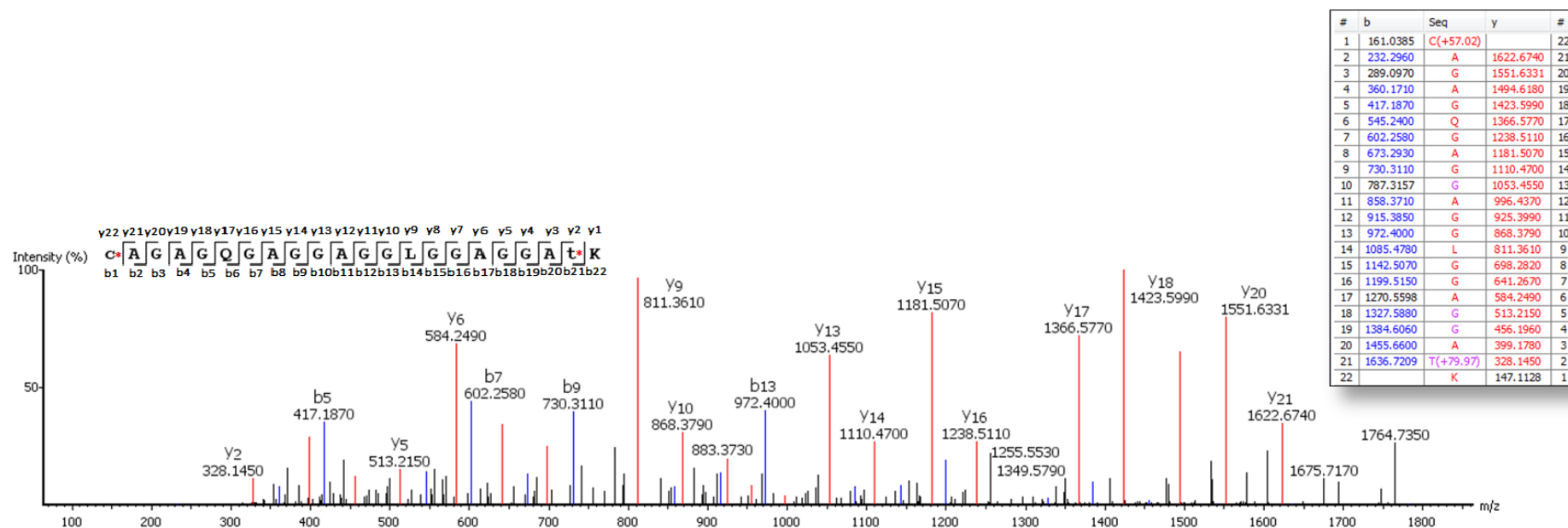


Figura 23. Espectro CID representativo do peptídeo trípico **C**AGAGQGAGGAGGLGGAGG**A**T**K**, selecionando-se o íon m/z 891.8881 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae.

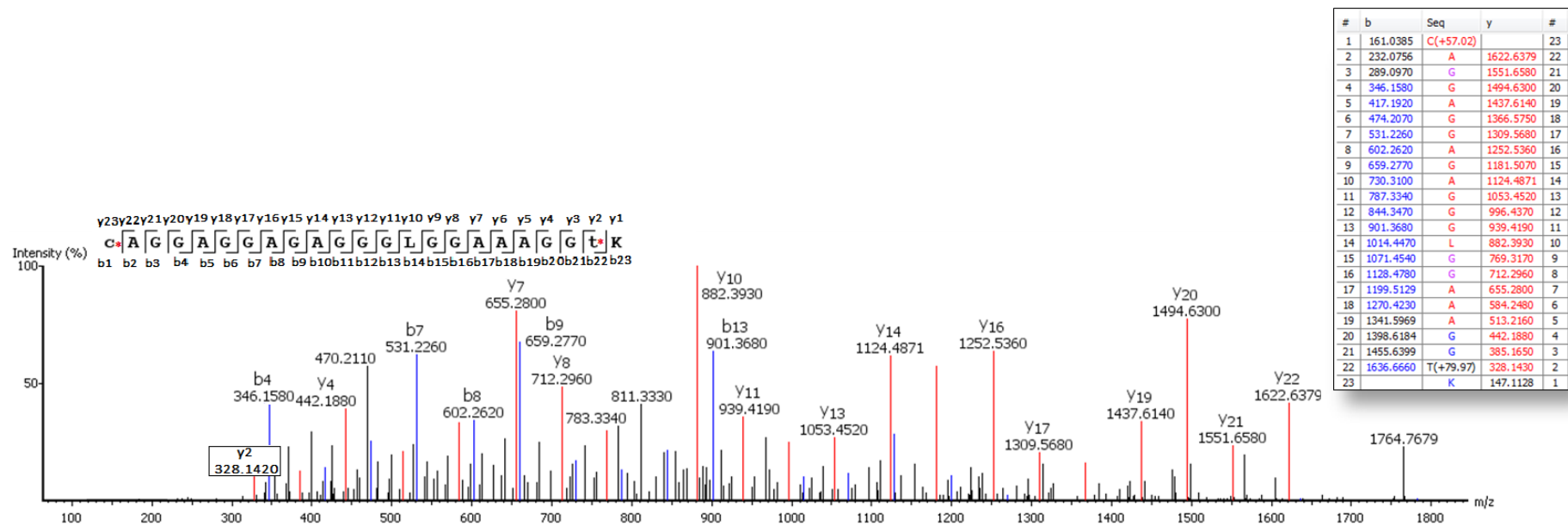


Figura 24. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **CAGGAGGAGAGGGLGGAAAGGTK**, selecionando-se o íon m/z 891.8891 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *flagelliform silk protein* através do banco de dados Araneae.

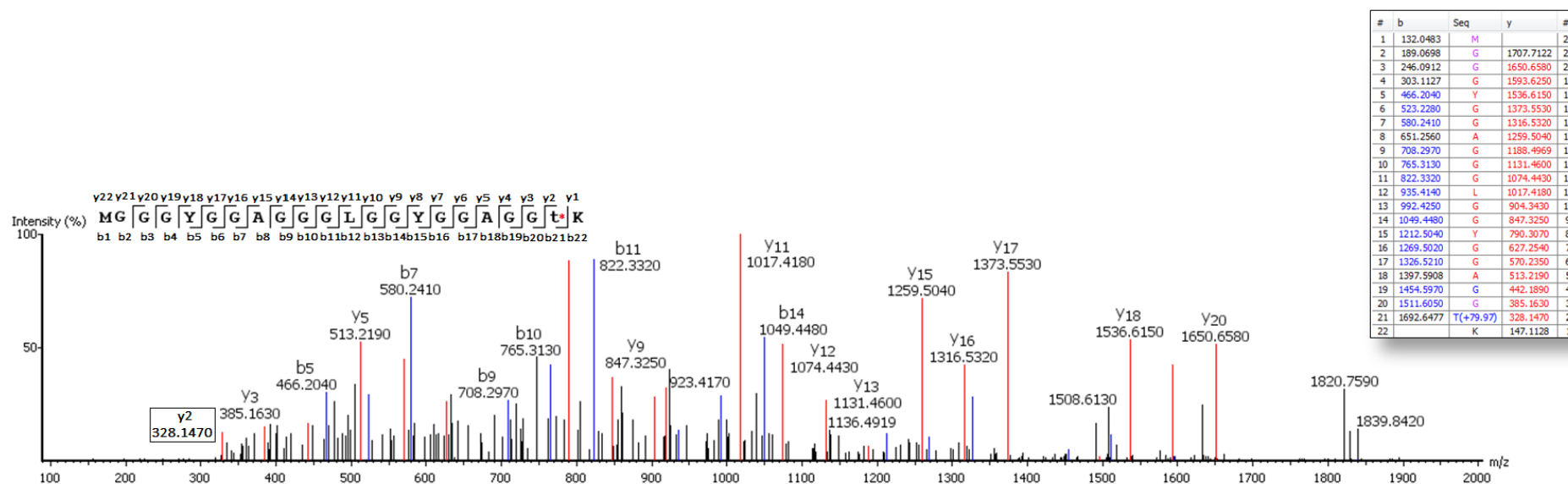


Figura 25. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico MGGYGGAGGGLGGYGGAGGT.K, selecionando-se o íon m/z 919.8828 [$M + 2H$] $^{2+}$, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *ctenidin-3-like* através do banco de dados Scorpiones.

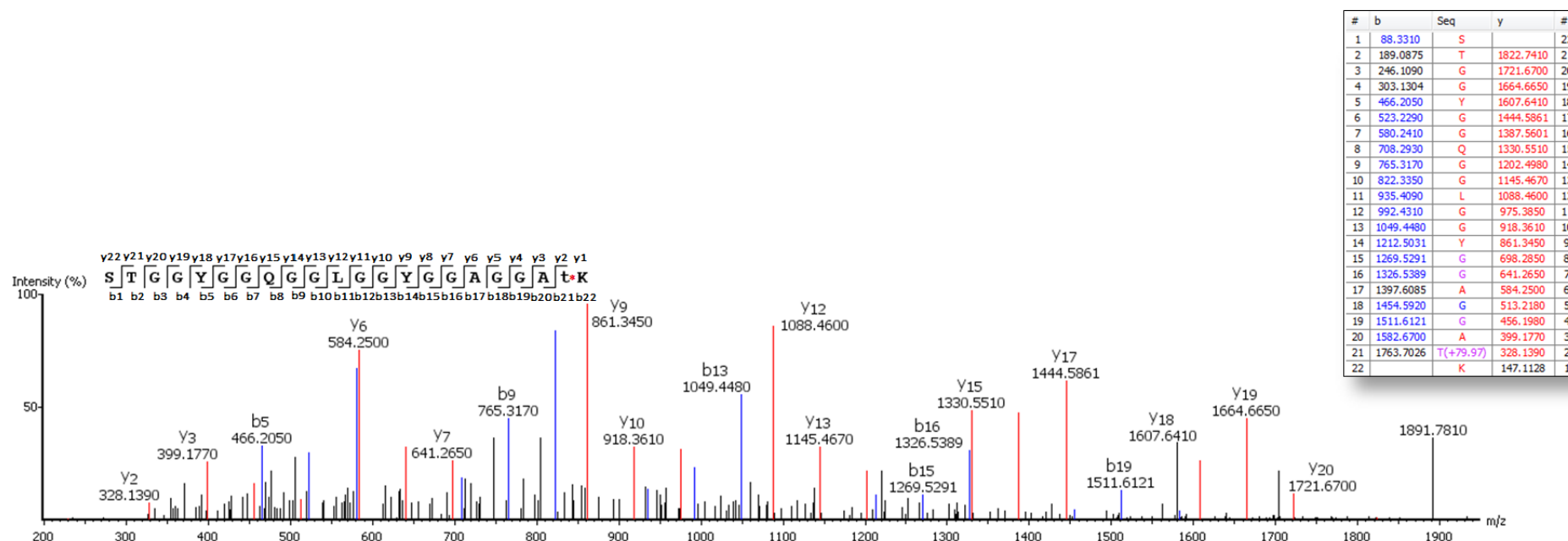


Figura 26. Espectro CID representativo do peptídeo trípico STGGYGGQGGLGGYGGAGGATK, selecionando-se o íon m/z 955.4012 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *fibroin 1* através do banco de dados Araneae.

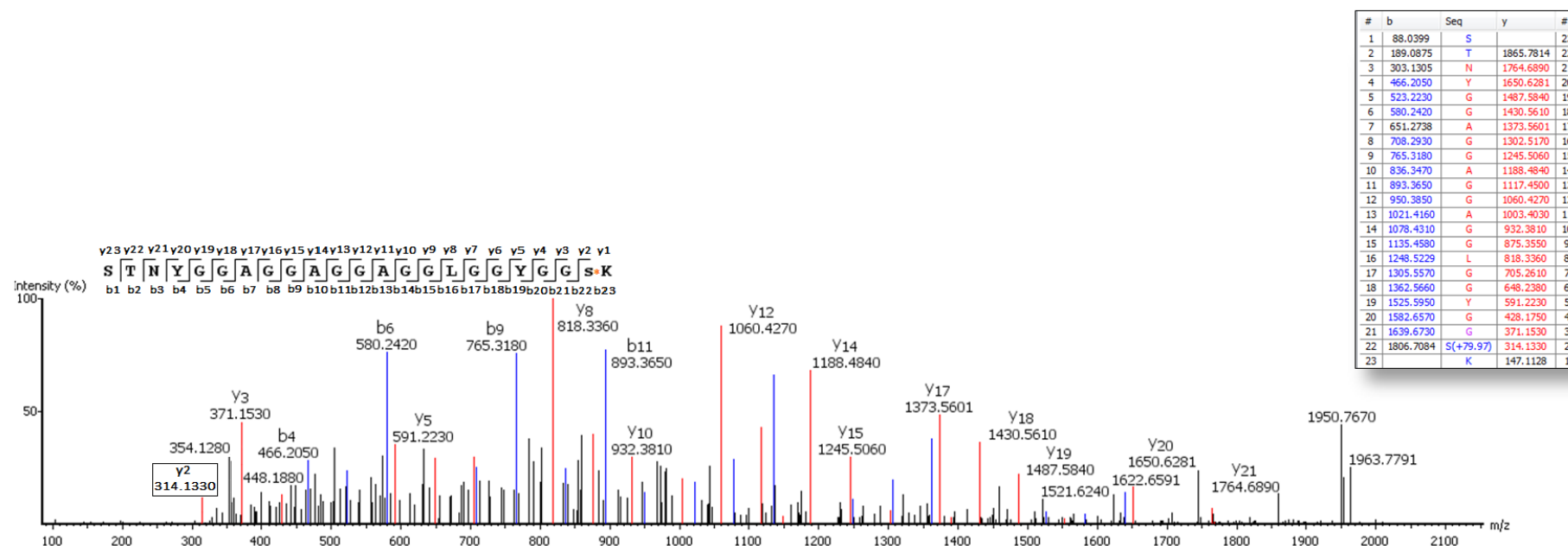


Figura 27. Espectro CID representativo do peptídeo trípico STNYGGAGGAGGAGGLGGYGGSK, selecionando-se o íon m/z 976.9002 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de serina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *flagelliform silk protein* através do banco de dados Araneae.

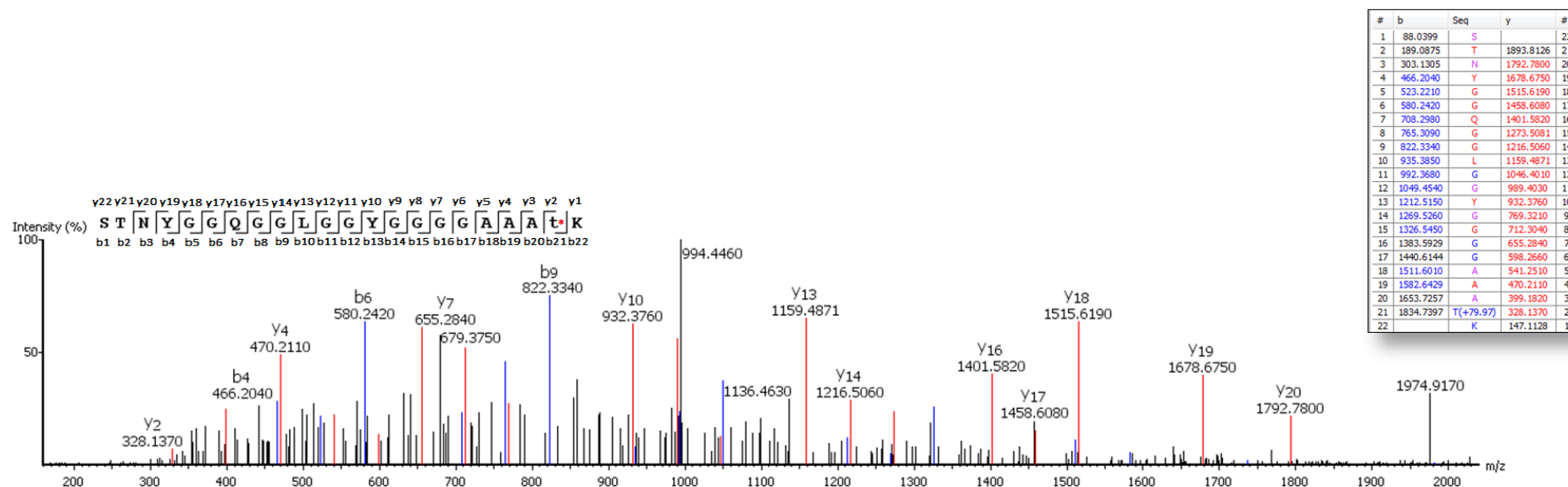


Figura 28. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico STNYGGQGGLGGYGGGGAAATK, selecionando-se o íon m/z 990.9171 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando o sítio de fosforilação no resíduo de serina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *fibroin 2* através do banco de dados Araneae.

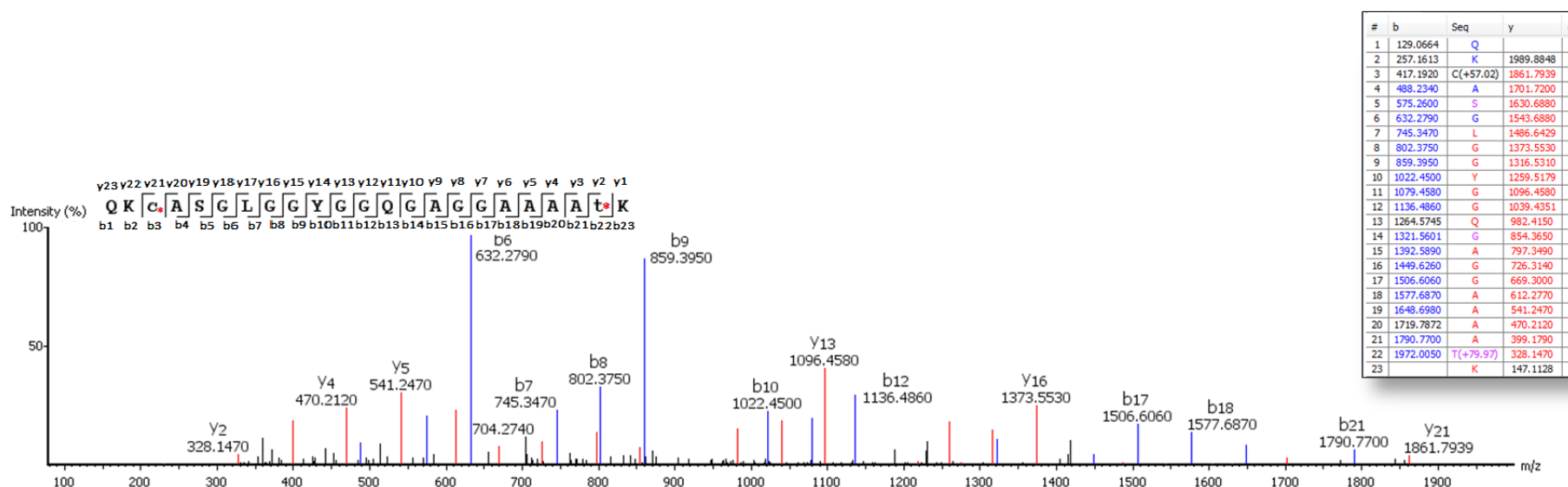


Figura 29. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico QK[CASGLGGYGGQGAGGAAAATK, selecionando-se o íon m/z 706.6435 [$M + 3H$] $^{3+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae.

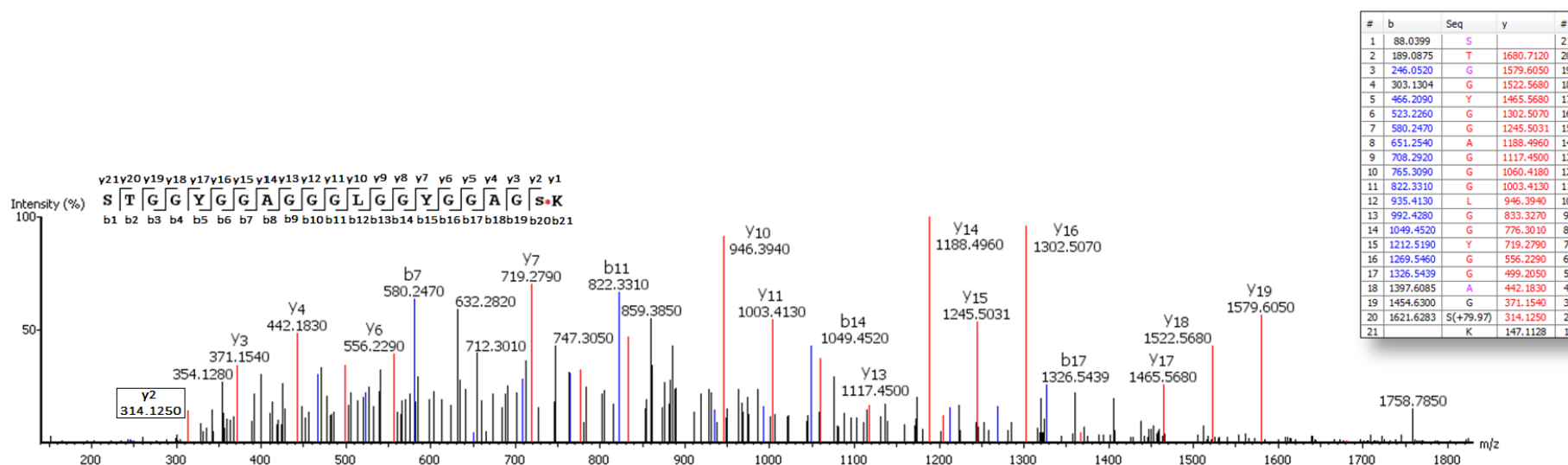


Figura 30. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico STGGYGGAGGGLGGYGGAGSK, selecionando-se o íon m/z 884.366 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando o sítio fosforilação no resíduo de serina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *fibroin 2* através do banco de dados Araneae.

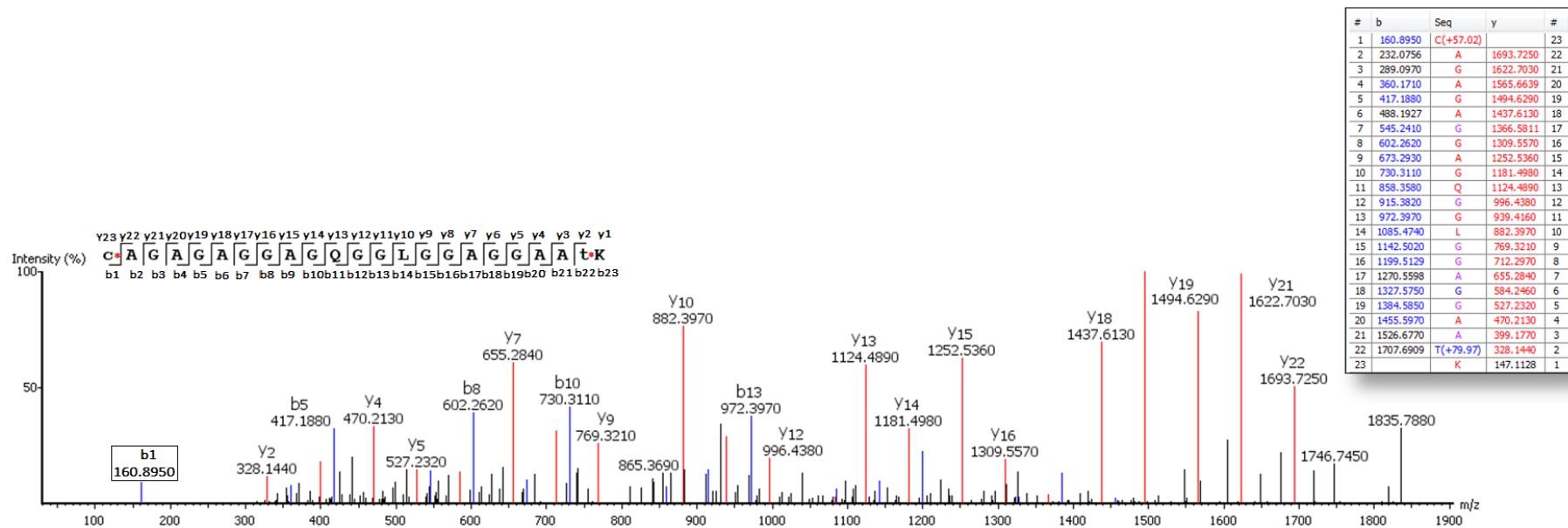


Figura 31. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **CAGAGAGGAGQGGLGGAGGAATK**, selecionando-se o íon m/z 927.4062 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando os sítios de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação nos resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae.

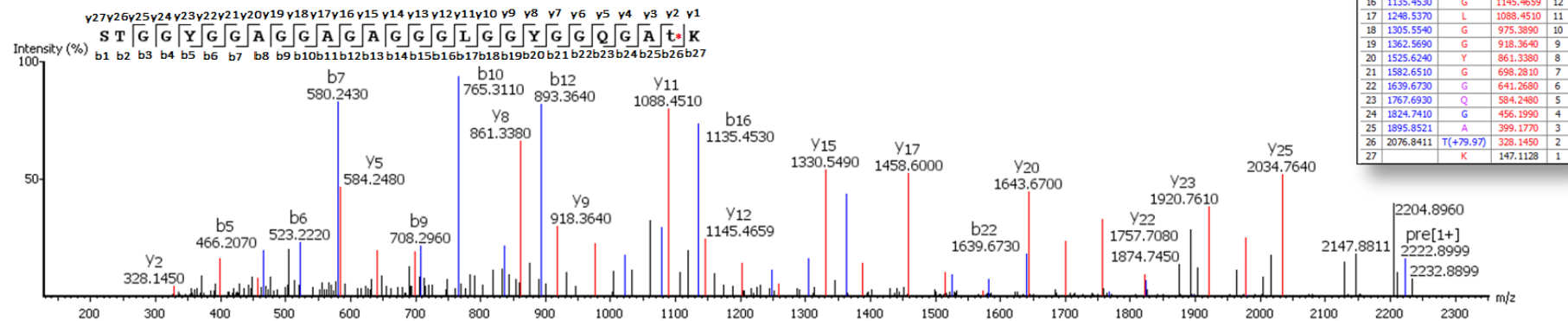


Figura 32. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico STGGYGGAGGAGAGGGLGGYGGQGATK, selecionando-se o íon m/z 1111.9609 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando o sítio fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *dragline silk spidroin 1* através do banco de dados Araneae.

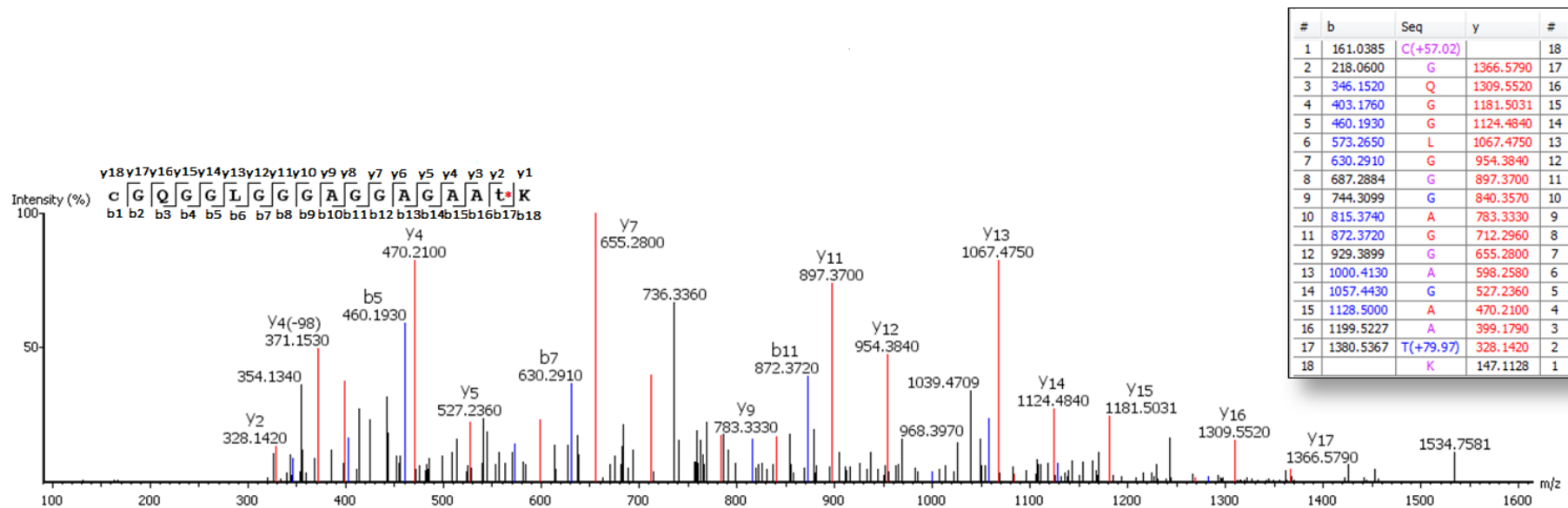


Figura 33. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico **CGQGGLGGAGGAGAA*TK**, selecionando-se o íon m/z 763.8358 $[M + 2H]^{2+}$, como precursor, e mostrando os sítos de carbamidometilação no resíduo de cisteína ($\Delta = +57$ Da) e fosforilação no resíduo de treonina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *major ampullate spidroin 1* através do banco de dados Araneae.

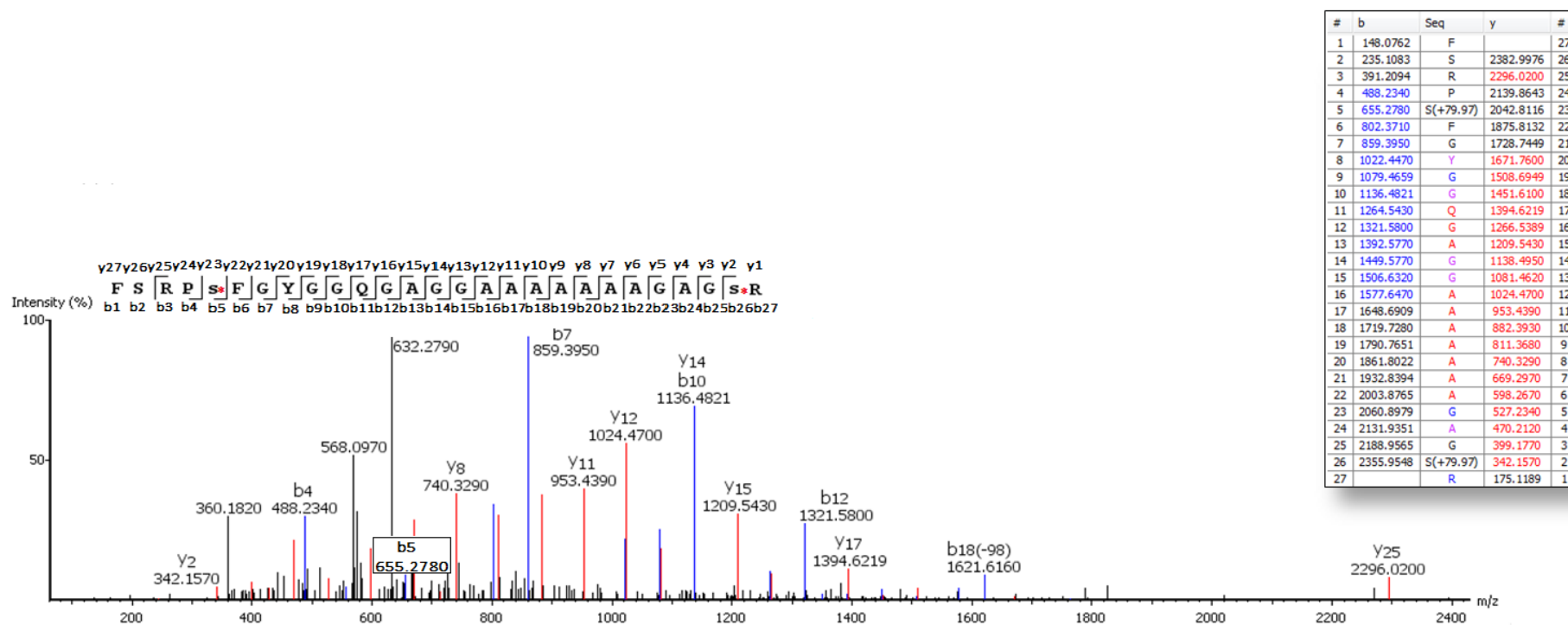


Figura 34. Espectro CID representativo do peptídeo tríptico FSRP SFGYGGQGAGGAAAAAAGAGSR, selecionando-se o íon m/z 844.0377 [$M + 3H$] $^{3+}$, como precursor, e mostrando os dois sítos de carbamidometilação de fosforilação em resíduos de serina ($\Delta = +80$ Da), observado na sequência peptídica presente na agregada da aranha *T. clavipes*. Os picos correspondentes aos íons-fragmentos da série -y foram representados em vermelho, enquanto aqueles correspondentes ao da série -b foram representados em azul. Essa sequência peptídica foi identificada como sendo a proteína *spidroin-1* através do banco de dados Araneae.

4.2. Bioensaio de inseto-toxicidade das amostras fosforiladas

Devido a diversidade de fosfoproteínas semelhantes a toxinas, neurotoxinas, enzimas proteolíticas e defensinas identificadas no presente estudo, e que apresentam similaridade com sequências de toxinas/neurotoxinas já relatadas na literatura (dos Santos-Pinto et al., 2016; Esteves et al., 2020), decidiu-se então realizar um ensaio de inseto-toxicidade utilizando o extrato bruto enriquecido em proteínas fosforiladas das glândulas ampulada maior (AMA) e agregada (AGRE), a fim de verificar a toxicidade destas amostras com a presença da modificação (Figura 35). Para as amostras das glândulas flageliforme e ampulada menor não foi possível realizar o ensaio, uma vez que não se dispunha de quantidade de amostra suficiente dos extratos dessas glândulas. Isto é justificado pelo fato de que, não foi possível realizar a coleta devido às medidas de distanciamento social e restrições de acesso aos locais de coletas, determinados pela ocorrência da pandemia de COVID-19.

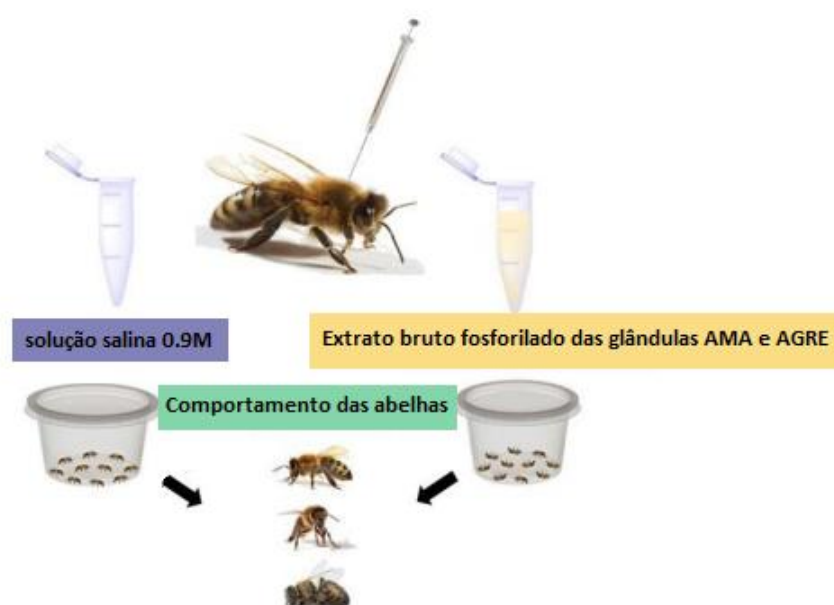


Figura 35. Ensaio de inseto-toxicidade com o extrato bruto das glândulas ampulada maior e agregada da aranha *T. clavipes*. Representação esquemática do ensaio de inseto-toxicidade.

Os bioensaios foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Manzoli Palma et al. 2003. Dessa forma, foram injetados 1 μ l do extrato bruto (por indivíduo), na hemocèle de abelhas *Apis mellifera* - que são presas naturais da aranha *T. clavipes* (Esteves et al., 2020). As abelhas foram separadas em 3 grupos amostrais, sendo eles: i) o grupo controle com injeção de solução salina (NaCl 0.9 % (m/v)); ii) extrato bruto fosforilado da glândula ampulada maior; iii) e extrato bruto fosforilado da glândula agregada (ambos testados em cinco concentrações distintas). Para cada concentração, três réplicas de 10 abelhas recém-emergidas foram utilizadas. Os resultados desses ensaios estão demonstrados nas figuras 36 e 37.

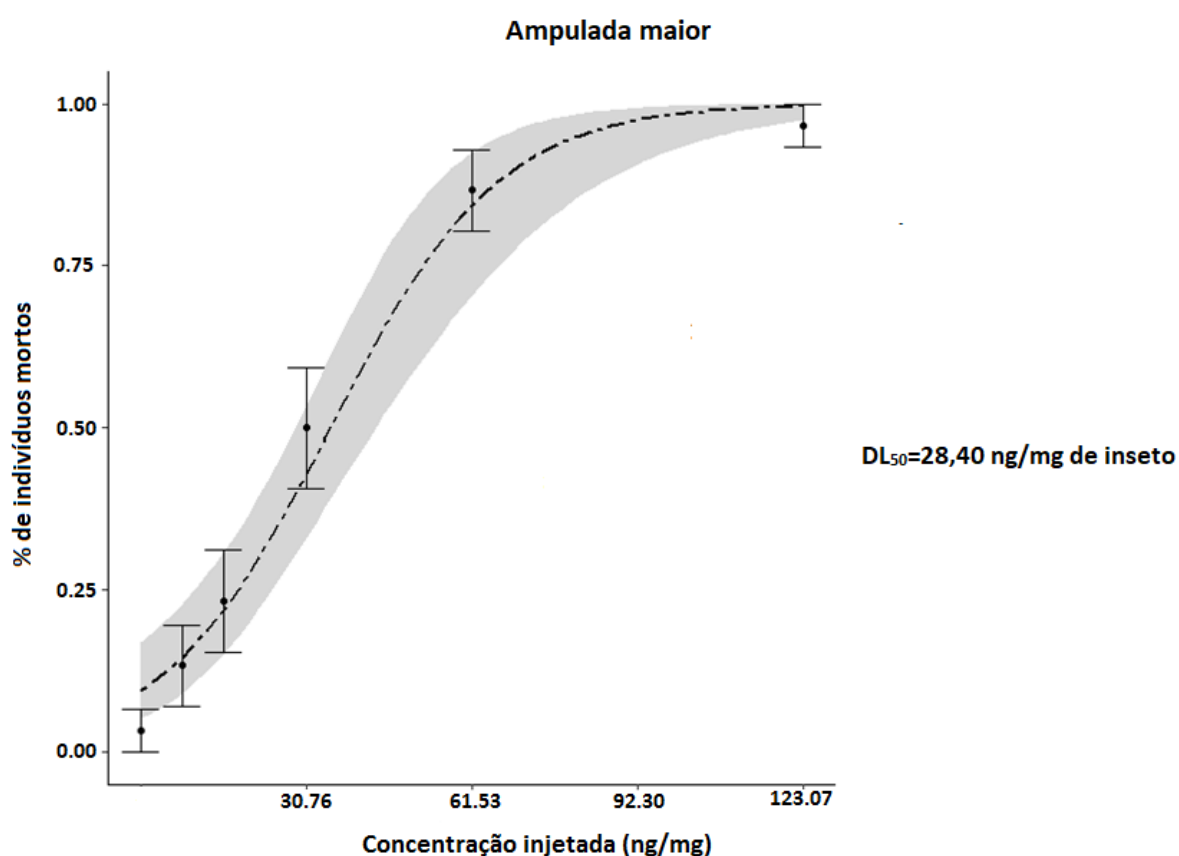


Figura 36. Gráfico da curva de dose-resposta do ensaio de inseto-toxicidade através da injeção do extrato bruto da glândula ampulada maior da aranha *T. clavipes* na hemocèle de abelhas *A. mellifera* recém emergidas. Foram injetadas cinco concentrações – 7,69ng/mg; 15,38ng/mg; 30,76ng/mg; 61,53ng/mg; 123,07ng/mg, além do grupo controle representado pelo primeiro ponto da curva próximo a 0 (solução salina NaCl 0,9 % (m/v)). DL₅₀=28,40 $\pm$ 0,09 ng/mg de inseto.

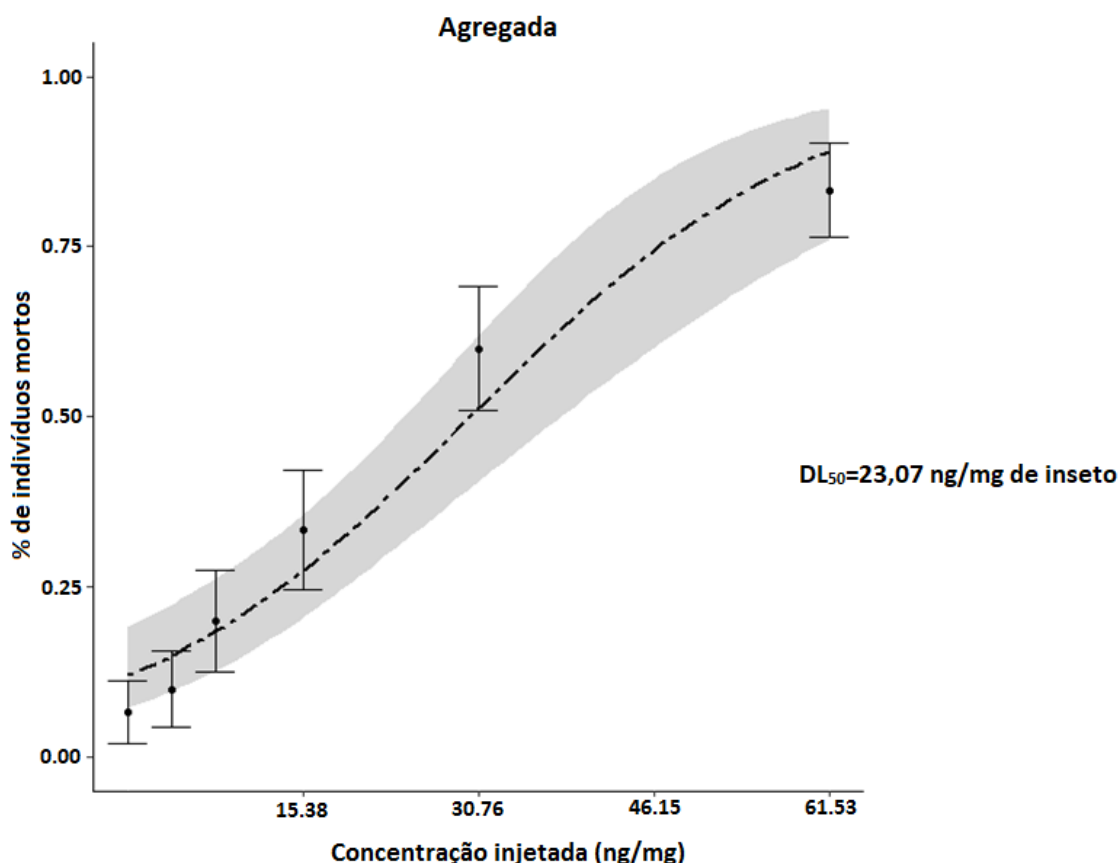


Figura 37. Gráfico da curva de dose resposta do ensaio de inseto-toxicidade através da injeção do extrato bruto da glândula agregada da aranha *T. clavipes* na hemocela de abelhas *A. mellifera* recém emergidas. Foram injetadas cinco concentrações – 3,84ng/mg; 7,69ng/mg; 15,38ng/mg; 30,76ng/mg; 61,53ng/mg, além do grupo controle representado pelo primeiro ponto da curva próximo a 0 (solução salina NaCl 0,9 % (m/v)). DL₅₀=23,07 ± 0,09 ng/mg de inseto.

O comportamento das abelhas recém emergidas foi observado após 24 horas da injeção do extrato glandular e foi possível constatar que haviam alguns insetos ativos, com movimentos lentos, e outros mortos. A toxicidade das amostras foi avaliada com a função de ligação Logit, representados nas figuras 36 e 37, onde se pode observar os valores de DL₅₀= 28,40 ng/mg inseto obtida para a glândula ampulada maior, e DL₅₀= 23,07 ng/mg inseto obtida para a glândula agregada. Sob o ponto de vista ecológico é mais interessante para aranha manter os insetos sob o efeito de paralisia, aprisionados pela teia sem, no entanto, matar. Dessa forma, o inseto permanece vivo e fresco, para que mais tarde seja consumido pela aranha. Corroborando essa relação, em 2016, Fuzita et al., demonstraram em um estudo com

a aranha *Nephilingis cruentata*, que as presas capturadas pela teia dessa aranha permanecem vivas até o momento em que a aranha secreta sob a presa um fluido rico em enzimas que ajudam a digerir a presa; dessa forma a aranha consegue consumir aos poucos as partes pré-digeridas da presa. Nos ensaios do presente trabalho, os insetos modelo de presas (abelhas) morreram dentro das 24 horas de observação, possivelmente porque os extratos foram injetados, e não aplicados topicamente na presença de gotículas lipídicas, como ocorre na natureza.

Em 2005, Marques et al., realizou ensaio de inseto-toxicidade via hemocèle, no qual o extrato total da teia da aranha *T. clavipes*, em diferentes dosagens foi injetado em abelhas *A. mellifera* recém emergidas. No estudo, o extrato total da teia apresentou DL₅₀ de 2 ng/mg inseto. Além das abelhas, nesse mesmo estudo também foram realizados ensaios de inseto-toxicidade com outros insetos como: cigarras, libélulas, borboletas, baratas, grilos, besouros, cupins e moscas, no entanto, observou-se que grilos e besouros (que não são presas naturais de *Trichonephila clavipes*), não sofreram nenhum efeito aparente das toxinas, enquanto os outros insetos das ordens Hymenoptera, Odonata, Homoptera, Lepdoptera e Isoptera, foram mortos e/ou paralisados pelo extrato do lavado da teia.

Em 2020, Esteves et al., identificaram uma diversidade de proteínas semelhantes a toxinas e neurotoxinas presentes nas glândulas de seda no extrato vesicular da teia da aranha *T. clavipes*; e com a finalidade de verificar a toxicidade do lavado do extrato bruto vesicular, realizaram bioensaios de inseto-toxicidade via injeção na hemocèle de *A. mellifera* e foi possível verificar a ação tóxica do extrato, que apresentou DL₅₀ de 0,3 ng/mg inseto. Nesse estudo também foi demonstrado o compartilhamento de 65 proteínas semelhantes a toxinas e neurotoxinas entre as glândulas de seda e o lavado do extrato bruto da seda da teia.

Deve-se considerar que a intensidade do efeito tóxico da seda da teia, pode variar de acordo com a região de coleta e/ou estação do ano em que essas teias foram coletadas, no caso das aranhas *T. clavipes*.

E ainda, em estudos com aranhas do gênero *Trichonephila*, Jin et al., 2017 analisaram veneno da aranha *Trichonephila clavata*, e identificaram, uma nova toxina que mostrou-se ser uma forte candidata potencial e/ ou modelo para o desenvolvimento de bioinseticidas seletivos. Essa toxina foi identificada e caracterizada (μ -NPTX-Nc1a). O peptídeo purificado Nc1a exibiu efeitos inibitórios nos canais de NaV e KV em neurônios medianos dorsais não pareados de baratas,

apresentou valor de $DL_{50} = 0,57\text{ng/mg}$ de barata e exibiu o mesmo potencial tóxico do peptídeo $\delta\text{-CNTX-Pn1a}$, já descrito na literatura (Figueiredo et al. 1995).

Comparando-se os valores de DL_{50} demonstrados no presente trabalho, com aqueles descritos nos trabalhos de Marques et al., (2005) e Esteves et al., (2020) (que foram ensaiados em condições experimentais semelhantes), pode-se observar que os valores de DL_{50} dos extratos ricos em proteínas fosforiladas foram muito maiores que os valores obtidos para os extratos não enriquecidos em fosfoproteínas. Dessa maneira, apesar de considerar que tais ensaios necessitam ser investigados de maneira mais extensiva e sistemática, pode-se especular que aparentemente a fosforilação deve estar reduzindo as atividades tóxicas das proteínas.

Estudos, utilizando de uma abordagem proteômica e transcriptômica em larga escala, tem demonstrado que apesar de todas as glândulas contribuírem na biossíntese e secreção de proteínas semelhantes às toxinas e neurotoxinas da teia, as glândulas ampulada maior e agregada são as que mais contribuem de forma abundante (dos Santos-Pinto et al, 2016; Esteves et al. 2020). No presente estudo utilizando o extrato bruto das glândulas que apresentam proteínas semelhantes a toxinas fosforiladas, a ampulada maior também mostrou-se uma das maiores contribuintes em número de identificações; e apesar da menor contribuição da glândula agregada em identificações de toxinas fosforiladas, esta glândula é muito importante por sintetizar e secretar as toxinas que ficam armazenadas nas gotículas depositadas sobre os fios de seda (Salles et al., 2006; Blackledge, 2009; Esteves et al., 2020).

Os resultados dos ensaios de inseto-toxicidade do presente estudo corroboram com a existência de um papel químico ativo, além do papel mecânico na captura de presas, conforme já proposto anteriormente para as teias de aranhas do gênero *Trichonephila* (Marques et al., 2005; Salles et al., 2006; dos Santos-Pinto et al, 2016; Esteves et al. 2020); assim como também fornece informações para a busca de moléculas presentes na seda da teia, as quais podem apresentar um potencial no futuro desenvolvimento de bioinseticidas.

4.3 Qual seria a relevância da presença da fosforilação nas espidroínas e nas proteínas semelhantes a toxinas/neurotoxinas?

- **Espidroínas:**

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 e interação das proteínas (Eyers et al., 2008), e têm sido relatados em diferentes tipos de seda. Zhang et al. (2006) relataram a presença de sítios de fosforilação na fibroína de cadeia leve e P25, um dos três polipeptídeos componentes da fibroína da seda de *Bombyx Mori*; e em estudos de Chen et al. (2010), também com a seda do casulo de *Bombyx Mori*, foram identificados 12 sítios de fosforilação presentes na fibroína de cadeia pesada. Estudos demonstram a presença de uma grande quantidade de resíduos de fosfato no ducto de fiação sugerindo que a fosforilação ocorre durante o processamento da fibra para ser liberada pela glândula ampulada maior (Michal et al., 1996; Heim et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que o alinhamento/dobramento das proteínas é regulado por alterações físicas e bioquímicas que ocorrem ao longo do ducto de fiação, com uma diminuição de pH e concentração de íons Na^+ e aumento na concentração dos íons K^+ e fosfato (Knight et al., 2001; Dicko et al., 2004; Askarieh et al., 2010). Winkler et al. (2000), demonstraram que o alinhamento/dobramento de folhas- β em proteínas semelhantes às proteínas da seda, foi mediado pelo equilíbrio entre fosforilação e desfosforilação, que por sua vez foi catalisado pelo balanço entre as atividades das enzimas proteína kinase e proteína fosfatase.

Apesar do grande interesse pelas propriedades mecânicas da seda das aranhas, visando o seu uso em aplicações biomédicas e biotecnológicas devido as suas propriedades de resistência, elasticidade e biocompatibilidade (Vollrath et al., 2002; Numata, 2020), ainda pouco se conhece sobre os detalhes das glândulas produtoras de seda e o processo de fiação que ocorre para a produção das fibras; assim como também não tem sido considerada a presença de modificações pós-traducionais que, possivelmente, podem contribuir para uma melhor compreensão do uso das fibras da seda em novas aplicações biotecnológicas.

O conhecimento adquirido a partir do presente estudo possibilita um melhor entendimento sobre a estrutura e função das espidroínas, ainda dentro das glândulas de seda, considerando a presença da modificação pós-traducional de fosforilação. A modificação de fosforilação em espidroínas encontradas nos fios de seda da teia da

aranha *T. clavipes* já vem sendo explorada por nosso grupo de pesquisa (dos Santos-Pinto et al., 2014, 2015, 2016 e 2018),

Nos estudos realizados por dos Santos-Pinto et al. (2015, 2016, 2018), com a seda da teia da *T. clavipes*, foi demonstrado que as modificações de fosforilação observadas nas espidroínas-1 e espidroínas-2 estão localizadas exatamente dentro dos motivos estruturais que seriam responsáveis pelas propriedades mecânicas da seda; na espidroína-1 a fosforilação foi observada principalmente no motivo GGX, o qual pode ser responsável pelas propriedades elásticas. Já na espidroína-2, a fosforilação foi observada nos motivos GPGXX e (A)_n, os quais podem ser responsáveis pelas propriedades elásticas e de resistência da seda, respectivamente. Estudos evidenciam que a estrutura constituída pelo motivo GGX pode formar folhas- β bem como estruturas helicoidais menos organizadas (Lefèvre et al., 2007; Jenkins et al., 2010; Rising et al., 2011); enquanto que a estrutura constituída pelo motivo GPGXX, devido ao resíduo de prolina, forma claramente voltas- β que quando repetidos produzem uma estrutura em espiral (Hayashi et al., 1999; Eisoldt et al., 2011).

O significado biológico da grande quantidade de fosforilação observada nas proteínas da seda da aranha *T. clavipes*, relatados até então, ainda é desconhecido. Porém, corroborando os dados da literatura, e como já mencionado anteriormente, essa modificação pode influenciar nas propriedades mecânico-elásticas da seda, conformação estrutural, estabilidade, interação entre proteínas, e organização das proteínas durante o processo de fiação das fibras; assim como podem também estar relacionadas com a preservação das espidroínas e conseqüentemente da estrutura da seda no meio ambiente após a formação da teia de captura (Vollrath & Knight, 1999; Hueimmerich et al., 2004; dos Santos Pinto et al., 2014, 2015, 2016, 2018).

Dessa forma, um melhor entendimento sobre o papel dessa modificação na estrutura das espidroínas pode possibilitar uma melhor exploração sobre as propriedades das fibras de seda em estudos visando aplicações biotecnológicas.

- **Toxinas/Neurotoxinas:**

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. Alguns estudos já têm investigado a relação das modificações, com a toxicidade de peptídeos encontrados em venenos animais, por exemplo. Em 2013, Resende et al., verificaram a presença da fosforilação no peptídeo melitina, uma das principais toxinas presentes no veneno de abelhas. Esse peptídeo é bem conhecido por sua ação altamente tóxica e alergênica. Ao realizarem ensaios de atividade biológica (hemólise, degranulação de mastócitos, atividade citolítica e quimiotática) da melitina fosforilada, foi observado que a toxicidade do peptídeo fosforilado é reduzida em comparação ao do peptídeo que não sofreu a modificação pós-traducional.

A contribuição das modificações de fosforilação nas toxinas/neurotoxinas encontradas no presente estudo pode ser bem ampla, colaborando para as propriedades bioquímicas dessas moléculas como estabilidade, solubilidade e atividades biológicas específicas; pode contribuir ainda no direcionamento dessas toxinas em diferentes rotas de sinalização para a atuação em canais iônicos e receptores neuronais. Porém, futuros estudos devem ser realizados a fim de elucidar a real função das modificações pós-traducionais nestas moléculas. Uma possível estratégia para a realização desses estudos seria a realização de bioensaios para avaliar a toxicidade destas moléculas com a presença ou ausência da fosforilação. Dessa forma, poderia se comparar a toxicidade entre uma fração fosforilada do extrato bruto e uma fração não fosforilada do extrato bruto.

5. Conclusão

Com este trabalho foi possível:

- Identificar proteínas fosforiladas que possivelmente estão envolvidas no processo de fiação, manutenção da seda e na proteção da integridade das proteínas da seda, as espidroínas;
- Obter uma visão geral do perfil fosfoproteômico das amostras, bem como a visão geral da interação entre as proteínas listadas, a partir do enriquecimento químico;
- Identificar de proteínas fosforiladas semelhantes às toxinas, neurotoxinas, enzimas proteolíticas e defensinas e corroborar com a hipótese de que essas toxinas possam desempenhar um papel químico-ativo na captura de presas;
- Verificar a toxicidade da amostra para indivíduos *A. melífera* como modelos de ensaio in vivo;
- Verificar a riqueza da amostra em fragmentos peptídicos ainda não identificados relevantes por apresentarem funções de atividades importantes para o processo de fiação e construção da seda da teia;

6. Referências bibliográficas

- _____. 214: Honeybees, acute contact toxicity test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing**, 1998.
- _____. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. **Methods in enzymology**, v. 463, p. 439–473, 2009b.
- _____. Isolation of two insecticidal toxins from venom of the Australian theraphosid spider *Coremiocnemis tropix*. **Toxicon**, v. 123, p. 62–70, 2016b.
- _____. Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 177–185, 2010a.
- _____. Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 177–185, 2010b.
- AKCAPINAR, G. B.; SEZERMAN, O. U. Computational approaches for de novo design and redesign of metal-binding sites on proteins. **Bioscience reports**, v. 37, n. 2, 2017.
- ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*, 5th edn, Garland Science, New York. **ISBN**, v. 1174808063, p. 1392, 2007.
- ALLMELING, C. *et al.* Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 10, n. 3, p. 770–777, 2006.
- ALONSO, A. et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 699–711, 2004.
- ALTMAN, G. H. et al. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, n. 3, p. 401–416, 2003.
- ANDERSSON, M. et al. Morphology and composition of the spider major ampullate gland and dragline silk. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2945–2952, 2013.
- ANDRADE MORAL, R. DE; HINDE, J.; GARCIA BORGES DEMÉTRIO, C. Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, n. 10, 2017.
- ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. [3] Theory of protein solubility. **Methods in enzymology**, v. 114, p. 49–77, 1985.
- ARDITO, F. et al. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy. **International journal of molecular medicine**, v. 40, n. 2, p. 271–280, 2017.

- ASKARIEH, G. *et al.* Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. **Nature**, v. 465, n. 7295, p. 236–238, 2010.
- AVIS, T. J.; BOULANGER, R. R.; BÉLANGER, R. R. Synthesis and biological characterization of (Z)-9-heptadecenoic and (Z)-6-methyl-9-heptadecenoic acids: fatty acids with antibiotic activity produced by *Pseudozyma flocculosa*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 4, p. 987–1000, 2000.
- BARFORD, D. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. **Trends in biochemical sciences**, v. 21, n. 11, p. 407–412, 1996.
- BATALHA, I. L.; LOWE, C. R.; ROQUE, A. C. A. Platforms for enrichment of phosphorylated proteins and peptides in proteomics. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 100–110, 2012.
- BECKWITT, R.; ARCIDIACONO, S. Sequence conservation in the C-terminal region of spider silk proteins (Spidroin) from *Nephila clavipes* (Tetragnathidae) and *Araneus bicentenarius* (Araneidae). **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 9, p. 6661–6663, 1994.
- BELL, A. L.; PEAKALL, D. B. Changes in fine structure during silk protein production in the ampullate gland of the spider *Araneus sericatus*. **The Journal of cell biology**, v. 42, n. 1, p. 284–295, 1969.
- BENDE, N. S. *et al.* The insecticidal spider toxin SFI 1 is a knottin peptide that blocks the pore of insect voltage-gated sodium channels via a large β -hairpin loop. **The FEBS journal**, v. 282, n. 5, p. 904–920, 2015.
- BINFORD, G. J. *et al.* Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. **Molecular biology and evolution**, v. 26, n. 3, p. 547–566, 2009.
- BITTENCOURT, D. *et al.* Protein families, natural history and biotechnological aspects of spider silk. **Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2012.
- BLACKLEDGE, T. A. *et al.* Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 13, p. 5229–5234, 2009.
- BLACKLEDGE, T. A. *et al.* Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 13, p. 5229–5234, 2009.

- BLACKLEDGE, T. A.; HAYASHI, C. Y. Unraveling the mechanical properties of composite silk threads spun by cribellate orb-weaving spiders. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 16, p. 3131–3140, 2006.
- BLOCK, H. *et al.* Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. **Methods in enzymology**, v. 463, p. 439–473, 2009a.
- BRESCOVIT, A. D. *et al.* Aracnídeos da Estação Ecológica Juréia-Itatins: inventário preliminar e história natural. **Estação Ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna**, p. 198–221, 2004.
- CAI, H.; REINISCH, K.; FERRO-NOVICK, S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. **Developmental cell**, v. 12, n. 5, p. 671–682, 2007.
- CHAW, R. C. *et al.* Proteomic evidence for components of spider silk synthesis from black widow silk glands and fibers. **Journal of proteome research**, v. 14, n. 10, p. 4223–4231, 2015.
- CHENG, Q. *et al.* Silk nanofibers as robust and versatile emulsifiers. **ACS applied materials & interfaces**, v. 9, n. 41, p. 35693–35700, 2017.
- CHERKI, R. S. *et al.* Two tarantula venom peptides as potent and differential NaV channels blockers. **Toxicon**, v. 77, p. 58–67, 2014.
- COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 2, p. 43–51, 2009.
- COMSTOCK, J. H. **The spider book**. 4^a ed., London, Cornell University Press, 1975.
- CRANFORD, S. W. *et al.* Nonlinear material behaviour of spider silk yields robust webs. **Nature**, v. 482, n. 7383, p. 72–76, 2012.
- CRANFORD, S. W. *et al.* Nonlinear material behaviour of spider silk yields robust webs. **Nature**, v. 482, n. 7383, p. 72–76, 2012.
- DE LA VEGA, R. C. R. *et al.* Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 12, p. 1507–1519, 2004.
- DERIBE, Y. L.; PAWSON, T.; DIKIC, I. Post-translational modifications in signal integration. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, n. 6, p. 666, 2010.
- DICKO, C.; VOLLRATH, F.; KENNEY, J. M. Spider silk protein refolding is controlled by changing pH. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 704–710, 2004.

- DONG, Z. et al. Comparative proteomics reveal diverse functions and dynamic changes of Bombyx mori silk proteins spun from different development stages. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 11, p. 5213–5222, 2013.
- DOS SANTOS-PINTO, J. R. A. et al. A proteotranscriptomic study of silk-producing glands from the orb-weaving spiders. **Molecular omics**, v. 15, n. 4, p. 256–270, 2019.
- DOS SANTOS-PINTO, J. R. A. et al. Silkomics: insight into the silk spinning process of spiders. **Journal of proteome research**, v. 15, n. 4, p. 1179–1193, 2016.
- DOS SANTOS-PINTO, J. R. A. et al. Structural model for the spider silk protein spidroin-1. **Journal of proteome research**, v. 14, n. 9, p. 3859–3870, 2015.
- 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**, v. 105, p. 174–185, 2014.
- DOS SANTOS-PINTO, J.R.A. Proteotranscriptomic view on the role of spider silk glands during the silk spinning process. **Relatório Científico FAPESP proc. 2016/10430-0**, 2017.
- EISOLDT, L.; SMITH, A.; SCHEIBEL, T. Decoding the secrets of spider silk. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 80–86, 2011.
- EISOLDT, L.; SMITH, A.; SCHEIBEL, T. Decoding the secrets of spider silk. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 80–86, 2011.
- ESTEVEZ, F. G. et al. Revealing the Venomous Secrets of the Spider's Web. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 8, p. 3044–3059, 2020.
- FIBER ENGINEERS, MEET THY MASTER. On-line, disponível em http://www.floridanature.org/articles/fiber_engineers.asp, 1996.
- FÍLA, J.; HONYIS, D. Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. **Amino acids**, v. 43, n. 3, p. 1025–1047, 2012.
- FLORCZAK, A.; MACKIEWICZ, A.; DAMS-KOZŁOWSKA, H. Functionalized spider silk spheres as drug carriers for targeted cancer therapy. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 8, p. 2971–2981, 2014.
- FUZITA, F. J. et al. High throughput techniques to reveal the molecular physiology and evolution of digestion in spiders. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2016.
- GARB, J. E.; HAYASHI, C. Y. Molecular evolution of α -latrotoxin, the exceptionally potent vertebrate neurotoxin in black widow spider venom. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 5, p. 999–1014, 2013.

- GOSLINE, J. M.; DEMONT, M. E.; DENNY, M. W. The structure and properties of spider silk. **Endeavour**, v. 10, n. 1, p. 37–43, 1986.
- GUPTA, R. S. et al. **Unusual cellular disposition of the mitochondrial molecular chaperones Hsp60, Hsp70 and Hsp10**. Novartis Foundation Symposium. **Anais...**Wiley Online Library, 2008
- HAAS, W. et al. Optimization and use of peptide mass measurement accuracy in shotgun proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 7, p. 1326–1337, 2006a.
- HAAS, W. et al. Optimization and use of peptide mass measurement accuracy in shotgun proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 7, p. 1326–1337, 2006b.
- HAGN, F. *et al.* pH-Dependent Dimerization and Salt-Dependent Stabilization of the N-terminal Domain of Spider Dragline Silk—Implications for Fiber Formation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 1, p. 310–313, 2011.
- HARDY, J. G.; RÖMER, L. M.; SCHEIBEL, T. R. Polymeric materials based on silk proteins. **Polymer**, v. 49, n. 20, p. 4309–4327, 2008.
- HARDY, J. G.; SCHEIBEL, T. R. Composite materials based on silk proteins. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 9, p. 1093–1115, 2010.
- HAYASHI, C. Y.; SHIPLEY, N. H.; LEWIS, R. V. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. **International journal of biological macromolecules**, v. 24, n. 2–3, p. 271–275, 1999.
- HE, R. et al. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. **Acta pharmacologica sinica**, v. 35, n. 10, p. 1227–1246, 2014.
- HEIM, M.; KEERL, D.; SCHEIBEL, T. Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 20, p. 3584–3596, 2009.
- HELENIUS, A.; AEBI, M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. **Annual review of biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 1019–1049, 2004a.
- HELENIUS, A.; AEBI, M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. **Annual review of biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 1019–1049, 2004b.
- HELMER, M. Web of intrigue. **Nature**, 2001.
- HINMAN, M. B.; JONES, J. A.; LEWIS, R. V. Synthetic spider silk: a modular fiber. **Trends in biotechnology**, v. 18, n. 9, p. 374–379, 2000.

- HOU, Y. et al. Studies on middle and posterior silk glands of silkworm (*Bombyx mori*) using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 5, p. 486–496, 2007.
- HSU, C. et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 2, p. 223–232, 2010.
- HUEMMERICH, D. et al. Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. **Biochemistry**, v. 43, n. 42, p. 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.
- HUMENIK, M.; SMITH, A. M.; SCHEIBEL, T. Recombinant spider silks—biopolymers with potential for future applications. **Polymers**, v. 3, n. 1, p. 640–661, 2011.
- HUNTER, T. Signaling—2000 and beyond. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 113–127, 2000.
- IKONOMOPOULOU, M. P. et al. Isolation of two insecticidal toxins from venom of the Australian theraphosid spider *Coremiocnemis tropix*. **Toxicon**, v. 123, p. 62–70, 2016a.
- JENKINS, J. E. et al. Solid-state NMR evidence for elastin-like β -turn structure in spider dragline silk. **Chemical communications**, v. 46, n. 36, p. 6714–6716, 2010.
- JIN, L. et al. An insecticidal toxin from *Nephila clavata* spider venom. **Amino acids**, v. 49, n. 7, p. 1237–1245, 2017.
- JOHNSON, H.; EYERS, C. E. Analysis of post-translational modifications by LC-MS/MS. **LC-MS/MS in Proteomics**, p. 93–108, 2010.
- JOHNSTONE, R. M. et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 19, p. 9412–9420, 1987.
- KALIA, J. et al. From foe to friend: using animal toxins to investigate ion channel function. **Journal of molecular biology**, v. 427, n. 1, p. 158–175, 2015.
- KAPLAN, D. L. et al. Biosynthesis and processing of silk proteins. **Mrs Bulletin**, v. 17, n. 10, p. 41–47, 1992.
- KING, G. F.; HARDY, M. C. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 475–496, 2013.

- KNIGHT, D. P.; KNIGHT, M. M.; VOLLRATH, F. Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, n. 3, p. 205–210, 2000.
- KNIGHT, D. P.; VOLLRATH, F. Comparison of the spinning of selachian egg case ply sheets and orb web spider dragline filaments. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 2, p. 323–334, 2001.
- KUNTNER, M. et al. A molecular phylogeny of nephilid spiders: evolutionary history of a model lineage. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 3, p. 961–979, 2013.
- LAMMEL, A. et al. Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. **Biomaterials**, v. 32, n. 8, p. 2233–2240, 2011.
- LARSEN, M. R. et al. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry: Mass Spectrometry For Proteomics Analysis. **Biotechniques**, v. 40, n. 6, p. 790–798, 2006.
- LEFÈVRE, T. et al. Diversity of molecular transformations involved in the formation of spider silks. **Journal of molecular biology**, v. 405, n. 1, p. 238–253, 2011.
- LEFÈVRE, T.; ROUSSEAU, M.-E.; PÉZOLET, M. Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy. **Biophysical journal**, v. 92, n. 8, p. 2885–2895, 2007.
- LEITNER, A. et al. Probing the phosphoproteome of HeLa cells using nanocast metal oxide microspheres for phosphopeptide enrichment. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 7, p. 2726–2733, 2010.
- LEWIS, R. V. Spider silk: ancient ideas for new biomaterials. **Chemical reviews**, v. 106, n. 9, p. 3762–3774, 2006.
- LI, D. et al. Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. **FEBS letters**, v. 555, n. 3, p. 616–622, 2003.
- MA, L. et al. Novel venom-derived inhibitors of the human EAG channel, a putative antiepileptic drug target. **Biochemical pharmacology**, v. 158, p. 60–72, 2018.
- MANN, M.; JENSEN, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 255–261, 2003.
- MANZOLI-PALMA, M. F.; GOBBI, N.; PALMA, M. S. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 174–185, 2003.

MANZOLI-PALMA, M. F.; GOBBI, N.; PALMA, M. S. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 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**, v. 2, n. 4, p. 525–534, 2005.

MATAVEL, A. *et al.* Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2-6. **FEBS letters**, v. 523, n. 1–3, p. 219–223, 2002a.

MATAVEL, A. *et al.* Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2-6. **FEBS letters**, v. 523, n. 1–3, p. 219–223, 2002b.

MICHAL, C. A. *et al.* Presence of phosphorus in *Nephila clavipes* dragline silk. **Biophysical journal**, v. 70, n. 1, p. 489–493, 1996.

MOISENOVICH, M. M. *et al.* In vitro and in vivo biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 96, n. 1, p. 125–131, 2011.

MOISENOVICH, M. M. *et al.* Tissue regeneration in vivo within recombinant spidroin 1 scaffolds. **Biomaterials**, v. 33, n. 15, p. 3887–3898, 2012.

MORELLE, W.; MICHALSKI, J.-C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 2, n. 7, p. 1585, 2007.

NEEL, B. G.; TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. **Current opinion in cell biology**, v. 9, n. 2, p. 193–204, 1997.

NI, M. *et al.* Modified filter-aided sample preparation (FASP) method increases peptide and protein identifications for shotgun proteomics. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 31, n. 2, p. 171–178, 2017.

NO, O. T. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section**, v. 2, 1992.

NUMATA, K. How to define and study structural proteins as biopolymer materials. **Polymer Journal**, v. 52, n. 9, p. 1043–1056, 2020

PARADELA, A.; ALBAR, J. P. Advances in the analysis of protein phosphorylation. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 5, p. 1809–1818, 2008.

- PARCELLIER, A. et al. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 304, n. 3, p. 505–512, 2003.
- PATHAN, M. et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. **Proteomics**, v. 15, n. 15, p. 2597–2601, 2015.
- PATHAN, M. et al. Ryan, MT, Agbinya, JI, Mariadason, JM, Burgess, AW, Mathivanan, S. **Proteomics**, v. 9, n. 2015, p. 15, 8AD.
- PLATNICK, N. I. The world spider catalog, version 8.5. American Museum of Natural History, New York. <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>, 2008.
- POUCHKINA, N. N.; STANCHEV, B. S.; MCQUEEN-MASON, S. J. From EST sequence to spider silk spinning: identification and molecular characterisation of *Nephila senegalensis* major ampullate gland peroxidase NsPox. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 2, p. 229–238, 2003.
- RÁDIS-BAPTISTA, G.; KONNO, K. **Arthropod Venom Components and Their Potential Usage** Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 2020.
- RAJENDRAN, M. et al. Imaging adenosine triphosphate (ATP). **The Biological Bulletin**, v. 231, n. 1, p. 73–84, 2016.
- RAO, S. K. et al. Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 20471–20479, 2004.
- 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**, v. 70, p. 123–134, 2013.
- RESENDE, V. M. F. et al. Proteome and phosphoproteome of Africanized and European honeybee venoms. **Proteomics**, v. 13, n. 17, p. 2638–2648, 2013.
- RIBET, D.; COSSART, P. Post-translational modifications in host cells during bacterial infection. **FEBS letters**, v. 584, n. 13, p. 2748–2758, 2010.
- RISING, A. et al. Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure–function relationships and biomedical applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 2, p. 169–184, 2011.
- RISING, A. et al. Spider silk proteins–mechanical property and gene sequence. **Zoological science**, v. 22, n. 3, p. 273–281, 2005.

- ROEPSTORFF, P. Mass spectrometry based proteomics, background, status and future needs. **Protein & cell**, v. 3, n. 9, p. 641–647, 2012.
- RÖMER, L.; SCHEIBEL, T. The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high performance fiber. **Prion**, v. 2, n. 4, p. 154–161, 2008.
- ROSKOSKI JR, R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. **Pharmacological research**, v. 66, n. 2, p. 105–143, 2012.
- ROUSSEAU, M.-E.; LEFÈVRE, T.; PÉZOLET, M. Conformation and orientation of proteins in various types of silk fibers produced by *Nephila clavipes* spiders. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 10, p. 2945–2953, 2009.
- SALLES, H. C. et al. The Venomous Secrets of the Web Droplets from the Viscid Spiral of the Orb-Weaver Spider *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnatidae). **Chemistry & biodiversity**, v. 3, n. 7, p. 727–741, 2006.
- SAVINA, A. et al. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. **Traffic**, v. 6, n. 2, p. 131–143, 2005.
- SCHEIBEL, T. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. **Microbial cell factories**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2004.
- SCHELLER, J. et al. Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. **Transgenic research**, v. 13, n. 1, p. 51–57, 2004.
- SCHMIDT, A.; FORNE, I.; IMHOF, A. Bioinformatic analysis of proteomics data. **BMC systems biology**, v. 8, n. 2, p. 1–7, 2014a.
- SCHMIDT, A.; FORNE, I.; IMHOF, A. Bioinformatic analysis of proteomics data. **BMC systems biology**, v. 8, n. 2, p. 1–7, 2014b.
- SCHULZ, S. Composition of the silk lipids of the spider *Nephila clavipes*. **Lipids**, v. 36, n. 6, p. 637–647, 2001.
- SLOTTA, U. et al. Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison. **Macromolecular bioscience**, v. 7, n. 2, p. 183–188, 2007.
- SLOTTA, U. et al. Synthetic spider silk proteins and threads. **Chemical Engineering Progress**, v. 108, n. 5, p. 43–49, 2012a.
- SLOTTA, U. et al. Synthetic spider silk proteins and threads. **Chemical Engineering Progress**, v. 108, n. 5, p. 43–49, 2012b.
- SOLTYS, B. J.; GUPTA, R. S. Mitochondrial proteins at unexpected cellular locations: export of proteins from mitochondria from an evolutionary perspective. **International review of cytology**, v. 194, p. 133–196, 1999a.

- SOLTYS, B. J.; GUPTA, R. S. Mitochondrial-matrix proteins at unexpected locations: are they exported? **Trends in biochemical sciences**, v. 24, n. 5, p. 174–177, 1999b.
- SPIESS, K.; LAMMEL, A.; SCHEIBEL, T. Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. **Macromolecular bioscience**, v. 10, n. 9, p. 998–1007, 2010.
- SPONNER, A. et al. Characterization of the protein components of Nephila clavipes dragline silk. **Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 4727–4736, 2005.
- SPONNER, A. et al. Composition and hierarchical organisation of a spider silk. **PloS one**, v. 2, n. 10, p. e998, 2007.
- STEINBERG, T. H. et al. Rapid and simple single nanogram detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots. **PROTEOMICS: International Edition**, v. 1, n. 7, p. 841–855, 2001a.
- STEINBERG, T. H. et al. Rapid and simple single nanogram detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots. **PROTEOMICS: International Edition**, v. 1, n. 7, p. 841–855, 2001b.
- SUDERMAN, R. J. et al. Model reactions for insect cuticle sclerotization: cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 4, p. 353–365, 2006.
- TEAM, R. C. R: A language and environment for statistical computing. 2013.
- THEIN, M. C. et al. Combined extracellular matrix cross-linking activity of the peroxidase MLT-7 and the dual oxidase BLI-3 is critical for post-embryonic viability in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 26, p. 17549–17563, 2009.
- TEIA DE ARANHA PODE SER MATÉRIA PRIMA PARA A INDÚSTRIA. **Revista do Ministério da Ciência e Tecnologia**. On-line, disponível em www.mct.gov.br/comunicacao/textos/default.asp, 2002.
- VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern applied statistics (Fourth S., editor)** New YorkSpringer, , 2002.
- VEPARI, C.; KAPLAN, D. L. Silk as a biomaterial. **Progress in polymer science**, v. 32, n. 8–9, p. 991–1007, 2007.
- VESTAL, M. L. The future of biological mass spectrometry. **Journal of the American Society for mass Spectrometry**, v. 22, n. 6, p. 953–959, 2011.

- VOLLRATH, F. et al. Local tolerance to spider silks and protein polymers in vivo. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 16, n. 4, p. 229–234, 2002.
- VOLLRATH, F. Spider webs and silks. **Scientific American**, v. 266, n. 3, p. 70–77, 1992.
- VOLLRATH, F. Strength and structure of spiders' silks. **Reviews in Molecular Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 67–83, 2000.
- VOLLRATH, F.; KNIGHT, D. P. Liquid crystalline spinning of spider silk. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 541–548, 2001.
- VOLLRATH, F.; KNIGHT, D. P. Structure and function of the silk production pathway in the spider *Nephila edulis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, n. 2–3, p. 243–249, 1999a.
- VOLLRATH, F.; KNIGHT, D. P. Structure and function of the silk production pathway in the spider *Nephila edulis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, n. 2–3, p. 243–249, 1999b.
- VOLSI, E. C. F. R. et al. Multiple bradykinin-related peptides from the capture web of the spider *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnatidae). **peptides**, v. 27, n. 4, p. 690–697, 2006.
- WALSH, C. T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; GATTO JR, G. J. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 45, p. 7342–7372, 2005.
- WANG, X.; WANG, G. Insights into antimicrobial peptides from spiders and scorpions. **Protein and peptide letters**, v. 23, n. 8, p. 707–721, 2016.
- WINDLEY, M. J. et al. Spider-venom peptides as bioinsecticides. **Toxins**, v. 4, n. 3, p. 191–227, 2012.
- WINKLER, S.; WILSON, D.; KAPLAN, D. L. Controlling β -sheet assembly in genetically engineered silk by enzymatic phosphorylation/dephosphorylation. **Biochemistry**, v. 39, n. 41, p. 12739–12746, 2000.
- YAN, L.; ADAMS, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. **Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 4, p. 2059–2066, 1998.
- YANG, M.; ASAKURA, T. Design, expression and solid-state NMR characterization of silk-like materials constructed from sequences of spider silk, *Samia cynthia ricini* and *Bombyx mori* silk fibroins. **Journal of biochemistry**, v. 137, n. 6, p. 721–729, 2005.

ZHANG, S. et al. A novel property of spider silk: chemical defence against ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1734, p. 1824–1830, 2012.

ZHANG, Z.-Y. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 42, n. 1, p. 209–234, 2002.