

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE VIANA BEDNASKI

**CARACTERIZAÇÃO CELULAR DE HEMÓCITOS E ANÁLISE PROTEÔMICA  
E LIPIDÔMICA DA HEMOLINFA DE ARANHA-MARROM (*Loxosceles  
intermedia*)**

CURITIBA, PR

2017

ALINE VIANA BEDNASKI

**CARACTERIZAÇÃO CELULAR DE HEMÓCITOS E ANÁLISE PROTEÔMICA  
E LIPIDÔMICA DA HEMOLINFA DE ARANHA-MARROM (*Loxosceles  
intermedia*)**

Tese apresentada como requisito à obtenção do grau de doutor em Biologia Celular e Molecular, no curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Senff-Ribeiro  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Olga Meiri Chaim  
Coorientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA, PR

2017



**Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular**

Departamento de Biologia Celular  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná



**PARECER**

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

**Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro**  
Orientadora e presidente da banca  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

APROVADA

**Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior**  
Instituto Butantan

APROVADA

**Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa**  
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

Aprovada

**Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo**  
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UCPG

Aprovada

**Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Aprovada

E tendo como suplente,

**Profa. Dra. Lia Sumie Nakao**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

**Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a candidata **Aline Viana Bednaski**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Caracterização celular de hemócitos e análise proteômica e lipídica da hemolinfa de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)", são de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regulamento Interno deste Programa de Pós-Graduação.



Curitiba, 17 de Fevereiro de 2017

**Prof.ª Dra. Andrea Senff Ribeiro**  
Coord. do Programa de Pós-Graduação  
Em Biologia Celular e Molecular

Centro Politécnico  
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas Mar./UFPR 200261  
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil  
Fone: 55.41.3361-1676

Dedico esse trabalho a minha família, minha  
mãe Nilda Gomes Viana Bednaski, meu pai  
Francisco Pereira Bednaski e meu irmão  
Adriano Viana Bednaski.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela saúde.

Agradeço do fundo do meu coração à toda minha família que com paciência e carinho me orientaram nesse custoso caminho da vida. Mãe, pai e mano com vocês pude aprender mais do que caráter e responsabilidade, aprendi sobre respeito, medo, crítica, administração financeira, boa alimentação, política e muitas outras coisas valiosas. As palavras nunca serão suficientes para expressar a gratidão e respeito que tenho por vocês. Sou o que sou hoje por causa dos valores que vocês me transmitiram e pelo apoio de vocês nos estudos. Vocês são meus amores.

Agradeço à minha avó Ircelina Gomes Viana (*in memoriam*) pela didicação com que me criou. Guardarei seus ensinamentos até o final da vida. Sinto muitas saudades.

Agradeço à minha madrinha Juraci Teixeira que sempre me recebeu com grande alegria e saudade. Sinto muito sua falta.

Agradeço à minha tia Eva Pereira Bednasky e a minha prima Karime Agne por me receberem calorosamente em Curitiba, me ensinaram sobre a cidade e me fizeram companhia nos finais de semana.

Agradeço à todos da minha família pelo apoio e orações, meus tios (a): Edinho Viana, Carla Viana e Zofia Bednasky, meus primos (a): Jonas Pesente, Ronaldo Pesente, Tathiana Viana, Patrícia Viana, Renata Terixeira, José Roberto Teixeira Junior e minhas afilhadas: Marina Teixeira e Maitê Teixeira. Amo todos vocês.

Agradeço à minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Andrea Senff-Ribeiro, pela confiança, pela oportunidade de ser sua orientada, por ter me deixado livre na escolha do tema da tese e por ter estado ao meu lado na construção do conhecimento científico. Aprendi contigo mais do que ciência, aprendi sobre tolerância, perseverança e planejamento. Obrigada por me entender e me respeitar nos momentos delicados.

Agradeço à minha coorientadora Dr<sup>a</sup>. Olga Meiri Chaim pela ideia inicial do projeto, pelas suas críticas construtivas e pelo incentivo em aprender o inglês. Obrigada pela paciência nos momentos de dúvidas científicas.

Agradeço ao Professor Dr. Silvio Sanches Veiga pela dedicação em gerenciar o LME, pela oportunidade de ingressar no seu grupo de pesquisa e pela preocupação com o futuro dos alunos.

Agradeço à minha amiga Marianna Boia Ferreira pelos anos de amizade, pelo apoio emocional e pelos dias felizes que compartilhistes comigo, espero estar sempre presente na sua vida. Você é muito importante para mim.

Agradeço o meu amigo Fernando Hitomi Matsubara “Zé” pelas críticas duras e sinceras, pelas correções de textos científicos, pelos almoços de domingo/RU e pela companhia diária. Admiro-te muito.

Agradeço à minha amiga Hanna Câmara da Justa mais conhecida como “Jéssica” pelas conversas sinceras no ônibus, pelo companheirismo e por me fazer acreditar na humanidade.

Agradeço à minha amiga Mariana Porsani pela companhia nos forrós, por sempre me alegrar, ouvir e compreender meus momentos difíceis. Agradeço também por me ajudar nos ensaios antimicrobianos.

Agradeço ao Gabriel Otto Meissner pelos momentos de “trogagem” compartilhada e pela companhia diária. Aprendi um novo jeito de encarar vida contigo e ser uma pessoa melhor.

Agradeço à Vanessa Ribeiro Heidemann e à Antonielle Beatriz Baldissera por compartilhar as alegrias, as dúvidas e as angústias e pela companhia diária. Vocês tornaram meus dias mais felizes.

Agradeço ao Adriano Marcelo Morgon, meu companheiro de caminhada científica, pelo conhecimento compartilhado. Foi muito bom dividir o aprendizado contigo. Aprendemos juntos sobre os direitos e deveres na pós-graduação, tarefa árdua, mas recompensadora.

Agradeço à Alana Beatriz Coelho Basilio por me ajudar com as coletas de aranha marrom, por dividir sua alegria de viver e pelo seu entusiasmo com a pesquisa, minhas esperanças eram sempre renovadas quando conversávamos. Desejo à você muito sucesso.

Agradeço à Valéria Pereira Ferrer e Luiza Helena Gremski pela calma e tranquilidade com que vocês ensinam e pelo convívio, a paixão pela ciência que vocês transmitem é animadora.

Agradeço à Larissa Vuitika “Larissão” pelo apoio e carisma diário, sua emoção em falar da cultura brasileira é cativante. Aprendi muito sobre respeito contigo e por isso agradeço.

Agradeço à Salete Maria Clivati por me orientar no autoconhecimento e por sempre me cativar com pensamentos positivos.

Agradeço aos colegas do LME pelo convívio e colaboração de todos: Elidiana de Bona, Greicy Tonet, Bruno Cesar Antunes, Paula Deboni, Priscila Feranda Vieira, Zelinda Schemazssen, Thaís Pereira da Silva, Dilza Trevisan Silva, Eduardo Mendonça, Henrique Urbanski, Fernando Jacomini, Amanda Savariego, Thiago Beltrami, Thiago Lopes de Mari e Alessandra Hamasaki. Agradeço especialmente aqueles que sempre me ajudaram nas coletas de aranha.

Agradeço aos amigos e colegas: Gabriel Leão, Yvanna Salgado, Gregori Schneider, Saulo Avis, Ana Paula Machado, Luis Paulo S. Alves, Elisa Jussen Borges e Fábio Gaio Chimentão, que de alguma forma ajudaram na realização desse trabalho ou no crescimento pessoal durante esse processo.

Agradeço à professora Dr<sup>a</sup>. Lucélia Donatti pelo auxílio na microscopia eletrônica.

Agradeço ao pesquisador Dr. Paulo Costa Carvalho pela colaboração no estudo proteômico da hemolinfa e do veneno.

Agradeço à professora Dr<sup>a</sup>. Ida Chapaval Pimentel do departamento de microbiologia da UFPR, por nos auxiliar e colaborar nos ensaios antimicrobianos.

Agradeço à dedicação da Priscila Hiraiwa e da Dr<sup>a</sup>. Alessandra Aguiar em me ajudar na citometria de fluxo.

Agradeço à Dr<sup>a</sup>. Katya Naliwaiko e à técnica Maria da Graça Teixeira de Toledo por me ensinar e ajudar com a cromatografia (HPLC).

Agradeço à Marlene Camargo secretária do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular e à Mirian Maciel secretária do departamento de Biologia Celular.

Ao querido porteiro do Setor de Ciências Biológicas Luiz Ferraz “seu Luiz” que sempre nos recepcionar com um saudoso bom dia.

Agradeço à coordenação e ao colegiado e do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Agradeço à CAPES, Fundação Araucária, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

A todos **MUITO OBRIGADA!**

*“Science never solves a problem without creating ten more.”*  
George Bernard Shaw

## RESUMO

As aranhas do gênero *Loxosceles* (aranhas-marrons) são responsáveis pela maioria dos acidentes envolvendo animais peçonhentos em Curitiba e região metropolitana, sendo consideradas um problema de saúde pública. O veneno dessas aranhas tem sido amplamente estudado e diversos grupos de pesquisa têm investido na caracterização de suas toxinas. Entretanto, a literatura referente à hemolinfa dessas aranhas é bastante restrita: o único artigo existente foi publicado pelo nosso grupo em 2015. Baseado na premissa de que o conhecimento dos conteúdos celular, lipídico e protéico podem fornecer informações importantes sobre a toxilogia e sobre moléculas bioativas, o objetivo deste trabalho foi a caracterização bioquímica e celular da hemolinfa de *L. intermedia*, bem como analisar potenciais atividades biológicas da hemolinfa e suas moléculas. O perfil proteico da hemolinfa de *L. intermedia* em eletroforese (SDS-PAGE) uni e bidimensional revelou a presença de proteínas e peptídeos com massas variando de 20 a 200 kDa. As proteínas da hemolinfa apresentaram os resíduos de glicosilação: galactose  $\beta$  (1,4) N-acetilglucosamina e alta manose. Por meio de espectrometria de massas foi verificado que os lipídios predominantes na hemolinfa são a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina. Quanto à fração celular da hemolinfa, quatro tipos de hemócitos foram identificados: os pró-hemócitos, os plasmatócitos, os adipohemócitos e os granulócitos. A atividade esfingomielinásica da toxina recombinante fosfolipase-D de *L. intermedia* (LiRecDT1) foi reduzida em 70% na presença da hemolinfa, contudo não foi encontrado um inibidor específico para essa enzima, sugerindo que essa redução tenha sido decorrente da dificuldade da toxina em encontrar seu substrato preferencial. O ensaio de imunodeteção indicou na hemolinfa a presença de uma proteína de aproximadamente 36 kDa com epítipo similar ao da toxina LiRecDT1, mas a hemolinfa não apresentou toxicidade para camundongos nas concentrações testadas. O cultivo primário dos hemócitos foi realizado em meio Sf-900-III SFM contendo 250  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina e 10% de soro (SFB). Verificou-se que a incubação dos hemócitos com veneno de *L. intermedia* e com a toxina loxoscélica recombinante LiRecDT1 não alterou as características morfológicas das células em microscopia óptica, sugerindo ausência de processos de apoptose ou necrose. Dificuldades metodológicas não permitiram a caracterização dos hemócitos por microscopia eletrônica de transmissão. O estudo de proteômica (*shotgun*) não identificou inibidores de proteases ou de outras enzimas presentes no veneno; e grande parte das identificações foram relacionadas a proteínas estruturais e à hemocianina. Os experimentos de citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente Mitotracker permitiram a separação eficiente das populações de pró-hemócitos e plasmatócitos, contudo havia granulócitos nas duas amostras isoladas. Os ensaios de atividade antimicrobiana de peptídeos presentes na hemolinfa isolados por HPLC não evidenciou a inibição do crescimento dos microrganismos *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A hemolinfa é uma amostra biológica muito rica que deve continuar a ser investigada, contudo as dificuldades de estudá-la estão relacionadas com o baixo rendimento da coleta da amostra e a grande complexidade bioquímica do seu conteúdo (celular e proteica).

**Palavras-chaves:** hemolinfa, *L. intermedia*, hemócitos, antimicrobiano, cultivo primário, inibidores, citometria.

## ABSTRACT

*Loxosceles* genus spiders (Brown spiders) are responsible for most of the accidents involving venomous animals in Curitiba and metropolitan region and for this reason they are considered a public health problem. The venom from these spiders has been widely studied and several research groups have been focused in the characterization of the toxins. However, the literature on the hemolymph from these spiders is rather restricted: the only article was published by our group in 2015. Based on the premise that knowledge of the cellular, lipidic and proteic contents can provide important information about toxinology and bioactive molecules, the aim of this work was biochemical and cellular characterization from *L. intermedia* hemolymph as well as to analyze potential biological activities present in this hemolymph and its molecules. The protein from hemolymph of *L. intermedia* hemolymph in one and two-dimensional SDS-PAGE revealed the presence of proteins and peptides with molecular mass varying from 20 to 200 kDa. The protein from hemolymph presented glycosylation: galactose  $\beta$  (1,4) N-acetylglucosamine and high mannose. By means of mass spectrometry analysis was verified the lipidic predominance in the hemolymph are phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. In relation to the hemolymph cellular fraction four types of hemocytes were identified: pro-hemocytes, plasmatocytes, adipohemocytes and granulocytes. The sphingomyelinase activity of *L. intermedia* recombinase phospholipase-D (LiRecDT1) was decreased 70% In the presence of hemolymph, however, no specific inhibitor to this enzyme was found, suggesting that this reduction was related to difficulty of the toxin to find your preferential substrate. The immunodetection assay indicated there are in the hemolymph a protein with nearly 36 kDa with epitope resembling LiRecDT1, but this protein showed no toxicity to mice at the concentrations tested. The primary culture of hemocytes was done in Sf-900-III SFM medium plus 250  $\mu$ g /ml gentamycin and 10% FBS. It was found that the incubation venom from *L. intermedia* and toxin LiRecDT1 with hemocytes did not present morphological alterations in these cells analyzed by optical microscopy, indicated no apoptosis or necrosis. Methodological difficulties did not allow the hemocytes to be characterization by transmission electron microscopy. In proteomic (shotgun) analysis no protease inhibitors or other enzymes present in the venom; and the most of identification were related to structural proteins and hemocyanin. The experiments of flow cytometry with MitoTracker probe labeling resulted in the efficient isolation of prohemocytes and plasmatocytes, however there was granulocytes in both of samples isolated. The antimicrobial activity assays of peptides present in hemolymph isolated by HPLC did not show isolated activity against *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Hemolymph is a very rich biological sample that needs to be investigated more thoroughly, but the difficulties of studying it are related to the low amount of sample (cellular and protein).

**Key-words:** Hemolymph, *L. intermedia*, hemocytes, antimicrobial, primary culture, inhibitors, cytometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aranha-marrom, <i>Loxosceles intermedia</i> .....	24
Figura 2. Veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> e seu perfil proteico.....	25
Figura 3. Lesão cutânea decorrente do envenenamento loxoscélico.....	27
Figura 4. Desenho esquemático da anatomia interna das aranhas.....	29
Figura 5. Esquema dos componentes do sistema imunológico dos invertebrados.....	33
Figura 6. Esquema do sistema imunológico das aranhas.....	34
Figura 7. Esquema da cascata imunológica de insetos.....	35
Figura 8. Esquema do modo de ação dos AMPs.....	39
Figura 9. <i>Western blotting</i> das frações da hemolinfa de <i>L. intermedia</i> com anticorpo monoclonal que reconhece a LiRecDT1.....	70
Figura 10. Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) dos hemócitos em cultivo primário frente à incubação com veneno de <i>L. intermedia</i> e com a toxina recombinante LiRecDT1-GFP.....	74
Figura 11. Imagens com zoom digital 4x da microscopia DIC dos hemócitos em cultivo primário frente à incubação com veneno de <i>L. intermedia</i> e LiRecDT1-GFP.....	75
Figura 12. Microscopia Eletrônica de Transmissão de hemócitos da hemolinfa de <i>L. intermedia</i> .....	76
Figura 13. Citometria de fluxo de hemócitos marcados com a lectina WGA conjugada Alexa Fluor®594.....	78
Figura 14. Citometria de fluxo de hemócitos marcados com LisoTracker.....	79
Figura 15. Citometria de fluxo de hemócitos marcados com MitoTracker.....	79
Figura 16. Hemócitos corados com May-Grunwald-Giemsa (MGG) após separação por <i>sorting</i> - células isoladas a partir da maior intensidade de fluorescência pelo MitoTracker.....	80
Figura 17. Hemócitos corados com May-Grunwald-Giemsa (MGG) após separação por <i>sorting</i> , células isoladas a partir da menor intensidade de fluorescência pelo MitoTracker.....	80
Figura 18. Hemócito corado com May-Grunwald-Giemsa (MGG) após separação por <i>sorting</i> , célula isolada a partir da maior intensidade do corante MitoTracker.....	80

Figura 19. Purificação por HPLC dos peptídeos de hemolinfa de <i>L. intermedia</i> das amostras: total, <i>pellet</i> e plasma, obtidos após a ligação em coluna C-18 e eluído com 40% de acetonitrila.....	85
Figura 20. Antibiograma dos picos purificados por HPLC da hemolinfa de <i>L. intermedia</i> contra o fungo <i>Candida albicans</i> .....	86
Figura 21. Antibiograma de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> com os peptídeos eluídos da coluna C-18. ....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ensaio de toxicidade. ....	72
Tabela 2. Lista das proteínas identificadas da hemolinfa de <i>L. intermedia</i> com homologia com o banco de dados. ....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila

AMP: *Antimicrobial peptide*

BCIP: 5-bromo-4cloro-3-indoil fosfato

CID: *Collision-induced dissociation*

CIP: Coquetel de Inibidores de Proteases

ETD: *Electron-Transfer Dissociation*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

HCD: *Higher-energy collisional dissociation*

HDL: *High Density Lipoprotein*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

IgG: Imunoglobulina do Tipo G

LDL: *Low Density Lipoprotein*

LiRecDT1: *Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxin*

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MGG: May-Grunwald-Giemsa

MHA: Ágar Müller-Hinton

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TCPT: *Translationaly Controlled Tumour Protein*

TFA: Ácido trifluoroacético

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO .....	19
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. Aranhas-marrons .....	23
2.1.1 Veneno de <i>L. intermedia</i> .....	24
2.2 Hemolinfa .....	27
2.2.1 Hemócitos.....	30
2.2.2 Sistema imunológico.....	32
2.2.3 Lipídios .....	39
3- CAPÍTULO 1 .....	42
4- OBJETIVOS.....	43
5- ARTIGO PUBLICADO.....	44
6- CAPÍTULO 2 .....	57
7- OBJETIVOS.....	57
8- MATERIAL E MÉTODOS.....	58
8.1. Coleta de hemolinfa .....	58
8.1.1. Obtenção da fração celular e fração plasmática.....	58
8.1.2. Dosagem de proteínas.....	59
8.2. Atividade Esfingomielinásica.....	59
8.3. <i>Western Blotting</i> .....	60
8.4. Ensaio de toxicidade .....	61
8.5. Cultivo primário de hemócitos .....	61
8.5.1 Ensaio <i>in vitro</i> do comportamento dos hemócitos frente à incubação com o veneno de <i>L. intermedia</i> e com a toxina recombinante LiRecDT1 ..	62
8.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	62
8.7. Citometria de fluxo .....	63
8.8. Proteômica <i>shotgun</i> .....	64
8.9. Atividade Antimicrobiana.....	66
9- RESULTADOS.....	68
9.1. Atividade Esfingomielinásica.....	68
9.2. Ensaio de imundeteção cruzada ( <i>Western Blotting</i> ).....	69
9.3. Toxicidade.....	71
9.4. Cultivo primário de hemócitos .....	72

9.4.1. Ensaio <i>in vitro</i> do comportamento de hemócitos frente à ação do veneno .....	73
9.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	76
9.6. Citometria de fluxo .....	77
9.7. Proteômica <i>shotgun</i> .....	81
9.8. Atividade Antimicrobiana.....	84
10- DISCUSSÃO .....	88
11- CONCLUSÕES .....	100
12- REFERÊNCIAS.....	102
13- ANEXO 1.....	116
14 - ANEXO 2.....	117
15- ANEXO 3.....	118
16- ANEXO 4 (artigos publicado/ submetido em colaboração) .....	119

## 1- INTRODUÇÃO

Os animais pertencentes ao filo Arthropoda são capazes de habitar os mais diversos ambientes como o terrestre, o aquático e o aéreo, conquistando uma posição de grande sucesso evolutivo. Além disso, os artrópodes apresentam uma complexa diversidade genética e bioquímica que lhes confere grande capacidade de superação às adversidades do meio ambiente. Em termos de número de espécies e importância ecológica, as aranhas são os indivíduos com maior sucesso evolutivo dentro do Subfilo Chelicerata (SANGGAARD *et al.*, 2016). Por isso, investigar os mecanismos que esses animais possuem para se relacionar com o meio ambiente pode gerar novos conhecimentos, como descoberta de novas moléculas e novos *insights* dentro dos diversos ramos da ciência: toxilogia, toxicologia, farmacologia, biologia celular e molecular, entre outras áreas (RICILUCA *et al.*, 2012; VILCINSKAS, 2013; KUHN-NENTWIG *et al.*, 2014; RAHMAN *et al.*, 2017).

As aranhas possuem alta sinantropia, a qual está associada à abundância de alimento, à ausência dos predadores naturais, à diminuição do território natural (selvagem) e ao acúmulo de lixo e sujeira no meio ambiente e áreas urbanas (FISCHER *et al.*, 2011). A abundância de aranhas nas cidades causa prejuízos públicos principalmente em relação à saúde, pois causam envenenamentos que podem incapacitar indivíduos temporariamente, e em casos mais severos, levar a vítima a óbito (SANTOS *et al.*, 2013; STROMDAHL; HICKLING, 2012).

De acordo com o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) foram registrados 4.817 casos de acidentes loxoscélicos no Brasil em 2015, desses 4.202 foram na região sul e 1.280 em Curitiba e região metropolitana (SINAN, 2015). Além do Brasil, as aranhas do gênero *Loxosceles* estão distribuídas geograficamente em todo o planeta, sendo consideradas nativas das Américas e da África (consideradas introduzidas nas demais áreas onde ocorrem espécies do gênero) (GERTSCH, 1967; PLATINICK, 2014). As aranhas-marrons da espécie *Loxosceles intermedia*

são as principais responsáveis pelas notificações reportadas ao SINAN, pois essa espécie de aranha peçonhenta é a mais abundante em Curitiba e região metropolitana, justamente por ter se adaptado bem ao ambiente intradomiciliar (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005; CHRISTOFF *et al.*, 2008; FISCHER *et al.* 2014).

Os sintomas mais preocupantes decorrentes do envenenamento são a demonecrose no local da picada e a lesão renal, ambas causadas principalmente pelo efeito das enzimas fosfolipases-D. Essa família de toxinas é a mais bem caracterizada do veneno da aranha-marrom. Isoladamente essa classe de toxinas é capaz de reproduzir os eventos de dermonecrose, hemólise, agregação plaquetária, lesão renal, aumento da permeabilidade vascular e resposta inflamatória intensa, eventos característicos do quadro clínico do envenenamento (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011, GREMSKI *et al.*, 2014).

Existem diversos estudos sobre o veneno das aranhas-marrons, nos quais várias toxinas já foram caracterizadas e estudadas isoladamente com o auxílio de técnicas de biologia molecular. Dentre as toxinas identificadas, podemos destacar, além das fosfolipases-D, os peptídeos inseticidas (MATSUBARA *et al.*, 2017), hialuronidases (FERRER, *et al.*, 2013), metaloproteases (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2013), serinoproteases (GREMSKI *et al.*, 2010), alérgenos, TCPT (*Translationally Controlled Tumour Protein*) (SADE *et al.*, 2012) e serpinas (APPEL *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011b; GREMSKI *et al.*, 2010).

O foco dos pesquisadores toxinologistas vem sendo o estudo dos venenos dos artrópodes e a hemolinfa desses animais peçonhentos ainda está negligenciada. Nos últimos anos houve um grande número de publicações científicas caracterizando hemolinfas de diversos artrópodes não venenosos, apontando principalmente moléculas bioativas e seus sistemas imunológicos (KUHN-NENTWIG *et al.*, 2011; MAFRA *et al.*, 2012; MAKAROVA *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2016).

As células presentes na hemolinfa dos artrópodes são denominadas de hemócitos, possuem função na imunidade inata, realizam os processos de fagocitose, melanização, opsonização e produção de peptídeos

antimicrobianos (GUPTA, 2009; FUKUZAWA *et al.*, 2008; KUHN-NENTWIG *et al.*, 2011). Os artrópodes são incapazes de desenvolver uma resposta imune adaptativa, como aquela observada nos vertebrados, por isso, os peptídeos produzidos pelos hemócitos devem ser eficientes contra uma gama de patógenos sejam eles fungos, bactérias ou vírus (BAUMANN *et al.*, 2010b; JOAZEIRO *et al.*, 2012; KUHN-NENTWIG, L.; NENTWIG, 2013).

Algumas moléculas biotivas encontradas na hemolinfa dos artrópodes já foram descritas e caracterizadas, dentre elas podemos citar os peptídeos antimicrobianos (AMPs) (LORENZINI *et al.*, 2003a; LORENZINI *et al.*, 2003b; PEREIRA *et al.*, 2007; RICILUCA *et al.*, 2012; MAFRA *et al.*, 2012). Esses peptídeos são liberados na hemolinfa quando há infecção, são catiônicos e por esse motivo se ligam facilmente à membrana dos patógenos, causando vários eventos que levam à lise do microrganismo invasor (RAHMAN *et al.*, 2017).

Além dos AMPs, inibidores de proteases também já foram descritos, eles são encontrados na hemolinfa, pois são importantes reguladores da cascata imunológica. Por exemplo, foram encontrados na hemolinfa da mariposa de *Mythimna unipuncta* dois inibidores de serinoproteases (CHERQUI *et al.*, 2001). Inibidores de metaloproteases são encontrados naturalmente na hemolinfa de *Drosophila melanogaster* (Diptera) e na hemolinfa de *Galleria mellonella* (Lepidoptera), esses inibidores atuam principalmente em metaloproteases de outros microrganismos como forma de defesa (VILCINSKAS; WEDDE, 2006; VILCINSKAS, 2013).

Com o exposto, foi observada a grande relevância em caracterizar a composição da hemolinfa de *L. intermedia*, pois pouco se sabe sobre a hemolinfa das aranhas desse gênero. Além disso, esse estudo poderia gerar descoberta de novas moléculas, novos insumos biotecnológicos ou ainda conhecimentos relevantes que poderiam ser utilizados em estratégias para o controle biológico da aranha. Atualmente, existem poucos métodos eficientes para o combate à grande infestação de aranhas-marrons, sendo comumente citada, como a principal estratégia, a limpeza dos ambientes domésticos, além do uso de inseticidas. Também é importante buscar na hemolinfa inibidores de toxinas e inibidores de proteases, pois se sabe que

inibidores de toxinas são naturalmente encontrados no sangue de serpentes venenosas e os inibidores estão presentes na hemolinfa por atuarem na cascata imunológica, alguns desses inibidores de proteases apresentam reação cruzada e podem ser úteis na medicina. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as células presentes na hemolinfa (os hemócitos), realizar o estudo proteômico e lipidômico das moléculas presentes da hemolinfa de *L. intermedia* e realizar ensaios biológicos para identificação de moléculas bioativas como potenciais produtos biotecnológicos.

O primeiro artigo científico de caracterização da composição celular e bioquímica da hemolinfa de *L. intermedia* foi publicado em 2015, decorrente deste trabalho de tese (BEDNASKI *et al.*, 2015- ANEXO 1) que compõe o capítulo 1. Nesse estudo, foi apresentado o perfil proteico e lipídico da hemolinfa de *L. intermedia*. Além disso, foram identificados quatro tipos de hemócitos: os pró-hemócitos, os adipohemócitos, os granulócitos e os plasmatócitos (BEDNASKI *et al.*, 2015). O capítulo 2 contempla estudos relacionados com a atividade biológica da hemolinfa de *L. intermedia* e sua relação com o veneno da aranha-marrom.

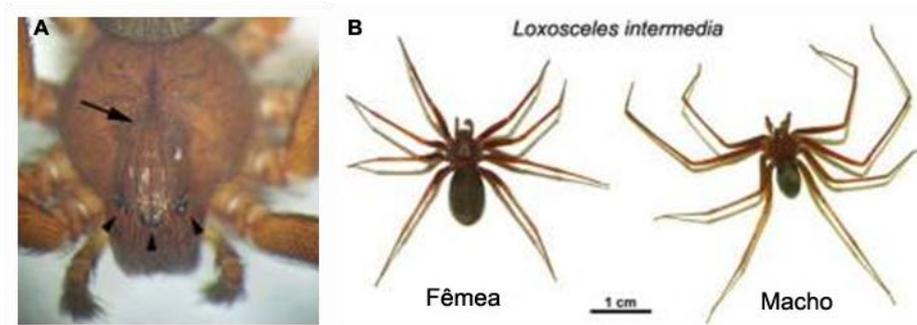
## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Aranhas-marrons

As aranhas do gênero *Loxosceles* são conhecidas como aranhas-marrons, pois possuem uma coloração que varia de marrom claro a marrom escuro. Também são denominadas de aranhas-violino, por possuírem um desenho que lembra tal instrumento musical no cefalotórax (Figura 1A) (CHAIM *et al.*, 2011b; GREMSKI *et al.*, 2014). Possuem dimorfismo sexual, a fêmea apresenta corpo maior e pernas menores em relação ao macho (Figura 1B) (FUTRELL, 1992; CHAIM *et al.*, 2011b). Outra característica do gênero *Loxosceles* é possuir três pares de olhos dispostos em semicírculo no cefalotórax (Figura 1A) (FUTRELL, 1992; APPEL *et al.*, 2008; GREMSKI *et al.*, 2014).

As aranhas-marrons estão incluídas no Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Família Sicariidae e Gênero *Loxosceles sp* (CHAIM *et al.*, 2011b; PLATINICK, 2014). No mundo foram registradas 130 espécies de *Loxosceles*, distribuídas nos seguintes países: Estados Unidos da América, México, Peru, Bolívia, Argentina, Equador, África, Tunísia, Guatemala, Etiópia, Colômbia, Venezuela e Chile (PLATINICK, 2014). No Brasil foram identificadas 15 espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* (PLATINICK, 2014). Há registro de quatro espécies de aranhas-marrons no estado do Paraná: *Loxosceles laeta*, *L. gaucho*, *L. hirsuta* e *L. intermedia*, sendo a última mais abundante em Curitiba e região metropolitana (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005; CHRISTOFF *et al.*, 2008; FISCHER *et al.*, 2014).

As aranhas-marrons possuem hábitos noturnos e são sedentárias, alimentando-se principalmente de pequenos insetos. Seus habitats naturais são principalmente locais escuros e que promovam algum tipo de proteção ao animal. No ambiente intradomiciliar, essas aranhas podem ser encontradas atrás de quadros, sob a mobília, em gavetas e entre as roupas (FUTRELL, 1992; FISCHER; VASCONCELLOS-NETO, 2005; FISCHER *et al.* 2014; CANALS *et al.*, 2015).

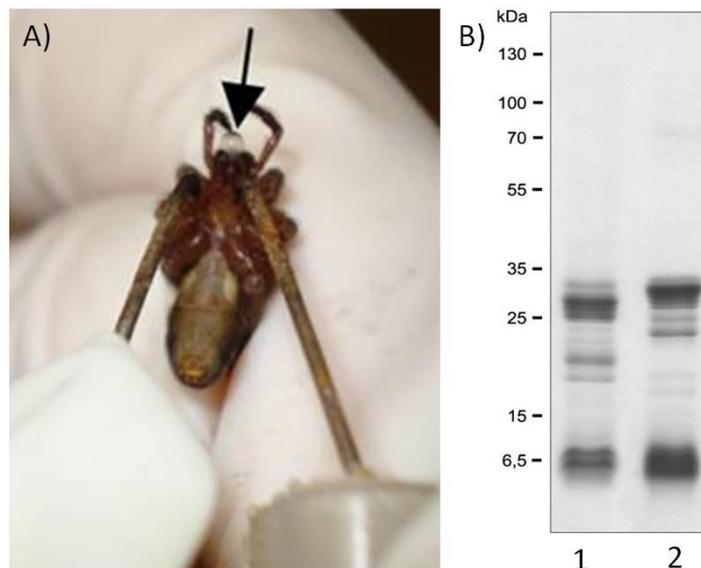


**Figura 1. Aranha-marrom, *Loxosceles intermedia*.** A) Imagem aproximada da região do cefalotórax da *L. intermedia*, a seta indica o desenho que lembra violino e as cabeças de seta a posição dos pares de olhos em semi-circulo; B) Imagem que representa o dimorfismo sexual que há entre as aranhas. Adaptado de CHAIM *et al.*, 2011b.

### 2.1.1 Veneno de *L. intermedia*

Há mais de 20 anos, nosso grupo de pesquisa estuda o veneno e as toxinas da aranha-marrom da espécie *Loxosceles intermedia*. Essa aranha peçonhenta é muito abundante na cidade de Curitiba e região metropolitana, de acordo com o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) em 2015 foram registrados 1.280 casos de envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* na região. Isso torna os acidentes loxoscélicos um problema de saúde pública.

O veneno é uma mistura cristalina de toxinas predominantemente de baixa massa molecular (de 5 a 36 kDa) (Figura 2) (GREMSKI *et al.*, 2010; CHAIM *et al.*, 2011b; GREMSKI *et al.*, 2014). Entre as toxinas já caracterizadas no veneno estão as fosfolipases D (APPEL *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011a; CHAIM *et al.*, 2011b; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011), metaloproteases (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2013), hialuronidades (FERRER *et al.*, 2013), peptídeos inseticidas (MATSUBARA *et al.*, 2017) e TCPT (SADE *et al.*, 2012).



**Figura 2. Veneno de *Loxosceles intermedia* e seu perfil proteico.** A) Coleta de veneno por estimulação da glândula por eletrochoque de 12 V, a seta indica o extravasamento do veneno cristalino (adaptado de CHAIM *et al.*, 2011b); B) Perfil proteico das toxinas do veneno em gel gradiente 8-18% de poliacrilamida (SDS-PAGE), na coluna 1 o perfil não reduzido e na coluna 2 o perfil reduzido, com proteínas predominantemente de baixa massa molecular (adaptado de GREMSKI *et al.*, 2010).

A fosfolipase-D do veneno de *L. intermedia* é uma enzima que hidrolisa preferencialmente esfingomiéline, gerando ceramida-1-fosfato e colina (CHAIM *et al.*, 2011a). A fosfolipase-D também é capaz de hidrolisar lisofosfatidilcolina e nesse caso gera o ácido lisofosfatídico (LPA), ambos os produtos gerados (ceramida-1-fosfato e LPA) são agentes pró-inflamatórios (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2016). Isoladamente essa classe de toxinas é capaz de reproduzir vários sinais clínicos observados após a picada da aranha-marrom (GREMSKI *et al.*, 2014). A fosfolipase-D foi clonada para a expressão heteróloga, o que possibilitou estudos moleculares e bioquímicos da enzima (VUITIKA *et al.*, 2016; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2016). Estudos biológicos mostraram que a toxina recombinante provoca dermonecrose, hemólise, agregação plaquetária, lesão renal, aumento da permeabilidade vascular e resposta inflamatória intensa, assim como ocorre no envenenamento loxoscélico (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; CHAIM *et al.*, 2011a; GREMSKI *et al.*, 2014).

O envenenamento de seres humanos a partir de acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* apresenta um conjunto de sinais e sintomas denominado Loxoscelismo, o qual inclui lesões cutâneas/dermonecroticas

e/ou sintomas sistêmicos (APPEL *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011b). Após a picada, em um período de 12 a 48 horas, há o surgimento de uma área de tecido isquêmico, circundada por um halo vermelho e zonas pálidas, denominados placa marmórea (Figuras 3A e 3B) (FUTRELL, 1992; CABRERIZO *et al.*, 2009). As lesões cutanêneas apresentam espalhamento gravitacional decorrente da ação da fosfolipase-D, das metaloproteases e da hialuronidase (FERRER *et al.*, 2013). A lesão cutânea desenvolvida no acidentado pode permanecer por longos períodos de tempo, com ulcerações cutâneas persistentes. Em alguns casos a cicatriz causada pela dermonecrose é grande e causa desconforto às vítimas, em casos mais graves há necessidade de realizar enxerto de tecido (Figura 3C e 3D) (FUTRELL, 1992; CABRERIZO *et al.*, 2009; HADANNY *et al.*, 2016). O tratamento é basicamente com corticóides e antibióticos, mais recentemente sugere-se também o tratamento com 100% de oxigênio, sob pressão atmosférica aumentada (*Hyperbaric Oxygen Therapy* - HBOT) (BARBARO *et al.*, 2005; HADANNY *et al.*, 2016). O soro antiloxoscélico, produzido pelo CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos), também pode ser administrado com até 48 horas após o envenenamento (PAULI, 2008).



**Figura 3. Lesão cutânea decorrente do envenenamento loxoscélico.** A) Placa marmórea formada após 36 h da picada; B) Aproximação do ferimento onde notam-se regiões com tecido isquêmico e espalhamento gravitacional; C) Período de cicatrização após 8 dias do envenenamento; D) Cicatriz permanente. Adaptado de CABRERIZO *et al.*, 2009.

Alguns casos de loxoscelismo desenvolvem sintomas sistêmicos, que são hemólise e distúrbios renais, os quais podem progredir e levar a vítima a óbito (CHAIM *et al.*, 2006; APPEL, 2008). A insuficiência renal aguda (IRA) é decorrente da necrose tubular renal. Sugere-se que a hemoglobina livre, proveniente das hemácias que sofreram hemólise, precipita-se ao longo dos néfrons e retarda o fluxo tubular renal. A redução na filtração glomerular, ocasionalmente, provoca a falência do órgão e pode levar o acidentado à morte (FUTRELL, 1992; BARBARO; CARDOSO, 2003; CHAIM *et al.*, 2006).

## 2.2 Hemolinfa

A hemolinfa é o líquido que banha a hemocele dos invertebrados, essencialmente reserva água e nutrientes que são disponibilizados em períodos de escassez e possibilita excretas celulares. Além disso, a

hemolinfa carrega e armazena proteínas importantes para o sistema imunológico inato dos artrópodes. É frequentemente incolor ou levemente pigmentada (amarelo, verde e azul) devido ao complexo de íon-proteína presente nas moléculas carregadoras de oxigênio (GUPTA, 2009; GULLAN; CRANSTON, 2008; KLUßMANN-FRICKE *et al.*, 2014). A hemolinfa também transporta altas concentrações de aminoácidos e fosfatos orgânicos, concentrações variadas de açúcares, vitaminas, ácidos orgânicos (ácidos graxos), diacilglicerol, triacilglicerol, hormônios, íons inorgânicos e outros compostos importantes para suprir as necessidades fisiológicas dos animais (GULLAN; CRANSTON, 2008; ZACHARIAH; MITCHELL, 2009; PERKHULYN *et al.*, 2014).

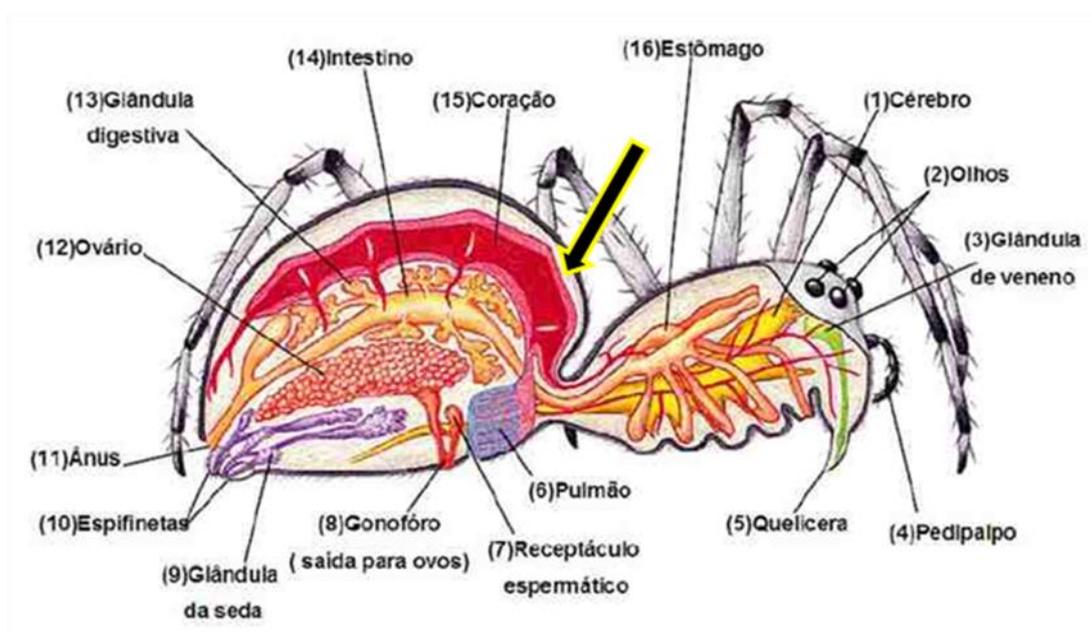
As células circulantes na hemolinfa são denominadas hemócitos, são elas que realizam fagocitose, melanização (deposição de melanina sobre a injúria ou sobre o microrganismo nos processos de defesa), opsonização (processo que adiciona proteínas do sistema imune sobre o microrganismo invasor, para inativação e identificação para fagocitose) e produzem os peptídeos antimicrobianos (AMPs) (RODRIGUES *et al.*, 2010; KUHN-NENTWIG *et al.*, 2014). Os artrópodes não são capazes de desenvolver uma resposta imune adaptativa, como a observada em vertebrados, portanto, os peptídeos produzidos pelos hemócitos são eficazes contra uma extensa gama de patógenos, sejam eles fungos, bactérias ou vírus (SILVA JR, 2000; LORENZI *et al.*, 2003; FUKUZAWA *et al.*, 2008; MAFRA *et al.*, 2012). Foi mostrado que hemócitos de *Anopheles gambiae* (mosquito) podem apresentar memória imunológica e aumentar a eficiência no combate de patógenos, mas não modulam resposta imunológica adaptativa (RODRIGUES *et al.*, 2010).

A circulação da hemolinfa nos invertebrados ocorre em sistema aberto, isso significa que a hemolinfa bombeada pelo coração circula por vasos até bem próximo aos órgãos, mas extravasa em lacunas corporais para suprir os tecidos e retorna lentamente aos vasos carregando as excretas celulares (FERREIRA, 2006; GULLAN; CRANSTON, 2008). Uma proteína que auxilia nas trocas gasosas é a hemocianina, essa proteína é ligada a um íon de cobre e assim pode aumentar substancialmente a concentração de oxigênio

circulante (COATES; NAIRN, 2014). A hemocianina é uma proteína bem conservada entre os invertebrados e representa cerca de 80% das proteínas plasmáticas (COATES; NAIRN, 2014). Nas aranhas o principal vaso transportador de hemolinfa é o dorsal que sai do abdômen em direção ao cefalotórax (Figura 4, seta) (FERREIRA, 2006; GULLAN; CRANSTON, 2008). Sendo assim, esse é o local preferencial para coleta de hemolinfa (RICILUCA *et al.*, 2012; BEDNASKI *et al.*, 2015).

A glândula produtora de veneno é isolada do contato com a hemolinfa, contudo há hipótese de haver inibidores das toxinas do veneno na hemolinfa, pois é sabido que circula no sangue das serpentes venenosas proteínas antiveneno que impedem o seu autoenvenenamento durante períodos de acasalamento (BIARDI *et al.*, 2011; MARCUSSI *et al.*, 2007).

Importante ressaltar que o hepatopâncreas das aranhas é muito ativo e mobiliza lipídeos e glicose para hemolinfa em determinados períodos de escassez nutricional, além disso, já foi mostrado que AMPs como defensinas também são produzidos nesse órgão (GARCÍA *et al.*, 2002; PORCHER, 2005; BAUMANN *et al.*, 2010).



**Figura 4. Desenho esquemático da anatomia interna das aranhas.** Nota-se o vaso dorsal principal, com órgão pulsante (coração), que sai da região abdominal em direção ao cefalotórax. A seta indica o local de coleta de hemolinfa. Adaptado de [www.portalsaofrancisco.com.br](http://www.portalsaofrancisco.com.br) (acesso: 10/01/2017).

### 2.2.1 Hemócitos

Todas as células presentes na hemolinfa dos invertebrados estão relacionadas com defesa inata dos animais. Os hemócitos são células nucleadas que participam ativamente das funções imunológicas dos invertebrados, atuam em eventos de fagocitose e opsonização, produzem as proteínas das cascatas de coagulação, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) e citocinas (GUPTA, 2009; CHEN *et al.*, 2016; TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2016).

A população de hemócitos pode variar muito de espécie para espécie (GUPTA, 2009). São encontrados diferentes tipos de hemócitos, com diferentes denominações, com as mais diversas funções e estágios de diferenciação (GUPTA, 2009; SOARES, 2011; KUHN-NENTWIG *et al.*, 2014). A população de hemócitos também pode variar frente a agentes estressores, Stalmach e colaboradores (2015) observaram uma diminuição na população de hemócitos do tipo granulócito e plasmatócito quando aranhas *Xerolycosa nemoralis* eram expostas à escassez alimentar. Hemócitos de mariposa *Galleria melonella* quando expostos a agentes tóxicos, como pesticidas, também tem sua população diminuída (KURTI; KAYIŞ, 2015). Também foi relatado alterações das características morfológicas de granulócitos e plasmatócitos quando hemócitos de *Anopheles gambiae* (mosquito) foram incubados com o parasita *Plasmodium* (RODRIGUES *et al.*, 2010).

A caracterização dos hemócitos é baseada em descrições morfológicas, ultraestrutura e função (SOARES, 2013). Na hemolinfa de *L. intermedia* foram identificados quatro tipos de células: os pró-hemócitos, os plasmatócitos, os granulócitos e os adipohemócitos (BEDNASKI *et al.*, 2015). Mas, na hemolinfa da aranha *Lasiadora sp.* (caranguejeira) foram descritas seis populações de hemócitos: pró-hemócitos, granulócitos do tipo I e II, esferulócitos, oenocitóide e plasmatócitos (SOARES, 2013). Soares (2011) observou que os granulócitos do tipo I e II de caranguejeira eram os principais responsáveis pela fagocitose de látex *in vitro* e que havia degranulação nas primeiras horas de desafio *in vitro*. E na hemolinfa da

aranha *Cupiennius salei* foram descritos quatro tipos de hemócitos: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos e cianócitos. Os pró-hemócitos e cianócitos são considerados células-tronco, pois podem se diferenciar em outros tipos celulares (KUHN-NENTWIG *et al.*, 2014).

Para melhor estudar os hemócitos os pesquisadores têm utilizado diferentes técnicas de biologia celular e molecular. Há estudos de caracterização bioquímica e celular e também estudos funcionais, nos quais é investigada a participação dos hemócitos nas respostas imunes, os peptídeos antimicrobianos e as vias de sinalização das cascatas de coagulação e de defesa inata.

A citometria de fluxo tem sido uma grande aliada na caracterização de hemócitos, Anderl e colaboradores (2016) utilizaram a citometria de fluxo para separar células de *Drosophila melanogaster* responsivas à infecção de ovos de vespa. Utilizando métodos de biologia molecular acoplaram GFP ao gene que era ativado a cada infecção, toda vez que o gene era acessado a GFP era produzida, sendo assim núcleos com maior fluorescência puderam ser separados e as células responsivas foram analisadas. E Bryant e Michel (2016) investigaram se a alimentação de sangue pelo mosquito *Anopheles gambiae* (transmissor da malária) constitui etapas na diferenciação celular ou ativação celular transitória dos hemócitos utilizando a citometria de fluxo, pois os hemócitos da hemolinfa de *A. gambiae* são importantes no ciclo de vida do parasita da malária e da sua transmissão ao humano.

Marringa e colaboradores (2014) utilizam a citometria de fluxo para determinar as diferenças entre os hemócitos da hemolinfa de membros de uma mesma colméia de abelhas, identificando assim indivíduos com diferenças metabólicas, quando submetidos a fatores de estresse. Indicando assim que essa técnica também pode ser utilizada para determinação de características individuais dos hemócitos e separação dos mesmos.

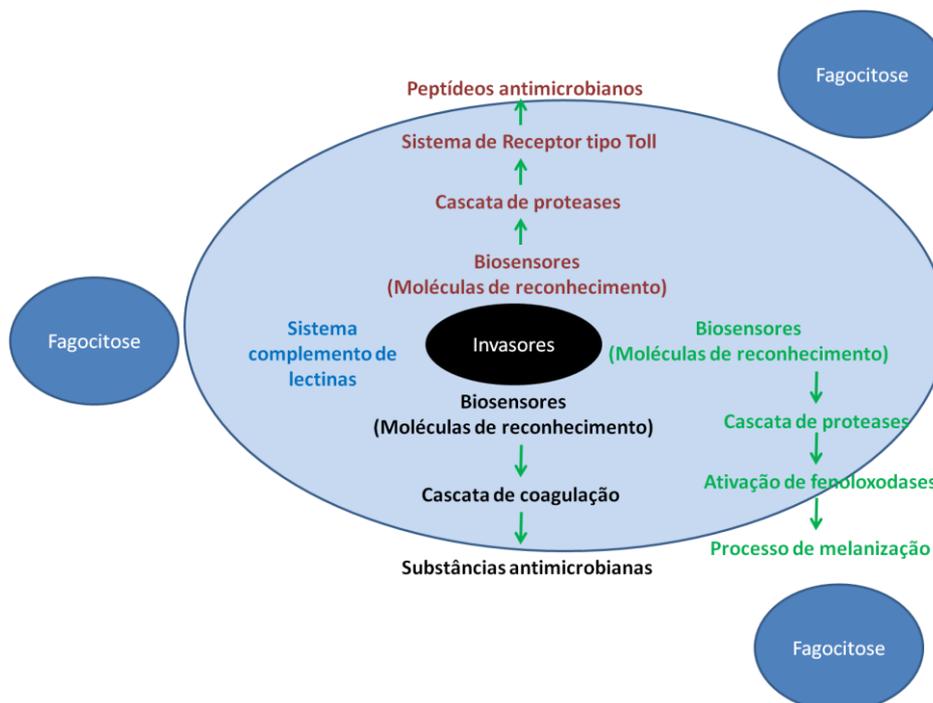
Não há na literatura científica um consenso sobre a melhor forma de se realizar o cultivo primário de hemócitos, os pesquisadores utilizam diversos meios de cultura, como RPMI, Grace, Sf-900 III ou II SFM. O uso de antibiótico e antimicótico também são variáveis, mas utiliza-se sempre 10% de soro fetal bovino e a temperatura de 28°C para manutenção das células

em cultura (GUPTA, 2009; TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2016; SOARES, 2011). Além disso, estabelecer a quantidade de células ideal para o plaqueamento é importante para evitar apoptose. Uma dificuldade encontrada pelos pesquisadores em manter o cultivo primário de hemócitos é a recorrente contaminação da cultura (GUPTA, 2009).

Manter os hemócitos em cultivo primário é uma grande vantagem para estudos *in vitro*. A maioria dos ensaios que determinam as funções dos hemócitos precisam do cultivo prévio dessas células para então estudar os eventos de ativação dos hemócitos, fagócitos, a degranulação, entre outros (SOARES, 2011, TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2016; KUHN-NENTWIG *et al.*, 2014).

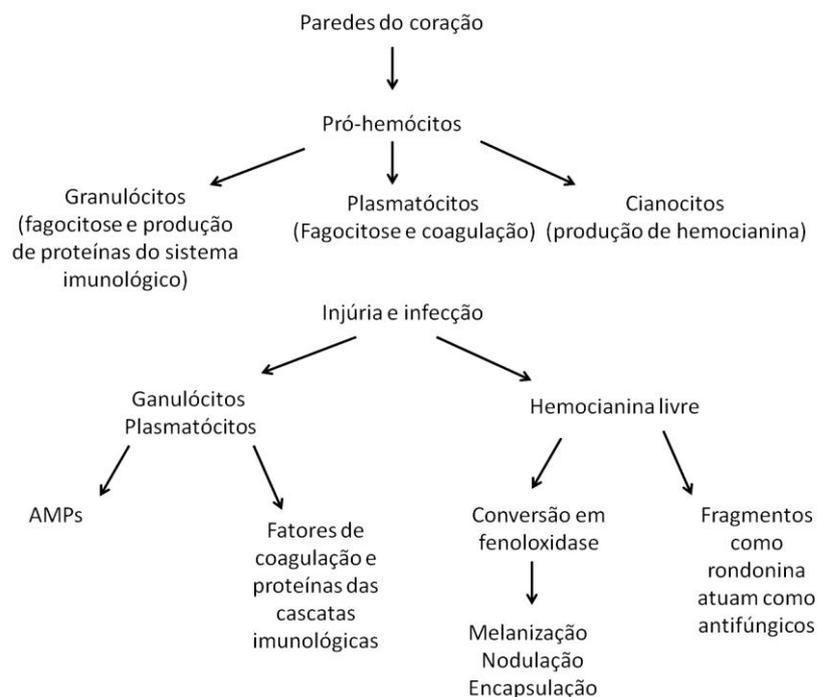
### **2.2.2 Sistema imunológico**

Os componentes do sistema imunológico dos invertebrados incluem fenoxidase, fatores de coagulação, fatores de complemento, lectinas, inibidores de proteases, peptídeos antimicrobianos (AMPs), receptores do tipo Toll (mediadores na produção dos AMPs) e outros fatores humorais da hemolinfa e seus hemócitos (Figura 5) (IWANAGA; LEE, 2005).



**Figura 5. Esquema dos componentes do sistema imunológico dos invertebrados.** Os invasores apresentam na membrana lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, peptídeo glicanos (PGN), (1, 3)  $\beta$ -D-glucose e ácidos lipoproteicos que estimulam os receptores de reconhecimento. Após a ativação dos receptores de reconhecimento são ativadas cascatas de coagulação, cascatas de proteases e sistema complemento de lectinas que consequentemente induzem a liberação de AMPs, melanização e processos de fagocitose. Adaptado de IWANAGA; LEE, 2005.

Grande parte das moléculas bioativas presentes na hemolinfa participa da resposta imunológica. Há indícios de que os pró-hemócitos são produzidos na parede do coração das aranhas e são liberados para circulação na hemolinfa. Os pró-hemócitos por sua vez dão origem aos plasmatócitos, granulócitos e cianócitos, cada um deles desempenha papéis diferentes na resposta imune. Frente a uma infecção ou injúria do tegumento os granulócitos e os plasmatócitos são os responsáveis por produzir e liberar os peptídeos antimicrobianos e fatores de coagulação, respectivamente. Além disso, são liberados na hemolinfa fragmentos da hemocianina para ajudar a combater infecção e proteínas protomotoras de nodulação (formação de complexo de proteínas e do microrganismo invasor que ainda não foi fagocitado), melanização (deposição de melanina sobre a injúria ou sobre o microrganismo nos processos de defesa) e encapsulação (processo em que células de defesa fagocitaram o complexo proteína e agente invasor mas ainda não o digeriram) (Figura 6) (KUHN-NENTWIG; NENTWIG, 2013).

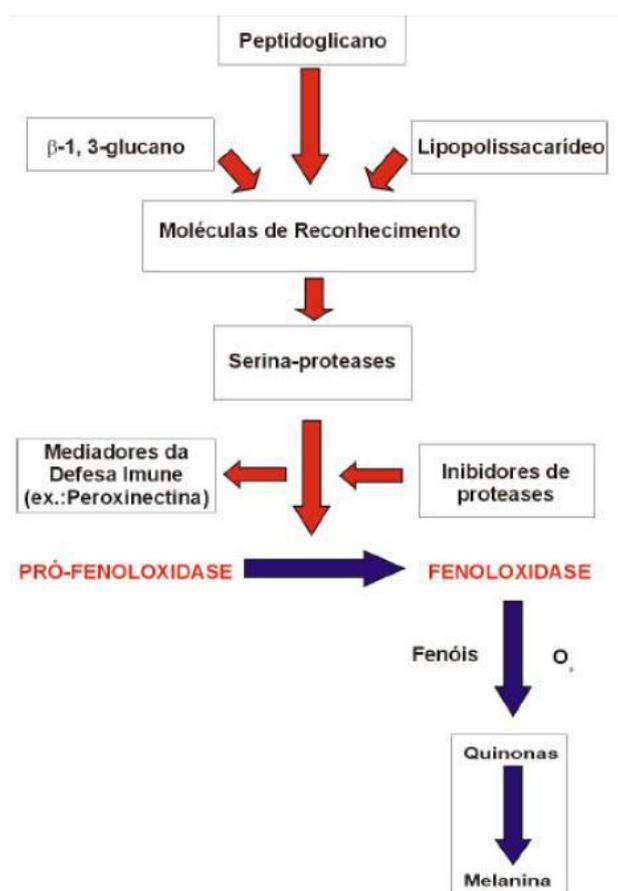


**Figura 6. Esquema do sistema imunológico das aranhas.** Origem e função dos hemócitos. Hemócitos produtores de proteínas e suas respectivas funções no sistema imune. Adaptado de KUHN-NENTWIG; NENTWIG, 2013.

A hemocianina é uma proteína glicosilada que foi primeiramente descrita como carreadora de oxigênio, ela possui associação com íon cobre que a auxilia nesse transporte (HELLMANN; DECKER, 2003; COATES; NAIRN, 2014). Mas alguns pesquisadores têm atribuído outras funções à hemocianina, como antiviral, antifúngico e enzimática (fenoloxidase) (CERENIUS *et al.*, 2010; RICILUCA *et al.*, 2012; DANG *et al.*, 2011).

Muitos processos envolvidos na coagulação e eventos celulares ainda não foram bem caracterizados. Sabe-se que algumas moléculas de bactérias, como lipopolissacarídeos e peptidoglicanos, ativam a cascata de serinoprotease, que culmina na melanização. A pro-fenoloxidase quando clivada pela serinoprotease se torna ativa. A fenoloxidase ativada cataliza a oxidação de compostos fenólicos, gerando espécies reativas de oxigênio e a gradual polimerização de quinona, resultando na formação de melanina (Figura 7) (SOARES, 2011; KUHN-NENTWIG; NENTWIG, 2013; COATES; NAIRN, 2014). A melanina é então depositada no local de injúria ou sobre o

microrganismo invasor, processo denominado de melanização (CERENIUS *et al.*, 2010; SOARES, 2011). Animais do Subfilo Chelicerata, no qual estão incluídos escorpiões e aranhas, não produzem uma fenoloxidade verdadeira, por isso a hemocianina desses animais atua na cascata imunológica como fenoloxidade (CERENIUS *et al.*, 2010; KUHN-NENTWIG; NENTWIG, 2013).



**Figura 7. Esquema da cascata imunológica de insetos.** Etapa de ativação da fenoloxidase a partir da ativação de uma serino-protease. Adaptado de SILVA JR, 2000.

As enzimas que degradam a fenoloxidase e cessam suas atividades são tripsinas e quimiotripsinas, sendo assim os inibidores de todas essas enzimas podem ser encontrados na hemolinfa, pois atuam como reguladores das cascatas (CERENIUS *et al.*, 2010; KUHN-NENTWIG; NENTWIG, 2013). Além disso, fragmentos da hemocianina podem atuar como peptídeos antimicrobianos, a rondonina, taquiplesina e taquistatinas são peptídeos já caracterizados de hemocianina que apresentam atividade antifúngica e antibacteriana, respectivamente (RICILUCA *et al.*, 2012; KUHN-NENTWIG;

NENTWIG, 2013). Dang e colaboradores (2011) mostraram que a hemocianina pode ainda apresentar atividade antiviral contra vírus do herpes (tipo 1).

Para o estudo do sistema imunológico dos invertebrados os pesquisadores utilizam as mais diversas técnicas de bioquímica, biologia celular e molecular. Entre as principais estão a espectrometria de massas, eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e técnicas de expressão heteróloga de proteínas recombinantes (HELLMANN; DECKER, 2003; BAUMANN *et al.*, 2010b; RICILUCA *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2015; BEDNASKI *et al.*, 2015).

### 2.2.2.1 Moléculas bioativas

As principais proteínas isoladas da hemolinfa com atividade biológica são a hemocianina, os inibidores de proteases e os peptídeos antimicrobianos (KUHN-NENTWIG; NENTWIG, 2013).

A hemocianina representa cerca de 80% das proteínas totais da hemolinfa de vários invertebrados. É uma proteína de aproximadamente 70 kDa ligada à um íon de cobre, isso torna a hemocianina um importante transportador de oxigênio. Em alguns invertebrados a hemocianina pode formar complexos hexaméricos ou octaméricos, tornando-se assim uma proteína molecularmente grande (COATES; NAIRN, 2014). Vários autores já mostraram que a hemocianina desempenha outras funções na hemolinfa dos invertebrados, podem atuar como fenoloxidase, AMPs e estimulador do sistema imunológico (CAMPO *et al.*, 2011; RICILUCA *et al.*, 2012; SHESHADRI; ABRAHAM, 2012).

Os inibidores de proteases são amplamente descritos na hemolinfa dos artrópodes porque atuam como reguladores das cascatas imunológicas, já foram descritos inibidores de serinoproteases e metaloproteases (CERENIUS *et al.*, 2010). Pela primeira vez na literatura foi identificada uma proteína da hemolinfa da aranha *Lasiodora* sp. (caranguejeira) com capacidade de inibir uma elastase e também apresentou atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* (SOARES *et al.*, 2011).

Os inibidores de proteases podem ser classificados de acordo com sua origem, seu mecanismo de ação, sua estrutura tridimensional e resíduos conservados (SOARES, 2011). Os inibidores de serinoproteases são os mais bem descritos e caracterizados, eles são incluídos na família das serpinas, Kazal ou Kunitz (SOARES, 2011). Os inibidores do tipo serpina são importantes na regulação da cascata de melanização atuando muito provavelmente sobre a fenoloxidase (CERENIUS *et al.*, 2010).

Na hemolinfa de *Musca domestica* (mosca) foi identificado um inibidor de fenoloxidase com nó de cistina, esse motivo estrutural é comumente encontrado em peptídeos de veneno de aranha e serpentes (DAQUINAG *et al.*, 1999). Esses achados evolutivos são importantes, pois permitem entender melhor as relações entre as proteínas do veneno e da hemolinfa.

#### **2.2.2.1.1 Peptídeos antimicrobianos**

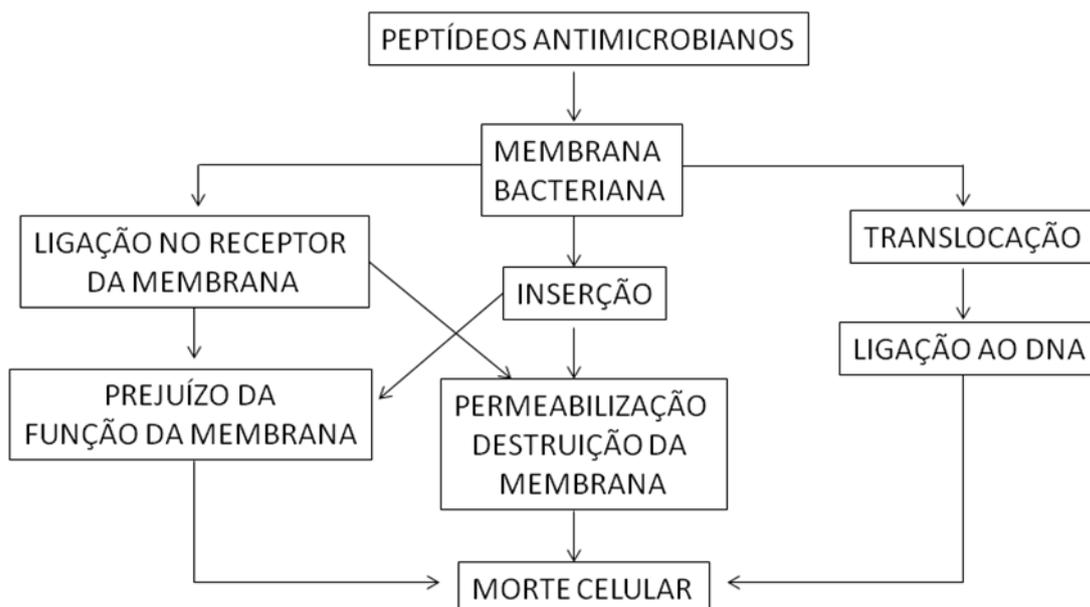
As bactérias super-resistentes que não respondem aos fármacos atuais e o desenvolvimento de novos antibióticos são uma preocupação crescente da comunidade científica e médica (OLIVEIRA; DAMASCENO, 2010; EVANGELISTA; OLIVEIRA, 2015; RAHMAN *et al.*, 2017). O surgimento dessas bactérias resistentes está relacionado ao uso indiscriminado de antibióticos na medicina humana e veterinária (STANGE *et al.*, 2016), assim como ambientes hospitalares, que favorecem o surgimento de bactérias resistentes por utilizarem antibióticos de maneira profilática por longos períodos (OLIVEIRA; DAMASCENO, 2010). A disseminação dessas bactérias é feita facilmente pela água e pode atingir as populações mais longínquas dos seus pontos de infecção inicial (STANGE *et al.*, 2016). Como o Brasil tem um sistema de tratamento de água e esgoto precário (quando não inexistente), as bactérias resistentes podem nos próximos anos tornar-se um problema de saúde pública maior ainda.

Nesse cenário, os estudos que buscam novos meios de combate ou que favoreçam o conhecimento sobre moléculas que possam atuar sobre essas bactérias resistentes são de grande importância.

Os animais pertencentes ao filo Arthropoda podem ser grandes aliados da busca por novos fármacos, pois esses animais produzem peptídeos antimicrobianos (AMPs) de amplo espectro como forma de defesa imune. Como não desenvolvem defesa imune adaptativa, os AMPs liberados na hemolinfa devem ser eficientes no combate aos possíveis microrganismos invasores (DOSSEY, 2010; KUHN-NENTWIG *et al.*, 2014). Os peptídeos antimicrobianos são produzidos para proteger o animal de infecções provocadas por bactérias, fungos e vírus. Possuem sequências e estruturas variadas e geralmente são peptídeos pequenos de até 10 kDa com caráter catiônico e anfipático (BAUMANN *et al.*, 2010b). Nas aranhas sua produção é constitutiva e os AMPs ficam armazenados nos granulócitos (LORENZINI *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2010; BAUMANN *et al.*, 2010b). Os peptídeos antimicrobianos de aranhas podem ser divididos em quatro classes: defensinas, peptídeos ricos em glicina, pequenos peptídeos cíclicos (abertos/fechados) e fragmentos de hemocianina (KUHN-NENTWIG; NENTWIG, 2013).

O caráter anfipático dos AMPs permite que esses peptídeos atuem na membrana dos microrganismos invasores, eles se inserem na membrana causando a lise celular ou atuam intracelularmente impedindo a síntese de proteínas importantes ao microrganismo (Figura 8) (DAFFRE *et al.*, 2001).

Já foram descritos vários peptídeos antimicrobianos oriundos da hemolinfa e dos hemócitos de aranhas. Podem ser citados a acantoscorrina, a gomesina, as defensinas, os peptídeos ricos em glicina e a rodamina, todos eles com ações comprovadas contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (SILVA JR, 2000; LORENZINI *et al.*, 2003; FUKUZAWA *et al.*, 2008; BAUMANN *et al.*, 2010a; BAUMANN *et al.*, 2010b). A migalina é uma poliaminada isolada da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana* que apresenta atividade contra *Escherichia coli* e também participa da resposta imune do animal (PEREIRA *et al.*, 2007).



**Figura 8. Esquema do modo de ação dos AMPs.** Sugere-se que os AMPs se ligam a membrana do invasor e causam a lise celular ou induzem a morte celular por impedir a síntese proteica (DAFFRE *et al.*, 2001).

Esses achados reforçam a importância de se pesquisar a hemolinfa, pois várias proteínas identificadas tem grande potencial biotecnológico, podendo ser utilizadas na medicina, na agricultura e no controle ambiental de vetores.

### 2.2.3 Lipídios

O conteúdo lipídico da hemolinfa dos artrópodes é pouco investigado, mas conhecer essa classe de moléculas é tão importante quanto conhecer seu perfil proteico, pois se sabe que muitos lipídios são mensageiros intracelulares e atuam ativamente nas cascatas de sinalização (FRUTTERO *et al.*, 2017). Os lipídios também são utilizados como reserva energética e são fundamentais na formação dos hormônios e membranas biológicas (SCHMITT *et al.*, 2015; LAINO *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2016; FRUTTERO *et al.*, 2017).

A concentração e os diferentes tipos de lipídios na hemolinfa são muito variáveis, pois alterações metabólicas podem recrutar mais ou menos

lipídios. Na hemolinfa da aranha *Brachypelma albopilosa* há uma variação na composição lipídica que ocorre entre as fases do ciclo de vida e nas épocas de acasalamento. Os cientistas afirmam que essa variação influencia o comportamento de predação, podendo inibi-lo ou estimulá-lo (TRABALON, 2011). Os outros fatores como, espécie, idade e dieta nutricional também podem facilmente alterar a composição lipídica circulante na hemolinfa (CAPPELARI *et al.*, 2009; LAINO *et al.*, 2015).

Os lipídios encontrados da hemolinfa de *L. intermedia* são os fosfolipídeos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina e fosfatidil-inositol, sendo os dois primeiros os mais abundantes. Também foram encontrados diacilglicerol, ergosterol e triacilglicerol. Os esteróis são encontrados na hemolinfa dos artrópodes porque são metabólitos que representam reserva energética sendo disponibilizada (BEDNASKI *et al.*, 2015). Na hemolinfa de *Drosophila melanogaster* (mosca), assim como em artrópodes, o diacilglicerol é comumente encontrado, além disso, o fosfolipídeo majoritariamente encontrado na hemolinfa da mosca foi a fosfatidiletanolamina (PALM *et al.*, 2012).

Os lipídios não circulam livremente pela hemolinfa devido seu caráter insolúvel, é necessário que os lipídios se associem a proteínas de transporte denominadas de lipoproteínas (CAPPELARI *et al.*, 2009). As principais lipoproteínas já descritas são a HDL (*High-Density Lipoprotein* - lipoproteína de alta densidade) e a LDL (*Low-Density Lipoprotein* - lipoproteína de baixa densidade) (CUNNINGHAM; POLLERO, 1996). Muitos pesquisadores têm investigado sobre as lipoproteínas, pois entender o recrutamento de lipídios na hemolinfa traz grandes revelações sobre o metabolismo e o comportamento predatório dos artrópodes, uma vez que já foi descrito que os lipídios influenciam diretamente no comportamento dos animais (BAEK *et al.*, 2016; KONUMA *et al.*, 2016; PAREDES *et al.*, 2016). Essas pesquisas permitiram concluir que as lipoproteínas são bem conservadas entre os invertebrados (KONUMA *et al.*, 2016, FRUTTERO *et al.*, 2017).

Nos insetos, o corpo gorduroso é o principal órgão de armazenagem de energia na forma de gordura, mas pouco se sabe sobre a armazenagem de lipídios em aranhas, pois aranhas não possuem corpo gorduroso (LAINO *et*

*al.*, 2015). Sendo assim, o armazenamento de energia em aranhas pode ocorrer em adipohemócitos, células que possuem corpos lipídicos no citoplasma, ou podem utilizar energia oriunda da degradação de proteínas livres no plasma (CHAN *et al.*, 2006; KONUMA *et al.*, 2016; DEFFERRARI *et al.*, 2016).

Em nosso trabalho foi investigado o conteúdo lipídico para melhor entender as relações que poderiam existir entre a hemolinfa e as toxinas encontradas no veneno de *L. intermedia*. Além disso, as informações decorrentes da caracterização do conteúdo lipídico da hemolinfa podem auxiliar em outras pesquisas, relacionadas com controle biológico de aranhas, insumos biotecnológicos e fisiologia dos aracnídeos.

### 3- CAPÍTULO 1

Neste primeiro capítulo relatam-se os estudos das características proteicas, lipídicas e celulares da hemolinfa de *L. intermedia*. Os resultados destes estudos compõem o artigo científico a seguir (BEDNASKI *et al.*, 2015), o qual descreve as características bioquímicas das proteínas encontradas na hemolinfa de aranha-marrom, a partir de ensaios de eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) uni e bidimensionais. Na hemolinfa são encontradas proteínas de alta massa molecular (maiores que 200 kDa) e de baixa molecular (menores que 20 kDa) de caráter neutro a básico. As glicoproteínas encontradas são glicosiladas com resíduos de galactose- $\beta$  (1-4) N-acetilglucosamina e alta manose, não foram detectadas proteínas glicosiladas com ácido siálico ou galactose-  $\beta$  (1-3)N-acetilglucosamina.

Os lipídios encontrados na hemolinfa foram identificados a partir da técnica de espectrometria de massas. A fostatidilcolina foi o fosfolipídio mais abundante presente na hemolinfa de *L. intermedia*, seguida de fostatidiletanolamina e lisofosfatidilcolina (BEDNASKI *et al.*, 2015).

Na fração celular da hemolinfa foram descritos quatro tipos de hemócitos: pró-hemócitos, adipohemócitos, plasmatócitos e granulócitos. Os pró-hemócitos são células pequenas com núcleo evidente. Foram identificados adipohemócitos que possuem inclusões lipídicas no citoplasma, evidenciadas pela coloração de *Nile Red* (citoquímica para lipídios). Os plasmatócitos são as células mais abundantes e são descritos como participantes ativos da resposta imunológica, assim como os granulócitos. Os granulócitos possuem como principal característica os grânulos citoplasmáticos.

## 4- OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Descrever as características bioquímicas, moleculares e morfológicas das frações proteica, lipídica e celular da hemolinfa de *Loxosceles intermedia*.

### Objetivos específicos

- Determinar a melhor metodologia de coleta da hemolinfa de *L. intermedia*;
- Descrever as características bioquímicas das proteínas presentes na hemolinfa de *L. intermedia*;
- Determinar os lipídios (lipidômica) presentes na hemolinfa de *L. intermedia*;
- Caracterizar morfológicamente os hemócitos presentes na hemolinfa de *L. intermedia*.

## 5- ARTIGO PUBLICADO

Toxicon 98 (2015) 62–74



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

## Characterization of Brown spider (*Loxosceles intermedia*) hemolymph: Cellular and biochemical analyses



A.V. Bednaski<sup>a</sup>, D. Trevisan-Silva<sup>a</sup>, F.H. Matsubara<sup>a</sup>, M. Boia-Ferreira<sup>a</sup>, M.M. Olivério<sup>a</sup>, L.H. Gremski<sup>b</sup>, R.P. Cavalheiro<sup>d</sup>, D.M.B. De Paula<sup>c</sup>, E.J. Paredes-Gamero<sup>d</sup>, H.K. Takahashi<sup>c</sup>, M.S. Toledo<sup>c</sup>, H.B. Nader<sup>d</sup>, S.S. Veiga<sup>a</sup>, O.M. Chaim<sup>a</sup>, A. Senff-Ribeiro<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, UFPR, Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Department of Clinical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Brazil

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, Laboratory of Immunochemistry of Glycoconjugates, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>d</sup> Department of Biochemistry, Discipline of Molecular Biology, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 December 2014

Received in revised form

11 February 2015

Accepted 17 February 2015

Available online 24 February 2015

#### Keywords:

Brown spider

*Loxosceles intermedia*

Hemolymph

Hemocytes

### ABSTRACT

This is the first study on the hemolymph from a spider of the *Loxosceles* genus. These animals are responsible for a great number of envenomation cases worldwide. Several studies on *Loxosceles* venoms have been published, and the knowledge about the venom and its toxins is considerable, not only regarding the biological and biochemical characterization, but also regarding structural, genetic and phylogenetic approaches. However, the literature on *Loxosceles* hemolymph is nonexistent. The main goal of the present study was to characterize biochemically the hemolymph content, and especially, to identify its different hemocytes. Moreover, many papers have already shown molecules whose source is the hemolymph and their very interesting activities and biomedical applications, for example, antifungal and antibacterial activities. A 2D-SDS-PAGE of brown spider hemolymph showed approximately 111 spots for pH 3–10 and 150 spots for pH 4–7. A lectin-blotting assay showed that hemolymph carbohydrate residues were similar to those found in venom. Several types of TAG and DAG phospholipids were found in the hemolymph and characterized by HPTLC and mass spectrometry. Four different hemocytes were characterized in *Loxosceles intermedia* hemolymph: prohemocyte, plasmotocyte, granulocyte and adipohemocyte. This paper opens new possibilities on toxinology, studying an unknown biological material, and it characterizes a source of molecules with putative biotechnological applications.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Loxosceles* venoms are well-studied topics in toxinology, with a broad range of studies concerning their composition and toxic effects (Gremski et al., 2014). Spiders from the *Loxosceles* genus, also known as brown spiders, are responsible for a great number of envenomations, which generally trigger cutaneous effects and development of a dermonecrotic lesion. Occasionally, victims can present systemic symptoms (fever, nausea, hemolysis, and kidney

commitment), and in rare cases, the victims can die (Paludo et al., 2006; Chaim et al., 2011). Considering the medical relevance of *Loxosceles* genus, its venom has been well characterized, and several toxins have been identified and studied. Phospholipases-D, metalloproteases, hyaluronidases, and insecticidal peptides, among others, have already been described and characterized as components of *Loxosceles* venoms, whose effects are due to the synergistic effect of the several toxins. Transcriptome analysis has also been performed, showing the percentages of each toxin in the total mRNA of the venom gland (Gremski et al., 2010; Fernandes-Pedrosa et al., 2008). Concerning proteomic approaches, there are 2 studies on the venom of *Loxosceles* spiders (Machado et al., 2005; dos Santos et al., 2009). In contrast, the hemolymph from *Loxosceles* has been neglected by the scientific community. Arachnid hemolymph and immune system are generally not well investigated.

\* Corresponding author. Centro Politécnico, Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, UFPR, Jardim das Américas, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.

E-mail addresses: [senffribeiro@ufpr.br](mailto:senffribeiro@ufpr.br), [senffribeiro@gmail.com](mailto:senffribeiro@gmail.com) (A. Senff-Ribeiro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.008>

0041-0101/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Hemolymph is a transparent fluid that transports nutrients, hormones, oxygen and cells (hemocytes) through the open circulatory system of arthropods. Hemolymph nourishes spider tissues, regulates homeostasis, triggers healing and regeneration and protects them from external infections (Cunningham et al., 1994; Zachariah and Mitchell, 2009; Jalal et al., 2010; Hernández-Martínez et al., 2013). However, the few studies performed had already pointed to its rich composition and putative biotechnological applications (Vilcinskas and Wedde, 2002; Kanost, 1999; Trabalon et al., 2010). Hemolymph is in direct contact with the venom gland, which suggests that its composition is worthy of investigation. Herein, *Loxosceles intermedia* hemolymph was biochemically characterized, and its hemocytes were identified.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Hemolymph collection from Brown spider

Adult *L. intermedia* spiders were individually anesthetized with chloroform for approximately one minute. Then, for the puncture method, each spider was immobilized with an adhesive tape and the hemolymph was collected by a puncture on the dorsal vase using a needle and ultrafine syringe (BD Micro-Fine™ + Demi 8 mm, Diameter 0.30 mm) (Fig. 1) and then solubilized in PBS (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) containing 5% Protease Inhibitor Cocktail for mammalian tissues – PIC (Sigma, St. Louis, MI, USA). For the leg method, legs were cut off at the patellar region and the hemolymph was collected using a micropipette with a regular tip. The procedure following the collection was the same as the one already described for the puncture method. All the assays were conducted using a hemolymph pool from male and female adult spiders (at least 5–10 animals).

### 2.2. Gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The protein concentrations of hemolymph samples were determined by the Coomassie Blue method, using bovine serum albumin (BSA) for the standard curve (Bradford, 1976). *L. intermedia* hemolymph was analyzed by denaturing electrophoresis with continuous gradient 5–15% (w/v) polyacrylamide gels under reducing and non-reducing conditions following Laemmli (1970). The gels were staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 (30 µg of hemolymph) (Bio-Rad, Botafogo, RJ, Brazil) or monochromatic silver (3 µg of hemolymph) (Wray et al., 1981). In these analyses a hemolymph pool from 30 spiders was used. The molecular mass markers were acquired from Sigma (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### 2.3. Two-dimensional gel electrophoresis (2DE)

Prior to isoelectric focusing (IEF), hemolymph samples (from 50 spiders) were solubilized in 2DE rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer, pH 3–10, 0.002% bromophenol blue and 100 mM DTT). The protein concentration was determined using a 2-D Quant Kit®, and 100–150 µg of hemolymph was diluted in 200 µL of 2DE rehydration buffer. To rehydrate the strips, hemolymph samples were applied on 13 cm immobilized pH gradient (IPG) gel strips at a linear range of pH 3–10 or pH 4–7 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and incubated for 16 h at room temperature. The IEF was performed at 20 °C on an IPGphor unit (IPGphor 3 Isoelectric Focusing System – GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) with a total voltage accumulation of 15,500 V for 5 h at 50 µA/strip. After focusing, the strips were incubated for 15 min in reducing solution (6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS and 65 mM DTT)

and followed by a 15 min incubation in alkylation solution (6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS and 135 mM iodoacetamide). The SDS-PAGE step was performed using 10% polyacrylamide gels at the constant current of 45 mA per gel at 15 °C. For the colloidal Coomassie Brilliant Blue staining, the gel was incubated in fixation solution (1.3% TCA and 20% methanol for 1 h) and followed by an overnight incubation in staining solution (5% acetic acid and 50% ethanol for 1 h). The gel was subsequently incubated for 3 min in neutralization solution (0.1 M Tris pH = 6.5), washed in 20% methanol for less than a minute and stabilized in 5% ammonium sulfate for 1 h. The gel was maintained in a 1% acetic acid solution and scanned using an ImageScanner III LabScan 6.0 (GE Healthcare). The detection of the gel spot and calculation of the isoelectric point (pI) and molecular weight (MW) were obtained using Image Master 2D Platinum software (GE Healthcare). The gels were repeated three times.

### 2.4. Lectin-blotting

For the evaluation of protein glycosylation we used the DIG Glycan Differentiation Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). First of all, hemolymph samples were submitted to SDS-PAGE (5–15% gradient acrylamide), then the proteins were transferred onto nitrocellulose membranes that were then blocked with fat free casein buffer and incubated for 1 h at room temperature with distinct digoxigenin-labeled lectins: *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Peanut agglutinin* (PNA), *Datura stramonium agglutinin* (DSA) and *Galanthus nivalis agglutinin* (GNA). To recognize the lectins, the nitrocellulose sheets were incubated with anti-digoxigenin antibodies conjugated with alkaline phosphatase for 1 h at room temperature. The reaction was developed by NBT and X-phosphate from the kit. The reactions were performed following the manufacturer's recommendations.

### 2.5. Lipid analysis

#### 2.5.1. High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

For lipid analysis, the hemolymph was collected and solubilized in water, followed by organic extraction with MTBE (Methyl-Tert-Butyl Ether) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) as described by Matyash et al. (2008). Briefly, 250 µl of hemolymph samples (from 50 spiders) was added to 1.5 mL of methanol and 5 mL of MTBE. The mixture was left to rest during an hour and vortexed every 10 min. Lipid phase separation was achieved by adding 1.25 mL of water and centrifuging the sample tubes at 1000 × g for 10 min. The upper organic phase was dried with nitrogen flow in gentle heating (37 °C). The neutral and charged lipids were submitted to a column of silica gel 60 resin (Sigma Aldrich) packed into Pasteur pipettes, washed with methanol and acetone and equilibrated with chloroform. The lipid sample was dissolved in 1 mL of chloroform and loaded onto the column. Neutral lipids and free fatty acids were eluted with 2–3 mL chloroform; this was followed by 2–3 mL acetone to elute the glycolipids and ceramides, and 2–3 mL methanol to elute the phospholipids. All samples were dried under a nitrogen stream and frozen until the moment of use. Dry samples were suspended in chloroform/methanol (2:1 v/v). Lipid extracts were analyzed by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) on Silica Gel 60 Plates (Merck, Darmstadt, Germany). The presence of different classes of lipids was analyzed as follows: i-for phospholipids, the HPTLC were developed in chloroform/methanol/methylamine 40% (60:35:10, v/v/v) and visualized using Dittmer–Lester reagent (Tagliari et al., 2012); ii-for neutral lipids, the HPTLC were developed by chloroform/ethyl ether/acetic acid (80:20:1, v/v/v) as mobile phase and visualized as gray spots by using 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> spray and heating the plates at 120 °C for 5 min

(Nguyen et al., 2011); iii-for glycolipids, the HPTLC were developed by 0.02% chloroform/methanol/CaCl<sub>2</sub> (60:40:9; v/v/v) as the mobile phase and visualized by staining with orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and heating the plates at 120 °C for 5 min (Toledo et al., 1995). The lipid standards were: phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), triacylglycerol (TAG), ergosterol (ERG), and cholesterol (COL).

#### 2.5.2. Electrospray ionization mass spectrometry

Lipid extract samples were also submitted to mass spectrometry analysis carried out using a Varian 310 Triple-Quadrupole mass spectrometry with an ESI source (Varian Inc., Walnut Creek, CA). Data acquisition was controlled with Varian MS Workstation version 6.9. Sample analysis was carried out in positive and negative ESI modes using a variable needle voltage according to the target lipid, as described by Guan et al. (2010). The mass scanning range for non-targeted was  $m/z$  200–1200, the capillary temperature was 200 °C, the drying gas pressure was 20 psi, and the nebulizing gas pressure was 40 psi. MS2 experiments were carried out using 2 mTorr Argon. The capillary and collision energy for MS2 ion fragmentation was optimized to minimize variations in relative ion abundance due to differences in the rates of dissociation. As the mobile phase, methanol:water (8:2, v/v) with 5 mM of ammonium formate was used at a flow rate of 10–30  $\mu$ l/min infused by a direct infusion pump (Harvard Apparatus). For the detection of phospholipids, precursor ion scan (PREIS) was used in negative mode for the detection of parental ions containing phosphoinositol derivative (241  $m/z$ ; capillary at –145 V and collision energy at 38 V), and PREIS was used in positive mode for phosphocholine (184  $m/z$ ; capillary at 105 V and collision energy at 31 V). Neutral loss scan (NLS) was used for the detection of parental ions containing serine (87  $m/z$ ; capillary at 70 V and collision energy at 15 V) in negative mode and phosphoserine (185  $m/z$ ; capillary at 60 V and collision energy at 15 V) in positive mode. NLS of phosphoethanolamine derivative (141  $m/z$ ; capillary at 40 V and CE at 14 V), in positive mode, was carried out in the scan range between 500 and 900  $m/z$ . The lipid identities, PI, PC, PS and PE, were confirmed by collision-induced dissociation (CID) (Guan et al., 2010; Busik et al., 2009; Castro et al., 2013). ESI mass spectra analyses of TAG and DAG molecular species were performed by specific fatty acid NLS (e.g., fatty acid 18:0, NL 284; fatty acid 18:1, NL 282), capillary at 70 V and collision energy at 22 V in positive mode, and the identity of DAGs and TAGs fatty acids were confirmed by CID. Typically, 20 scans were accumulated for the non-targeted scan range and 30 scans were accumulated for the analysis of CID, PREIS or NLS.

### 2.6. Microscopy analysis

#### 2.6.1. Light microscopy and May-Grünwald Giemsa staining

Hemolymph was obtained by the dorsal vase puncture method of collection using citrate/EDTA buffer (0.45 M NaCl; 0.1 M glucose; 30 mM trisodium citrate; 26 mM citric acid and 10 mM EDTA) at pH 4.6 (Söderhall and Smith, 1983). This buffer prevented the coagulation of hemolymph (which could be noticed by the presence of granulocyte clusters on the slides), resulting in a better yield of cells/mL. The slides were also cleaned and sterilized (200 °C, 2 h) to prevent the coagulation of hemolymph by LPS (lipopolysaccharide). Cells were counted using a Neubauer chamber and a cell solution of  $2 \times 10^4$  cells/ml was prepared. The cells were placed onto slides by centrifugation at 1200  $\times$  g for 5 min using a Cytospin (Shandon Cytospin 3 - Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). After the Cytospin process, cells were fixed with methanol 100% (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil) for 5 min at room temperature. Then, the cells were incubated with May-Grünwald concentrate dye (Newprov, Pinhais, PR, Brazil) for 3 min. Subsequently, 300  $\mu$ l of

water was added, and the slides were maintained in this solution for 1 min; then, the solution was discarded. The next step was staining the cells with Giemsa (Newprov) in the proportion 1:9 (v/v) diluted with water for 15 min. Lastly, the slides were washed in running water (Carneiro and Daemon, 1996). The slides were analyzed with an optical microscope BX40 attached to a camera for the registration of images (Olympus DP071).

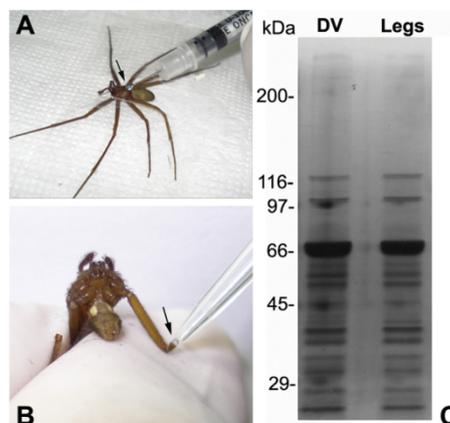
#### 2.6.2. Nile Red cytochemistry

The protocol used for this cytochemistry was adapted from Greenspan et al. (1985). Briefly, the glass slides were treated with poly-L-lysine (Sigma, St. Louis, MI, USA) for cell attachment. After the Cytospin centrifugation (see Light Microscopy section), the cells were fixed in paraformaldehyde 1% for 1 h and washed in PBS. For unspecific autofluorescence due to fixation, the samples were blocked with glycine 0.1 M for 1 h, and then the cells were stained with Nile Red (Sigma, St. Louis, MI, USA) (diluted in acetone/PBS 1:1 v/v) for 20 min and washed again. The slides were mounted with 7  $\mu$ l DAPI Fluoromount-G™ (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). The images were obtained using Confocal Microscope Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). DAPI and Nile Red fluorescence was detected at 480/500 nm and 400/515 nm excitation/emission, respectively.

## 3. Results

### 3.1. Brown spider hemolymph collection

Hemolymph collection from *L. intermedia* spiders was carried out by two different methods for yield and protein profile comparison, as both protocols are currently used and described in the literature for hemolymph collection in different species of spiders. The hemolymph was collected either by a puncture at the dorsal vase using a needle and syringe or by cutting the legs at the patellar vase using a needle and syringe or by cutting the legs at the patellar vase (Fig. 1A and B, respectively). The protein profile of hemolymph obtained by the two different methods was the same (Fig. 1C), discarding any possible contamination with venom by the puncture method. The average protein yield obtained from *L. intermedia* hemolymph collection was ~25  $\mu$ g/ $\mu$ l. The total



**Fig. 1.** Hemolymph collection of *L. intermedia* spider. A: Hemolymph collection by puncture of the dorsal vase using a syringe and needle; B: Hemolymph collection by cutting the legs at the patellar region; C: SDS-PAGE protein profile of hemolymph collected by both methods (DV – dorsal vase; Legs). 3  $\mu$ g of total protein stained with silver.

volume/animal collected was 4–5  $\mu$ L for the leg collection and 8–10  $\mu$ L for the puncture method. The puncture method was chosen for the study as it showed a better volume yield of hemolymph per animal.

### 3.2. Protein profile of Brown spider hemolymph (SDS-PAGE and 2DE)

The hemolymph protein content analysis by SDS-PAGE, stained by both Coomassie Blue and Silver methods, showed several bands with electrophoretic mobility higher than 200 kDa as well as low molecular mass proteins (lower than 29 kDa) (Fig. 2). Moreover, these protein profiles reveal a representative band at 66 kDa. Several low or high molecular mass proteins that were less representative and hardly observed with Coomassie Blue Staining, could be highlighted by Silver Staining.

The two-dimensional electrophoretic (2DE) analysis of *L. intermedia* hemolymph, stained with Coomassie G-250, showed ~111 protein spots for pH 3–10, whose isoelectric points varied from acidic to neutral pH (Fig. 3A). On the 2DE gels, proteins with molecular mass ranging from higher than 100 kDa to lower than 29 kDa were detected (Table 1). Additionally, on the 66 kDa region, a strong signal with several spots was also observed in the two-dimensional profile of *L. intermedia* hemolymph (7 spots: 66–63 kDa and pI 6.12–6.99). To better analyze the gel, it was also presented with the label of each spot identified (Fig. 3B). Moreover, the pHs and pIs of each spot are listed in Table 1. A 2DE analysis using a pH range of 4–7 was also performed (Fig. 3C). The same profile of spot distribution, high molecular mass proteins (~140 kDa) and low molecular mass proteins (~20 kDa), was observed with this approach, but a greater number of spots was detected (~150). On the 66 kDa region, 14 spots (63–66 kDa and pI 5.33–6.24) could be observed. For better visualization of the

protein profiles, spot identification numbers are shown (Fig. 3D). The pHs and pIs of each spot are listed in Table 2.

### 3.3. Glycosylation profile of the Brown spider hemolymph

The study of the glycosylation by Lectin-blotting showed that *L. intermedia* hemolymph is enriched in molecules that contain galactose- $\beta$  (1-4)N-acetylglucosamine and high mannose residues (Fig. 4). Furthermore, several proteins that are positive for both residues could be detected, for example, at ~116 kDa and ~97 kDa. A protein that is strongly positive for N-acetylglucosamine can be observed below the ~66 kDa band; however, there are low molecular mass proteins containing high mannose residues but not N-acetylglucosamine glycosylation. Sialic acid and galactose- $\beta$  (1-3) N-acetylgalactosamine residues were not detected in the *L. intermedia* hemolymph proteins (Fig. 4).

### 3.4. Lipid profile of the Brown spider hemolymph

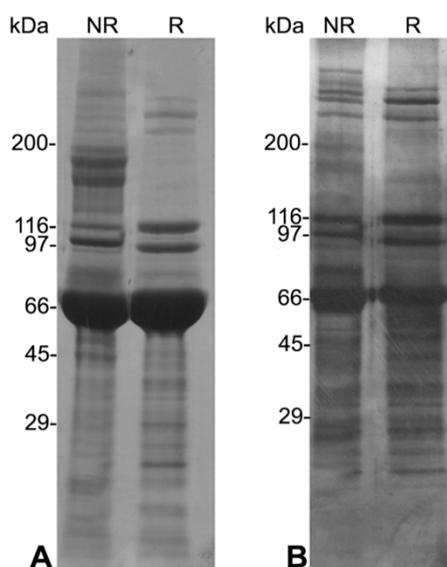
Fig. 5 shows in panel A the chloroform fraction containing only phospholipids: phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylinositol. We were not able to identify the presence of phosphatidylserine. Panel B shows the methanol fraction containing neutral lipids, such as TAG and steryl-ester, and we also verified the presence of DAG and sterols. Steryl-ester and sterol were not fully characterized by MS experiments. The silica gel column described in the Material and methods section was an effective way to separate neutral lipids from phospholipids.

To better assess the hemolymph lipid composition, a series of mass spectrometry analyses was performed with chloroform and methanol fractions, as described above. Fig. 6 shows the full scan of the methanol fraction in positive mode (Fig. 6A) and negative mode (Fig. 6B). By a combination of different methodologies (PREIS, NLS and CID), the polar head and fatty acid composition of the major peaks were determined. Phosphatidylcholine is the most abundant among the phospholipids, as shown at peak 760  $m/z$ , corresponding to PC with total fatty acid 34:1; it is noteworthy that clusters of PC corresponding to total fatty acids 30:0, 32:0, 34:0 and 36:0, with variable insaturations, were detected. We also determined the presence of lysophosphatidylcholine, a major peak of 522  $m/z$  18:1. The presence of three clusters of PE (34:1, 36:1 and 38:1) with variable insaturations was determined. PE and PC were also visualized in the negative mode, note the formate adduct form for PC. Phosphatidylinositol was visualized in the negative mode with a weak abundance, and the major peak was 861  $m/z$ , corresponding to 36:2. Phosphatidylserine was not detected in these samples.

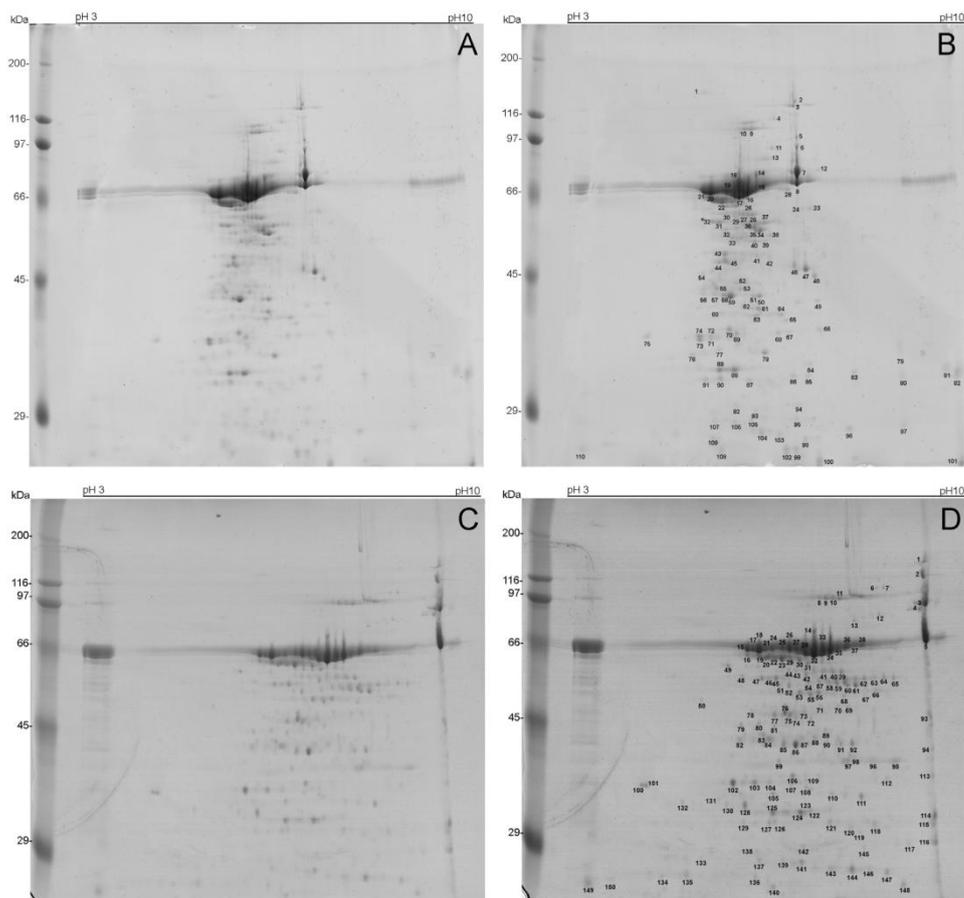
As shown in Fig. 7, the full scan of the chloroform fraction is enriched with TAG and DAG, and in the figure, only the major peaks of each cluster of pseudomolecular ion are emphasized. The fatty acid composition was determined firstly by NLS of fatty acids, followed by a selection of pseudomolecular ions, and finally, the fragmentation (CID); the results were compared to obtain the total fatty acid composition. As shown in Fig. 7, six clusters of TAG, with the sum of fatty acids ranging from 46 to 56 carbons and variable degrees of insaturation, were detected.

### 3.5. Brown spider hemocytes

The cellular analysis of *L. intermedia* hemolymph revealed 4 different populations of hemocytes. After hemolymph collection, slide preparation and May-Grunwald Giemsa staining, 3058 cells were analyzed. The most common cell type observed was the plasmatocyte. However, granulocytes, adipohemocytes, and prohemocytes were also identified. Plasmatocytes constituted 61% of the total cell population, followed by granulocytes, with 20%.



**Fig. 2.** Protein profile of *L. intermedia* hemolymph by SDS-PAGE (5–15% gradient). Hemolymph was collected in PBS containing 5% PIC, non-reduced and reduced sample buffer. A: 30  $\mu$ g stained with Coomassie Blue R-250; B: 3.5  $\mu$ g stained by the silver method.



**Fig. 3.** Two-dimensional protein profile of *L. intermedia* total hemolymph. A–B: SDS-PAGE 10%, pH 3–10 (100 µg). Hemolymph collected directly in rehydration buffer and protein content measured by 2D-Quant Kit (GE), stained with Coomassie. Molecular mass markers on the left. A: Total hemolymph profile. B: Spot identifications (MM and pls can be found on Table 1). C–D: SDS-PAGE 10%, pH 4–7 (150 µg). Hemolymph collected directly in rehydration buffer and protein content measured by 2D-Quant Kit (GE), stained with Coomassie. Molecular mass markers on the left. C: Total hemolymph profile. D: Spot identifications (MM and pls can be found on Table 2).

Adipohemocytes made up 15% of the hemocytes and prohemocytes only 4%.

Prohemocytes were small cells ranging from 5 to 10 µm, with a central and very dense nucleus, and showing a small cytoplasmic area without vesicles or granules (Fig. 8A-1). Granulocytes were large oval-shaped cells with characteristic highly basophilic granules of 30–40 µm in the cytoplasm (Fig. 8A-2). Adipohemocytes were large cells, but smaller than granulocytes (20–40 µm), and their nucleus showed loose chromatin. The main features of these cells were the lipid inclusions in the cytoplasm (Fig. 8A-3). This lipid content was well-characterized by Nile Red cytochemistry (Fig. 8B). Plasmatocytes presented a central nucleus containing condensed chromatin surrounded by an abundant but not well-delimited cytoplasm. Some vacuoles could be observed, but no granules were seen. Few cells presented cytoplasm projections, a feature that was described as a characteristic of this hemocyte type (Fig. 8A-4). Plasmatocytes and granulocytes from the brown spider hemolymph presented a very similar size (on average).

#### 4. Discussion

The driving reason to study the hemolymph of *L. intermedia* was our experience in toxinology studying the venom of these spiders over the last 20 years, characterizing its toxins and their biochemical and biological activities. Even biotechnological applications were noted during these studies. Hemolymph plays an important role in the immune system of these animals; it circulates in the whole body and is, eventually, in direct contact with the venom. Besides the immune physiological role and nutrition function of hemolymph, a putative protection action against the venom by the presence of toxin inhibitors must be considered and should be investigated hereafter. These features of hemolymph make it an interesting and medically important rich biological fluid in a venomous animal, such as the brown spider.

The protein and lipid content of an arthropod can vary depending on the species, age, and nutrition (Cappelari et al., 2009). Therefore, to evaluate the *L. intermedia* hemolymph

**Table 1**  
Identification of spots, their isoelectric points (pI) and molecular mass (MM), based on the two-dimensional gel pH 3–10 of Fig. 3B.

Spot	pI	MM (kDa)
1	5.50	139
2	7.15	126
3	7.12	121
4	6.76	110
5	7.17	98
6	7.17	90
7	7.17	73
8	7.16	68
9	6.37	103
10	6.23	103
11	6.72	90
12	7.55	75
13	6.64	83
14	6.43	73
15	6.43	66
16	6.28	65
17	6.12	63
18	6.12	69
19	5.89	65
20	5.61	65
21	5.49	65
22	5.82	62
23	7.40	60
24	7.25	60
25	6.35	58
26	6.27	58
27	6.19	58
28	6.99	65
29	6.05	57
30	5.89	59
31	5.76	56
32	5.64	56
33	5.88	54
34	5.98	52
35	6.49	54
36	6.41	54
37	6.39	55
38	6.57	56
39	6.66	53
40	6.57	51
41	6.39	51
42	6.42	48
43	6.49	47
44	5.84	48
45	5.74	46
46	5.86	46
47	7.09	45
48	7.29	45
49	7.45	44
50	7.50	40
51	6.45	41
52	6.35	41
53	6.05	43
54	6.11	42
55	5.45	44
56	5.69	42
57	5.44	42
58	5.64	41
59	5.82	41
60	5.94	41
61	5.78	39
62	6.43	40
63	6.33	40
64	6.39	39
65	6.84	39
66	6.93	38
67	7.53	37
68	6.98	37
69	6.78	37
70	6.03	37
71	5.90	37
72	5.57	36

**Table 1 (continued)**

Spot	pI	MM (kDa)
73	5.57	36
74	5.37	36
75	5.36	36
76	4.43	36
77	5.23	34
78	5.72	35
79	6.53	34
80	8.95	35
81	9.00	32
82	9.80	32
83	9.99	32
84	8.15	32
85	7.35	33
86	7.31	32
87	7.04	32
88	6.24	32
89	5.98	33
90	5.72	33
91	5.73	32
92	5.46	32
93	6	29
94	6.34	29
95	7.13	29
96	7.07	28
97	8.03	27
98	9.01	27
99	7.23	26
100	7.07	25
101	7.49	24
102	10	24
103	6.89	25
104	6.76	27
105	6.45	27
106	5.29	27
107	5.98	28
108	5.60	28
109	5.73	25
110	5.57	26
111	3.21	26

biochemical content and profile, a pool of hemolymph collected from adult males and females was used to perform this study. Hemolymph of other arthropods generally contains some already described proteins, such as hemocyanins (proteins found in complex with cooper that perform oxygen transport), hexamerins (nutrient storage as amino acids), lipophorins or lipoproteins (lipid transport), ferritins (present in iron complexes) and hormones (Chan et al., 2006; Tralalon et al., 2010).

Hemocyanin is described as one of the most abundant proteins present in the hemolymph of arthropods, presenting 70 kDa subunits. In Fig. 2, we observe a great band of protein at the ~66 kDa region, suggesting to be *L. intermedia* hemocyanin bands. Hemolymph studies of two mygalomorph spiders (*Eurypelma californicum* and *Eurypelma helluo*) showed that hemocyanins make up 80–82% of the total proteins. Analysis of two species of araneomorphs (*Nephila inaurata* and *Cupiennus salei*) found that this protein represents 70–95% of the total protein content from hemolymph (Tralalon et al., 2010).

Concerning the total amount of collected protein yield, *Rhipicephalus* sp. (tick) hemolymph presents 35 µg/µL (Angelo et al., 2010), a greater amount than the total protein concentration obtained for *L. intermedia* hemolymph in this study (25 µg/µL). Tralalon et al. (2010) analyzed the protein profile of hemolymph from the spider *Brachypelma albopilosa*, where the collected protein yield was also high, 54.9–65 µg/µL (subadult animals) and 61.6–74.8 µg/µL (adult animals). The SDS-PAGE 10–15% protein profile was very similar to the one obtained for *L. intermedia*: a three-protein band showing characteristic molecular masses. Two

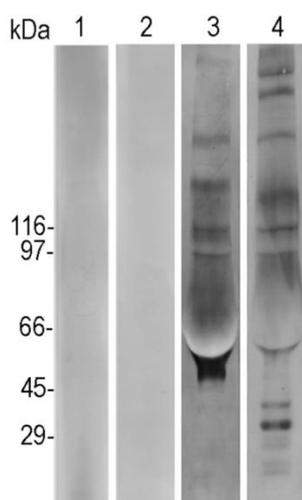
**Table 2**

Identification of spots, their isoelectric points (pI) and molecular mass (MM), based on the two-dimensional gel pH 4–7 of Fig. 3D.

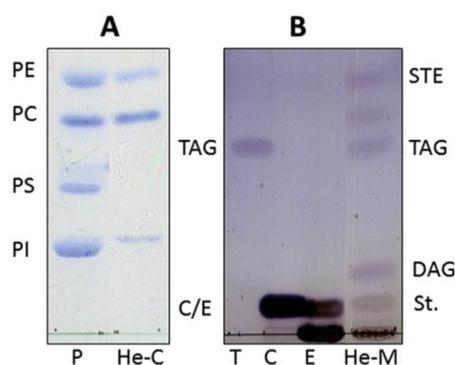
Spot	pI	MM (kDa)
1	6.74	140
2	6.73	117
3	6.75	94
4	6.70	90
5	6.75	67
6	6.36	106
7	6.42	106
8	5.90	99
9	5.96	99
10	6.01	99
11	6.07	99
12	6.38	85
13	6.18	80
14	5.86	72
15	5.33	64
16	5.33	62
17	5.38	63
18	5.43	63
19	5.43	61
20	5.50	61
21	5.48	64
22	5.55	61
23	5.61	61
24	5.53	64
25	5.61	64
26	5.67	64
27	5.72	64
28	5.80	62
29	5.67	61
30	5.75	60
31	5.81	59
32	5.86	62
33	5.93	63
34	6	63
35	6.06	64
36	6.12	64
37	6.19	65
38	6.24	65
39	6.08	57
40	6.01	57
41	5.94	57
42	5.80	56
43	5.72	57
44	5.66	57
45	5.56	55
46	5.50	55
47	5.45	55
48	5.29	56
49	5.18	59
50	4.97	50
51	5.60	53
52	5.66	53
53	5.75	51
54	5.82	54
55	5.84	51
56	5.90	52
57	5.90	54
58	5.96	54
59	6.04	54
60	6.11	54
61	6.19	53
62	6.27	55
63	6.35	55
64	6.42	55
65	6.50	55
66	6.35	52
67	6.27	51
68	6.10	51
69	6.13	48
70	6.06	48
71	5.93	48
72	5.84	45
73	5.79	47
74	5.72	45

**Table 2 (continued)**

Spot	pI	MM (kDa)
75	5.67	46
76	5.63	47
77	5.55	46
78	5.37	47
79	5.28	44
80	5.43	44
81	5.55	44
82	5.27	42
83	5.46	43
84	5.50	42
85	5.62	41
86	5.72	41
87	5.77	42
88	5.87	42
89	5.95	43
90	5.96	42
91	6.08	41
92	6.17	41
93	6.79	46
94	6.81	40
95	6.51	39
96	6.33	39
97	6.13	39
98	6.19	39
99	5.58	39
100	4.49	35
101	4.53	35
102	5.22	36
103	5.39	36
104	5.51	36
105	5.54	34
106	5.69	37
107	5.68	35
108	5.80	35
109	5.80	36
110	6.01	34
111	6.24	34
112	6.44	36
113	6.81	37
114	6.82	32
115	6.82	31
116	6.83	29
117	6.62	28
118	6.34	31
119	6.23	30
120	6.06	31
121	5.99	31
122	5.83	32
123	5.80	32
124	5.76	32
125	5.54	32
126	5.55	31
127	5.51	31
128	5.31	33
129	5.30	31
130	5.17	33
131	5.11	34
132	4.82	33
133	5.05	28
134	4.65	25
135	4.85	25
136	5.40	25
137	5.43	27
138	5.41	28
139	5.78	28
140	5.54	24
141	5.76	27
142	5.78	28
143	6.00	26
144	6.17	26
145	6.26	28
146	6.30	26
147	6.44	26
148	6.58	24
149	4.07	25
150	4.24	25



**Fig. 4.** Lectin blotting of total hemolymph from *L. intermedia*. 1: total hemolymph and SNA lectin, sialic acid identification; 2: total hemolymph and PNA lectin, galactose- $\beta$  (1-3)-N-acetylgalactosamine identification; 3: total hemolymph and DSA lectin, galactose- $\beta$  (1-4)-N-acetylglucosamine identification; 4: total hemolymph and GNA lectin, high mannose identification.



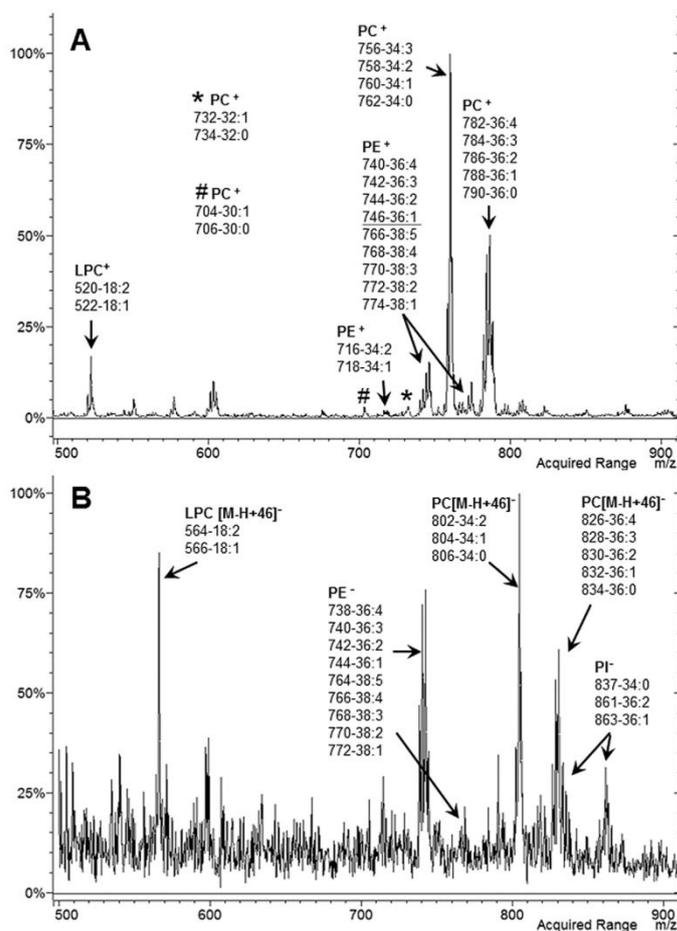
**Fig. 5.** Lipid profile of Brown spider hemolymph. A: HPTLC were developed in the solvent system chloroform:methanol:methylamine and stained with molybdenum blue. P: phospholipids standard containing PE (phosphatidylethanolamine), PC (phosphatidylcholine), PS (phosphatidylserine), PI (phosphatidylinositol), and He-C (hemolymph, fraction chloroform). B: HPTLC were developed in the solvent system hexane:ethyl ether:acetic acid and stained with 2 M sulfuric acid. T:TAG (triacylglycerol standard); C (cholesterol standard); E (ergosterol standard); He-M (hemolymph, fraction methanol); STE (steryl-ester); St (sterol); DAG (diacylglycerol).

predominant bands at ~116 and ~97 kDa and a greater band at ~66 kDa (Fig. 2). Regarding the other proteins, the profile is quite different; *B. albopilosa* shows enrichment of proteins with molecular mass higher than 100 kDa, and *L. intermedia* presents high molecular mass bands, but there is a great number of protein bands under ~66 kDa. Moreover, the subunits of hemocyanin from *B. albopilosa* where identified at 70, 35 and 65 kDa, and also some in positions higher than 100 kDa. The *L. intermedia* hemolymph profile presented analog bands at these regions, which reinforces the possibility that these are related to hemocyanin subunits.

The 2D-SDS-PAGE approach allowed the detection of a greater number of spots present in *L. intermedia* hemolymph. If we compare the profile obtained in Fig. 3 with hemolymph protein profiles from other arthropods, few differences are observed. For example, Bogaerts et al. (2009) studied the hemolymph 2DE profile of bees from the species *Apis mellifera* and found 110 spots (same number of spots observed in the present study). However, the spots from *A. mellifera* hemolymph were distributed in the pH 3–10 range, and proteins from the hemolymph of the *L. intermedia* brown spider are concentrated in the pH 5–7 region. The study of *B. Albopilosa* hemolymph showed 100 spots in the 2D analysis, but the protein profile is quite different from the one of *L. intermedia* (Fig. 3). In *B. albopilosa*, hemolymph proteins are focalized mainly in the neutral region of the gel, and they are enriched in the molecular mass range of 60–200 kDa, precisely the opposite of that observed for *L. intermedia* hemolymph. Gadwala et al. (2013) compared different methods for total protein solubilization of hemolymph from silkworm (*Bombyx mori*) and found an average of 110 spots in the 2DE analysis. Interestingly, only 11 different proteins were identified, among them, serine protease inhibitors, ubiquitin, lipoproteins, proteins associated to hormones and nuclear proteins. In the 2D gel of *L. intermedia* hemolymph, no bands approximately 200 kDa could be observed (Fig. 3); this fact could be due to the 10% gel used in the second dimension, because the SDS-PAGE from Fig. 2 was a 5–15% gradient. However, a 2DE gel was also performed using a gradient, and no spots could be detected at this range of molecular mass (data not shown), despite the fact that spots at this region were observed in the profiles of Fig. 2. Most likely, this high-mass content of hemolymph did not present sufficient protein amounts to be observed in the experimental conditions used. The 2DE using the pH 4–7 range was performed to better separate and define the spots on the central region of the first gel, between pHs 5–7, an aim that was achieved, as shown in Fig. 3C and D. The spots could be better detected, and a total number of 150 spots were detected, ~40 spots more than the initial approach.

The glycosylation of molecules is fundamental for their structure and function. Different studies had already shown the importance of glycidic residues on proteins, mainly on the arthropod larval development. Mariappa et al. (2011) showed the significance of the O-linked residues  $\beta$ -N-acetylglucosamine on the proteins of the embryos' mesoderm for the larval development and growth of *Drosophila* sp. For spider venom proteins, the process of glycosylation can be imperative for their activity and for the venom to exert its biological function (Veiga et al., 1999). The glycosylation profile of *L. intermedia* hemolymph did not show sialic acid or N-acetylglucosamine residues. The lectin-blotting of the *L. intermedia* venom was already studied and presented asparagine-linked high-mannose, complex-type structures as N-linked fucosylated molecules, serine/threonine-linked N-acetyl-galactosylated protein and the same absence in its glycosylation profile found herein in hemolymph (sialic acid and N-acetylglucosamine) (Veiga et al., 1999). These results were expected, as arthropods from the Arachnida class are known not to present sialic acid (Vimr et al., 2004).

The apolipoproteins from the hemolymph of the scorpion *Pandinus imperator* are N-glycosylated, and the majority of these saccharides are high mannose and galactose (Schenk et al., 2009). O-linked glycosylation was not identified in these apolipoproteins, as was observed in the *L. intermedia* hemolymph (N-acetylglucosamine). In addition, we presented a preliminary analysis of phospholipids, triacylglycerol and diacylglycerol constituents of the brown spider hemolymph. Prior to MS analysis, we performed a silica-gel column to separate the phospholipids from TAG, because signals from both can interfere in each other in the scan. As observed in other studies, PC was the major phospholipid



**Fig. 6.** Representative mass spectrometric analysis of phospholipids of Brown spider hemolymph. Phospholipid-enriched fractions from *Loxosceles intermedia* hemolymph were analyzed by ESI-MS in positive mode, panel A, and negative mode, panel B. The ion species corresponding to the phospholipids are indicated in the figure. LPC (lysophosphatidylcholine); PC (phosphatidylcholine); PE (phosphatidylethanolamine); PI (phosphatidylinositol);  $m/z$  (mass to charge ratio). LPC and PC in the negative mode are adducted with formate [M-H+46].

constituent, followed by PE and PI. In this study we were not able to detect PS in HPTLC or ESI-MS. The most abundant lipid observed was the TAG family, and we were able to determine at least six clusters (794  $m/z$ , 822  $m/z$ , 848  $m/z$ , 874  $m/z$ , 900  $m/z$ , and 922  $m/z$ ; major peaks only) composed of various combinations of fatty acid length and number of insaturations. Additionally, in minor amounts, two clusters of DAG (612  $m/z$  and 642  $m/z$ ) were observed. We were not able to detect glycolipids in *L. intermedia* hemolymph. Further detailed lipid composition analysis is necessary to assess the fatty acid composition of PLs, TAGs and DAGs, as well as analysis of sterol and steryl-ester using APCI as the ionization source.

In *Drosophila melanogaster* hemolymph, as well as in other arthropods, the major lipid is diacylglycerol (DAG), and the major phospholipid is phosphatidylethanolamine (PE) (Palm et al., 2012). In the hemolymph of the spider *Polybetes pythagoricus*, the most

abundant is phosphatidylcholine (Cunningham and Pollero, 1996), as was found in brown spider hemolymph herein (Fig. 6A and B). Caccia et al. (2012) found that insects store lipids as TAG in cells called adipohemocytes or in their fat body, but these lipids are carried in the hemolymph as DAG by the apolipoproteins. This result reinforces the high content of DAG in *L. intermedia* hemolymph.

The cells that circulate in hemolymph are called hemocytes. The brown spider hemocyte characterization was performed by morphological comparison to previously described hemocyte types and literature descriptions. There are few studies about spider hemocytes or its descriptions or images in the literature, thus, some identification was conducted based on insect hemocytes. A variety of cell types has been described in major arachnid taxa, presenting a confusing diversity of hemocyte types depending on the microscopic observation technique, the intensity of cell granulation and

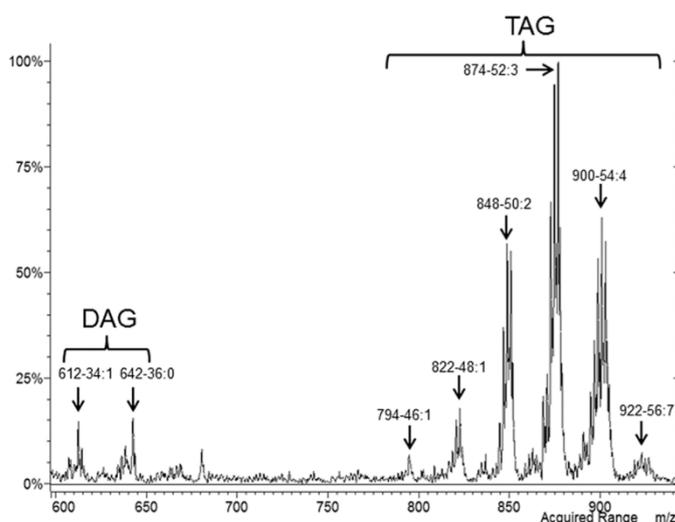


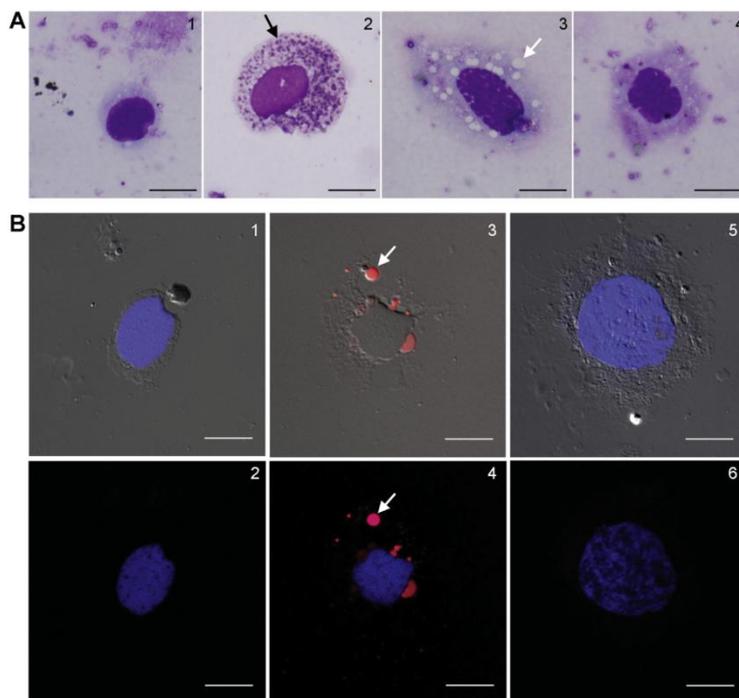
Fig. 7. Diacylglycerol (DAG) and triacylglycerol (TAG) mass spectrometric profile by ESI-MS of Brown spider hemolymph. DAG and TAG enriched fractions from *L. intermedia* hemolymph were analyzed by ESI-MS in positive mode. DAG and TAG species are identified as ammonium adducts  $[M+NH_4]^+$ , with peaks labeled according to the sum of the two or three fatty acids. Only major peaks are labeled for clarity.

ultrastructural characteristics. Often, the physiological status of the animal (e.g., pre- or post-moulting, healthy or infected), rapid cell transformation during the hemolymph-collecting process and/or maturation and secretion processes in hemocytes are neglected. For ticks, Borovicková and Hypsa (2005) describe prohemocytes and 3 or 4 hemocyte types, depending on species. An excellent review on hemocyte nomenclature for spiders (Sherman, 1981) summarizes four categories of different hemocyte types depending on the spider species. Sherman (1981) concluded that the confusing diversity of more than 20 names, which have been proposed for spider hemocytes, could be reduced to a few, among which granulocytes and plasmatocytes are the most common. Prohemocytes are rare in arthropod hemolymph, representing less than 5% of total cell population (Manachini et al., 2011). *L. intermedia* hemolymph contained 4% prohemocytes.

Plasmatocytes are abundant in hemolymph of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera), totalizing 29% of hemocytes (de Andrade et al., 2003), and make up 70–80% of the hemocytes in the spider *C. salei* (Kuhn-Nentwig et al., 2014). In *L. intermedia*, hemolymph plasmatocytes made up 61% of the hemocytes. Depending on the developmental stage, the granulocytes can present more or fewer granules (Gupta, 2009), but in *L. intermedia* hemolymph, only one type of granulocyte was identified. Adipohemocytes contained lipid inclusions of several sizes in its cytoplasm; these could be observed by MGG staining in Fig. 8A and by Nile Red cytochemistry in Fig. 8B. The positive fluorescence shown by the lipid content identified these cells as adipohemocytes. Because adipohemocytes could be mistaken as spherulocytes in light microscopy, we observed hemolymph in Phase Contrast Microscopy using DAPI for discrimination, and no refringent granules could be observed (data not shown). This discarded the spherulocytes as a possible hemocyte in brown spider hemolymph (Cook et al., 1985). Therefore, *L. intermedia* hemolymph presented 4 different hemocytes.

Studies concerning hemocytes have been of great interest over the last few years (Castillo et al., 2006; Caselín-Castro et al., 2010;

Soares et al., 2013; King and Hillyer, 2013). This is mainly due to the biological role of the hemocytes in the hemolymph, which is directly linked to the innate immunity of arthropods and their wound healing/regeneration responses (Lavine and Strand, 2002; Grigorian and Hartenstein, 2013; Silva et al., 2000; Fukuzawa et al., 2008; Domingues et al., 2013). The knowledge about arthropod immunity is relevant in the context of managing arthropod pests of agricultural and medical importance and for the protection of beneficial arthropods (such as honey bees) (Vijayendran et al., 2013). Prohemocytes are precursors of other cell types, but the source of these cells is still unknown in arachnids (Araújo et al., 2008). The plasmatocyte is involved in the phagocytosis process, as demonstrated by *in vitro* studies using hemocytes from the *Blaberus craniifer* cockroach (Anderson et al., 1973) and from the *Pseudoplusia includens* moth (Lavine and Strand, 2002). Granulocytes are most likely responsible for the secretion of antimicrobial peptides (AMP); a few pathways of the secretion of these molecules were identified in insects and arachnids (Lavine and Strand, 2002). Ceraul et al. (2003) described an antimicrobial peptide, named defensine, in the hemolymph of the *Dermacentor variabilis* tick. Another study described two antimicrobial peptides (gomesin and acanthoscurrin) stored in granules that are found in 57% of the hemocytes of tarantula spiders, *Acanthoscurria gomesiana* (Fukuzawa et al., 2008). Gomesin was efficient against gram positive and negative bacteria. Studies using a synthetic peptide showed that it was able to hamper the growing of filamentous fungus and yeast and that it also had moderate activity in the decrease of viability of the parasite *Leishmania amazonensis* (Silva et al., 2000). Rodrigues et al. (2008) described the anti-tumoral activity of gomesin by the successful topical use of this AMP in cancer treatment. Gomesin reduced the viability of B16F10-Nex2 murine melanoma and human cell lines (Rodrigues et al., 2008). More recently, studies have shown that the gomesin mechanism of cytotoxicity implicates calcium entry through L-type calcium channels,



**Fig. 8.** Cell Imaging Analysis of *L. intermedia* hemolymph. A: Hemocytes from *L. intermedia* hemolymph stained by May-Grünwald Giemsa: prohemocyte (1); granulocyte (2); adipohemocyte (3); plasmatocyte (4). Black arrows: cytoplasmic granules; white arrows: lipid inclusions. Bars: 10  $\mu\text{m}$ . B: Hemocytes from *L. intermedia* hemolymph stained by DAPI and Nile Red. Differential interference contrast (DIC) (1, 3 and 5) and fluorescence (2, 4 and 6) microscopy. Prohemocyte (1–2); adipohemocyte (3–4), plasmatocyte (5–6). White arrows: lipid inclusions stained by Nile Red. Bars: 10  $\mu\text{m}$ .

activation of MAPK/ERK, PKC and PI3K signaling, and generation of reactive oxygen species (Soletti et al., 2010). The secretion of these peptides (AMPs) is one of the most important defense strategies of the spiders, and it has been described in the hemolymph of many arthropods (Gidalevitz et al., 2003; Domingues et al., 2013; Fukuzawa et al., 2008; Ceraul et al., 2003; Fogaça et al., 2004; Matsuda et al., 2007; Baumann et al., 2010).

Other examples of molecules exhibiting interesting biological properties are from the hemolymph of the moths *Galleria mellonella* and *Manduca sexta*, which were able to inhibit metalloproteases and serine proteases, respectively (Vilcinskis and Wedde, 2002; Kanost, 1999). Moreover, a 30 kDa protein from the hemolymph of *B. mori* (silkworm) could protect Sf-9 cells from apoptosis, inhibiting the activation triggered by Sf-Caspase-I, and increasing cell viability in the culture (Rhee et al., 2002). Recently, two studies characterized *C. salei* hemocytes and the hematopoiesis and hematopoietic organs in arthropods (Kuhn-Nentwig et al., 2014; Grigorian and Hartenstein, 2013; respectively). As discussed by Kuhn-Nentwig, main aspects of the immune system in arachnids, such as the number and type of hemocyte differ astonishingly among the various arachnid groups, making extrapolations and prognoses very difficult. *Loxosceles intermedia* hemocyte characterization is the first approach to better understand the hemolymph of this spider and will allow the exploration of these cells as a source of biologically active molecules that can be used biotechnologically as antimicrobial peptides. The value of its proteins

and lipids, characterized herein, is also relevant as completely unstudied molecules whose potential applications are to be studied and described.

Ultimately, the study of *L. intermedia* hemolymph was conducted based not only on the spider's venomous aspect or its relevance for the regions where its domiciliary presence is endemic with bite cases but also on the complete lack of scientific information and characterization of this biological fluid. Other studies with respect to molecules from arthropod hemolymph, whose putative biotechnological potential have been highlighted, were also a motivation for this research.

#### Acknowledgments

We thank Pedro Ismael da Silva Júnior, PhD (Butantan, SP) for the scientific discussions concerning hemocyte collection and analysis; Herculano Salviano dos Reis Filho for technical assistance and support with light microscopy techniques; Almeriane Maria Weffort Santos, PhD (Hematology Laboratory, UFPR) and Maria Suely Soares Leonart, PhD (Cytology Laboratory, UFPR) for the Cytospin centrifuge and scientific discussions; Thelma Alvim Veiga Ludwig, PhD (Botanic Department, UFPR) for the support and assistance with the BX40 microscope. This work was supported by CAPES (Toxinologia - CAPES 2011, Proj.2), CNPq (Universal 14/2012: processo 479480/2012-5; proc. 472587/2011-0), Fundação Araucária, SETI-PR and FAPESP (2006/07005-4; 2010/52426-3).

## Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.008>.

## References

- Anderson, R., Holmes, B., Good, R.A., 1973. *In vitro* bactericidal capacity of *Blaberus craniifer* hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 22 (1), 127–135.
- Angelo, L.C., Gólo, P.S., Camargo, M.G., Kluck, G.E.G., Folly, E., Bittencourt, V.R.E.P., 2010. Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. *Transbound. Emerg. Dis.* 57, 79–83.
- Araújo, H.C.R., Cavalcanti, M.G.S., Santos, S.S., Alves, L.C., Brayner, F.A., 2008. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Micron* 39, 184–189.
- Baumann, T., Kuhn-Nentwig, L., Largiadèr, C.R., Nentwig, W., 2010. Expression of defensins in non-infected araneomorph spiders. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2643–2651.
- Bogaerts, A., Baggerman, G., Vierstraete, E., Schoofs, L., Verleyen, P., 2009. The hemolymph proteome of the honeybee: gel-based or gel-free? *Proteomics* 9, 3201–3208.
- Borovicková, B., Hypsa, V., 2005. Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. *Exp. Appl. Acarol.* 35 (4), 317–333.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–255.
- Busik, J.V., Reid, G.E., Lydic, T.A., 2009. Global analysis of retina lipids by complementary precursor ion and neutral loss mode tandem mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 579, 33–70.
- Caccia, S., Grimaldi, A., Casartelli, M., Falabella, P., Eguileor, M., Pennacchio, F., Giordana, B., 2012. Functional analysis of a fatty acid binding protein produced by *Aphidius ervi* teratocytes. *J. Insect Physiol.* 58, 621–627.
- Cappelari, F.A., Turcatto, A.P., Morais, M.M., de Jong, D., 2009. Africanized honey bees more efficiently convert protein diets into hemolymph protein than do Carniolan bees (*Apis mellifera carnica*). *Genet. Mol. Res.* 8 (4), 1245–1249.
- Carneiro, M.E., Daemon, E., 1996. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Ixodoidea, Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. *Rev. Bras. Zool.* 13, 609–620.
- Caselin-Castro, S., Llanderal-Cázares, C., Méndez-Gallegos, S.J., Ramírez-Cruz, F.C., Hernández-Hernández, A., 2010. Hemocytes of the cochineal insect: ultrastructure. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 73, 176–192.
- Castillo, J.C., Robertson, A.E., Strand, M.R., 2006. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 891–903.
- Castro, A., Pineiro, B., Lendoiro, E., Cruz, A., López-Rivadulla, M., 2013. Quantification of selected synthetic cannabinoids and 9-tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1295, 99–106.
- Ceraul, S.M., Sonenshine, D.E., Ratzlaff, R.E., Hynes, W.L., 2003. An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1099–1103.
- Chaim, O.M., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A.C.M., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Mangili, O.C., da Silveira, R.B., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2011. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. *Toxins* 3, 309–344.
- Chan, Q.W.T., Howes, C.G., Foster, L.J., 2006. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 2252–2262.
- Cook, D., Stoltz, D.B., Pauley, C., 1985. Purification and preliminary characterization of insect hemolymph. *Insect Biochem.* 15 (3), 419–426.
- Cunningham, M., Pollero, R., González, A., 1994. Lipid circulation in spiders. Transport of phospholipids, free acid and triacylglycerols as the major lipid classes by high-density lipoprotein fraction isolated from plasma of *Polybetes pythagoricus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* 109, 333–338.
- Cunningham, M., Pollero, R.J., 1996. Characterization of lipoprotein fractions with high content of hemocyanin in the hemolymphatic plasma of *Polybetes pythagoricus*. *J. Exp. Zool.* 274, 275–280.
- Domingues, T.M., Mattei, B., Seelig, J., Perez, K.R., Miranda, A., Riske, K.A., 2013. Interaction of the antimicrobial peptide gomesin with model membranes: a calorimetric study. *Langmuir* 29, 8609–8618.
- dos Santos, L.D., Dias, N.B., Roberto, J., Pinto, A.S., Palma, M.S., 2009. Brown recluse spider venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. *Protein Pept. Lett.* 16 (8), 933–943.
- de Andrade, F.G., de Negreiro, M.C.C., Gregório, E.A., Moscardi, F., Falleiros, A.M.F., 2003. Hemocytes of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: morphological and quantitative studies. *Acta Microsc.* 12 (1), 59–64.
- Fernandes-Pedrosa, M.F., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Kobashi, L.S., Almeida, D.D., Ho, P.L., Tambourgi, D.V., 2008. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics* 9, 279.
- Fogaça, A.C., Lorenzini, D.M., Kaku, L.M., Esteves, E., Bulet, F., Daffre, S., 2004. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 191–200.
- Fukuzawa, A.H., Vellutini, B.C., Lorenzini, D.M., Silva Junior, P.I., Mortarad, R.A., Silva, J.M.C., Daffre, S., 2008. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 716–725.
- Gadwala, M., Kari, N., Moger, N., Vootla, S.K., 2013. Effective solubilization procedure for analysis of silkworm hemolymph proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169 (4), 1459–1466.
- Gidalevitz, D., Ishitsuka, Y., Muresan, A.S., Konovalov, O., Waring, A.J., Lehrer, R.I., Lee, K.Y.C., 2003. Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes. *PNAS* 100, 6302–6307.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler, S.D., 1985. Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* 100, 965–973.
- Gremski, L.H., da Silveira, B.R., Chaim, O.M., Probst, M.C., Ferrer, V.P., Nowatzki, J., Weinschutz, H.C., Madeira, H.M., Gremski, W., Nader, H.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2010. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol. Biosyst.* 6 (12), 2403–2416.
- Gremski, L.H., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Meissner, G.O., Wille, A.C., Vuitika, L., Dias-Lopes, C., Ulla, H.A., de Moraes, F.R., Chávez-Olortegui, C., Barbaro, K.C., Murakami, M.T., Arni, R.K., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2014. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: from the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon* 83, 91–120.
- Grigorian, M., Hartenstein, V., 2013. Hematopoiesis and hematopoietic organs in arthropods. *Dev. Genes Evol.* 223 (1–2), 103–115.
- Guan, X.L., Riezman, I., Wenk, M.R., Riezman, H., 2010. Yeast lipid analysis and quantification by mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 470, 369–391.
- Gupta, A.P., 2009. *Insect Hemocyte*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 85–128.
- Hernández-Martínez, S., Lanz-Mendoza, H., Martínez-Barnette, J., Rodríguez, M.H., 2013. Antimicrobial properties of *Anopheles albimanus* pericardial cells. *Cell. Tissue Res.* 351, 127–137.
- Jalal, F., Mushtaq, S., Parvez, S., Rana, S.A., Suhail, A., 2010. Partial characterization of hemolymph of different spider species of citrus orchards. *Int. J. Agric. Biol.* 12, 447–450.
- Kanost, M.R., 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 291–301.
- King, J.G., Hillyer, J.F., 2013. Spatial and temporal *in vivo* analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. *BMC Biol.* 11, 55.
- Kuhn-Nentwig, L., Kopp, L.S., Nentwig, W., Haenni, B., Streitberger, K., Schürch, S., Schaller, J., 2014. Functional differentiation of spider hemocytes by light and transmission electron microscopy, and MALDI-MS-imaging. *Dev. Comp. Immunol.* 43 (1), 59–67.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295–1309.
- Machado, L.F., Laugesen, S., Botelho, E.D., Ricart, C.A.O., Fontes, W., Barbaro, K.C., Roepstorff, P., Sousa, M.V., 2005. Proteome analysis of brown spider venom: identification of Ioxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics* 5 (8), 2167–2176.
- Manachini, B., Arizza, V., Parrinello, D., Parrinello, N., 2011. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 360–365.
- Mariappa, D., Sauer, K., Mariño, K., Turnock, D., Webster, R., Van Aalten, D.M.F., Ferguson, M.A.J., Müller, H.J., 2011. Protein O-glcacylation is required for fibroblast growth factor signaling in drosophila. *Sci. Signal.* 4 (204), 1–8.
- Matsuda, Y., Osaki, T., Hashii, T., Koshihata, T., Kawabata, S.A., 2007. Cysteine-rich protein from an arthropod stabilizes clotting mesh and immobilizes bacteria at injury sites. *J. Biol. Chem.* 282, 33545–33552.
- Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T.V., Shevchenko, A., Schwudke, D., 2008. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* 49, 1137–1146.
- Nguyen, L.N., Kadereit, B., Trafa, D., Agovino, M., Martinez, L.R., Gacser, A., Silver, D.L., Nosanchuk, J.D., 2011. *Candida parapsilosis* fat storage-inducing transmembrane (FIT) protein 2 regulates lipid droplet formation and impacts virulence. *Microbes Infect.* 13 (7), 663–672.
- Palm, W., Sampaio, J.L., Brankatschk, M., Carvalho, M., Mahmoud, A., Shevchenko, A., Eaton, S., 2012. Lipoproteins in *Drosophila melanogaster*—assembly, function, and influence on tissue lipid composition. *PLoS Genet.* 8 (7), 1–18.
- Paludo, K.S., Gremski, L.H., Veiga, S.S., Chaim, O.M., Gremski, W., Buchi, D.F., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Franco, C.R.C., 2006. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. *Toxicon* 47, 844–853.
- Rhee, W.J., Kim, E.J., Park, T.H., 2002. Silkworm hemolymph as a potent inhibitor of apoptosis in S9 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 779–783.
- Rodrigues, E.G., Dobroff, A.S.S., Cavarsan, C.F., Paschoalin, T., Nimrichter, L., Mortara, A.R., Santos, E.L., Fázio, M.A., Miranda, A., Daffre, S., Travassos, L.R., 2008. Effective topical treatment of subcutaneous murine B16F10-Nex2 melanoma by the antimicrobial peptide gomesin. *Neoplasia* 10, 61–68.
- Schenk, S., Cras, H., Marksteiner, D., Patasik, L., Promnitz, B., Hoeger, U., 2009. The *Pandinus imperator* haemolymph lipoprotein, an unusual phosphatidylserine carrying lipoprotein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 735–744.
- Sherman, R.G., 1981. Chelicerates. In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), *Invertebrate*

- Blood Cells. Academic Press, New York, pp. 355–384.
- Silva Jr., P.I., Daffre, S., Bulet, P., 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J. Biol. Chem.* 275 (43), 33464–33470.
- Soares, T., Cavalcanti, M.G.S., Ferreira, F.R.B., Cavalcanti, M.S.M., Alves, L.C., Brayner, F.A., Paiva, P.M.G., 2013. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Lasiadora* sp. (Koch, 1850) (Araneae: Theraphosidae). *Micron* 48, 11–16.
- Söderhall, K., Smith, V.J., 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 229–239.
- Soletti, R.C., Del Barrio, L., Daffre, S., Miranda, A., Borges, H.L., Moura-Neto, V., Lopez, M.G., Gabilan, N.H., 2010. Peptide gomesin triggers cell death through L-type channel calcium influx, MAPK/ERK, PKC and PI3K signaling and generation of reactive oxygen species. *Chem. Biol. Interact.* 186, 135–143.
- Tagliari, L., Toledo, M.S., Lacerda, T.G., Suzuki, E., Straus, A.H., Takahashi, H.K., 2012. Membrane microdomain components of *Histoplasma capsulatum* yeast forms, and their role in alveolar macrophage infectivity. *Biomembranes* 1818, 458–466.
- Toledo, M.S., Suzuki, E., Straus, A.H., Takahashi, H.K., 1995. Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 33 (4), 247–251.
- Trabalon, M., Carapito, C., Voinot, F., Martrette, J.M., Dorselaer, A.V., Gilbert, C., Bertile, F., 2010. Differences in *Brachypelma albopilosa* (Theraphosidae) hemolymph proteome between subadult and adult females. *J. Exp. Zool.* 313, 651–659.
- Veiga, S.S., Gremski, W., Santos, V.L.P., Feitosa, L., Mangili, O.C., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Brentani, R.R., 1999. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon* 37, 587–607.
- Vijayendran, D., Aird, P.M., Dolezal, K., Bonning, B.C., 2013. Arthropod viruses and small RNAs. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 186–195.
- Vilcinskis, A., Wedde, M., 2002. Insect inhibitors of metalloproteinases. *IUBMB Life* 54, 339–343.
- Vimr, E.R., Kalivoda, K.A., Deszo, E.L., Steenbergen, S.M., 2004. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (1), 132–153.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P., Hancock, R., 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 118, 197–203.
- Zachariah, T.T., Mitchell, M.A., 2009. Vitamin D3 in the hemolymph of goliath birdeater spiders (*Theraphosa blondi*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 40, 344–346.

## 6- CAPÍTULO 2

Neste capítulo 2 estão descritos os ensaios e resultados que foram obtidos posteriormente à confecção e publicação do artigo científico Bednaski *et al.*, 2015. Nesta etapa do estudo objetivou-se a identificação de moléculas bioativas e ensaios que ajudassem a entender melhor como a hemolinfa poderia proteger a aranha da ação de seu próprio veneno.

## 7- OBJETIVOS

### Objetivo geral

Realizar os estudos de proteômica da hemolinfa de *Loxosceles intermedia*, bem como, caracterizar os diferentes tipos de hemócitos. Realizar estudos de avaliação da atividade biológica da hemolinfa e identificação de moléculas bioativas.

### Objetivos específicos

- Realizar caracterização ultraestrutural e celular dos hemócitos presentes na hemolinfa de *L. intermedia*;
- Realizar estudo proteômico do conteúdo total da hemolinfa de *L. intermedia*;
- Realizar ensaios biológicos que investiguem a atividade da hemolinfa de *L. intermedia* frente ao veneno, possibilitando a identificação de moléculas com potencial biotecnológico.

## 8- MATERIAL E MÉTODOS

### 8.1. Coleta de hemolinfa

A hemolinfa foi coletada de aranhas-marrons adultas (fêmeas e machos), obtidas do meio ambiente e mantidas temporariamente no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos (LME) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil (Autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) - anexo 2).

As aranhas foram anestesiadas por resfriamento (-20°C) por aproximadamente 1 min e imobilizadas com a região dorsal voltada para cima. Em seguida a hemolinfa de *L. intermedia* foi coletada diretamente do vaso dorsal principal da aranha com auxílio de micropipeta. A hemolinfa foi depositada em microtubo com PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, pH 7,4) contendo 5% do de coquetel de inibidores de proteases - CIP (*Protease inhibitor cocktail for mammalian tissues*, Sigma)(Componentes: AEBSF; Aprotinin; Bestatin; E-64; Leupeptin; Pepstatin A) ou em tampão citrato anticoagulante (98 mM NaOH; 186 mM NaCl; 17 mM EDTA e 41 mM ácido cítrico, pH 4,5) na proporção de 1 de hemolinfa: 2 de tampão (v/v) (adaptado de SÖDERHALL; SMITH,1983).

#### 8.1.1. Obtenção da fração celular e fração plasmática

Após a coleta, a hemolinfa foi centrifugada 800 g por 15 min a 4°C (adaptado de FUKUZAWA, 2008). O *pellet* formado representa a fração celular e o sobrenadante representa a fração livre de células (plasma), a qual foi armazenada em um novo microtubo. Para extração das proteínas da fração celular as células foram lisadas por resfriamento (-20°C).

### 8.1.2. Dosagem de proteínas

Para a quantificação de proteínas totais da hemolinfa foi utilizado o método de dosagem de proteínas por Coomassie Blue (BioRad), descrito por Bradford (1976).

O método se baseia em uma curva, tendo como a equação da reta seis pontos confiáveis,  $A(x_A, y_A)$ , e o coeficiente angular  $B$  dessa reta. Nesse método, a curva é baseada em concentrações conhecidas de BSA e a aquisição da absorbância é feita em espectrofotômetro (Median, modelo-ELx800) em excitação de 610 nm. As amostras dosadas apresentam uma quantidade de proteínas de acordo com pontos da reta. Fez-se o cálculo com a equação da reta  $Y = Ax - B$ , onde  $Y$  = média das absorbâncias das amostras;  $A$  = inclinação da reta (ângulo) e  $B$  = o ponto em que a reta encontra o eixo  $Y$  e o  $X$ . A concentração de proteínas foi dada em  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 8.2. Atividade Esfingomielinásica

Para avaliar a possível interferência da hemolinfa na atividade da toxina dermonecrótica recombinante (LiRecDT1) foi utilizado o Kit Amplex Red Assay® (Molecular Probes, Eugene, USA).

A reação do Kit Amplex Red® mensura a atividade indireta da toxina LiRecDT1 da seguinte forma: a toxina LiRecDT1 age sobre seu substrato, a esfingomielina, hidrolisando-a em colina e ceramida 1-fostato. A colina é oxidada por uma oxidase e gera peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A enzima *peroxidase horseradish* utiliza o  $\text{H}_2\text{O}_2$  para oxidar o reagente Amplex Red® na proporção de 1:1, resultando no composto fluorescente *resorufin*. A fluorescência é mensurada em espectrofluorímetro (TECAN-RCHISTO INFINITE M200) com excitação em 560 nm e emissão em 590 nm.

O teste foi realizado nas condições sugeridas pelo fabricante.

A hemolinfa foi coletada em microtubo contendo PBS e 5% de CIP conforme descrito anteriormente no item 8.1 (Material e métodos - Capítulo 2). Para verificar a interferência da atividade foi utilizado 30  $\mu\text{g}$  de proteínas

totais da hemolinfa para 1 µg de LiRecDT1. A incubação foi de 30 min a 37°C, protegida da luz. Utilizou-se a toxina LiRecDT1 atuando sobre seu substrato na ausência da hemolinfa como controle.

O ensaio foi realizado em pentaplicada técnica e triplicata biológica.

A análise estatística da atividade da LiRecDT1 foi realizada com análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Os dados foram comparados em GraphPad na versão 3.000 para Windows. Média e desvio padrão na significância de  $p \leq 0,001$ .

### **8.3. Western Blotting**

A hemolinfa foi coletada em tampão citrato conforme descrito anteriormente no 8.1 (Material e métodos - Capítulo 2). A coleta de hemolinfa foi realizada a partir de secções das pernas para não haver nenhuma possibilidade de contaminação com toxinas do veneno. Para separar a fração celular (*pellet*) e a fração plasmática (plasma) a hemolinfa foi centrifugada a 800 g por 15 min a 4°C. Foi realizado gel gradiente 5 a 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições redutoras com 20 µg de proteínas de cada fração (*pellet* e plasma).

As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com PBS contendo caseína (3%), por 1 h, à temperatura ambiente. Em seguida, a nitrocelulose foi incubada com o anticorpo monoclonal produzido em camundongo, que reconhece um epítipo específico da LiRecDT1, gentilmente cedido pelo Professor Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui da UFMG (DIAS-LOPES *et al.*, 2014). O anticorpo monoclonal foi utilizado na concentração de 10 µg/ml e a incubação de 1 h foi realizada em temperatura ambiente. Foi utilizado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo na diluição 1:8000 por 1 h em temperatura ambiente, conjugado à fosfatase alcalina.

Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes por 3 min com PBS e lavada uma vez por 5 min com tampão ótimo para fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl<sub>2</sub> 5 mM). Para revelação foi utilizado o substrato para a enzima fosfatase alcalina, o composto BCIP

(Promega, Madison, EUA). Após a remoção do grupamento fosfato pela enzima, o BCIP forma um dímero insolúvel na reação com composto NBT (Promega, Madison, EUA), resultando em sua precipitação (HARLOW e LANE, 1988).

#### **8.4. Ensaio de toxicidade**

Foram utilizados camundongos (cerca de 35 g) obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (Certificado do Comitê de Ética nº547, processo: 23075.086737/2011-02, anexo 3). As toxinas do veneno e as proteínas totais da hemolinfa foram injetadas no peritônio dos animais e a ação das toxinas foi observada ao longo de 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h e 48h. Os grupos testados foram: 1) controle positivo: tratado com 285 µg/kg de veneno de *L. intermedia*; 2) grupo controle: tratado apenas com PBS; 3) tratado com 715 µg/kg de hemolinfa total; 4) tratado com 1.430 µg/kg de hemolinfa total; 5) tratado com 2.860 µg/kg de hemolinfa total; 6) tratado com 5.715 µg/kg de hemolinfa total; 7) tratado com 14.285 µg/kg de hemolinfa total. Cada grupo tratado ou controle foi formado por 3 animais com pesos e idades semelhantes. Os parâmetros observados no teste foram os comportamentos de *grooming* (autolimpeza), agitação, coceiras alérgicas/urticárias e letalidade (PARASURAMAN, 2011).

#### **8.5. Cultivo primário de hemócitos**

Os hemócitos foram coletados em meio Sf-900-III SFM (ThermoFisher) contendo 250 µg/ml de gentamicina (INLAB) e 10% de soro fetal bovino. As células foram plaqueadas em placa de cultura estéril (35x10 mm) na concentração de  $2 \times 10^3$  cel/ml, com volume final de 600 µl de meio. As células foram mantidas em B.O.D. a 28°C, sem CO<sub>2</sub>. A morfologia celular, aderência ao substrato e crescimento de microrganismos foram avaliados por 3 dias consecutivos por meio da observação das células em microscópio óptico invertido (Leica - DMIL).

### **8.5.1 Ensaio *in vitro* do comportamento dos hemócitos frente à incubação com o veneno de *L. intermedia* e com a toxina recombinante LiRecDT1**

Os hemócitos foram plaqueados em placa estéril (35x10 mm) e aderidos por 30 min a 28°C sem CO<sub>2</sub>. Foram formados quatro grupos, sendo dois grupos controles e dois grupos com toxinas. Grupo 1: controle, hemócitos incubados em meio Sf-900-III SFM; grupo 2: controle, hemócitos incubados em meio Sf-900-III SFM com 46% de PBS (v/v); grupo 3: hemócitos incubados com veneno de *L. intermedia* (42 µg/ml); grupo 4: hemócitos incubados com de LiRecDT1-GFP (42 µg/ml). A toxina recombinante LiRecDT1-GFP é a toxina LiRecDT1 (*Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxin 1*) fusionada a proteína verde fluorescente (GFP) e foi utilizada para visualização da interação entre a toxina recombinante e os hemócitos.

As células foram mantidas em temperatura controlada de 28°C sem CO<sub>2</sub> e fotografadas a cada 20 min por um período total de 18 h, em microscópio confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japan), utilizando o software “Nis Elements 4.20 Advanced Research” em objetivas 20x (com abertura numérica de 0.75). A observação das células foi realizada por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC: *Differential Interference Contrast*), usando laser de excitação de 488 nm. A captura das imagens foi realizada por detector de luz transmitida com filtro de intervalo (*band pass*) de 500-550nm. O software NIS-Elements AR Analysis 4.20.01 foi utilizado para a formatação e ajustes das imagens.

### **8.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Esta etapa foi realizada em colaboração com a Professora Dr<sup>a</sup>. Lucélia Donatti do Departamento de Biologia Celular da UFPR.

Os hemócitos foram coletados em tampão citrato, conforme protocolo descrito anteriormente no item 8.1 (Material e métodos – Capítulo 2). As células foram fixadas por 1 h com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Em seguida foram lavadas em tampão cacodilato de sódio, pós-fixados com tetróxido de ósmio 2% e contrastadas com uranila 2% por 2 h (SANTOS,1999). As amostras foram então desidratadas em séries crescentes de etanol (Merck®) e incluídas em resina Poli Embed 812 (Electronmicroscopysciences). Após polimerização em estufa a 60°C por 72 h, os blocos foram trimados e cortes semi-finos foram obtidos e corados com azul de toluidina borificado 1%. Em seguida, os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 5% durante 20 min e citrato de chumbo por 5 min.

As imagens foram analisadas e capturadas no microscópio eletrônico de transmissão da marca Joel, modelo JEM 1200EXII Electron Microscope do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

### **8.7. Citometria de fluxo**

Para análise dos hemócitos por citometria de fluxo (FACS Area II - BD®) a hemolinfa foi coletada em tampão citrato e as células vivas foram separadas em quatro grupos: células não marcadas (controle); células marcadas com 75 nM LysoTracker® Red DND-99 - Special Packaging (ThermoFisher); células marcadas com 100 nM MitoTracker® Red CMXRos (ThermoFisher) e células marcadas com 5 µg/ml da lectina WGA (*Wheat germ agglutinin*) conjugada a Alexa Fluor® 594 (ThermoFisher), seguindo as recomendações dos fabricantes. As marcações foram realizadas para facilitar a separação das quatro populações de hemócitos: os pró-hemócitos, os plasmatócitos, os granulócitos e os adipohemócitos.

Para a excitação dos fluoróforos MitoTracker e LysoTracker foi utilizado o laser de 488 nm e para excitação do fluoróforo Alexa 594 o laser utilizado foi 633 nm. O filtro “PE – A”: 585/42 (564 até 606) foi utilizado para analisar as células marcadas com a lectina WGA conjugada a Alexa Fluor® 594 e para

células marcadas com o LisoTracker. O filtro “PE - texas red”: 616/23 (604,5 até 627,5) foi utilizado para as células coradas com o MitoTracker.

Após realização do *sorting* das populações selecionadas, as células foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído (Sigma-Aldrich) por 1 h. Em seguida, foram centrifugadas 800 g por 15 min e lavadas com 1 mL de tampão citrato. As células foram centrifugadas 800 g por 15 min e aderidas por 1 h em lâminas previamente lavadas e deixadas a 230°C por 2 h. As lâminas continham Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich) para melhor adesão dos hemócitos. As células foram coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa (MGG). Primeiramente, as células foram coradas com o corante May-Grunwald por 1 min; o corante foi diluído na proporção de 1:1 (v/v) com água destilada e as células foram coradas por mais 1 min. Em seguida, as células foram coradas por 4 min com o corante Giemsa diluído previamente em água na proporção de 1:20 (v:v); o excesso de corante foi lavado em água corrente. Após a coloração as lâminas foram montadas com Fluoromont G (Electron Microscopy Sciences). As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio BX51 (Olympus System Microscopes) equipado com o software de captura Cell (2008, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) acoplado a câmera DP72.

### **8.8. Proteômica *shotgun***

A análise proteômica foi realizada em colaboração com o pesquisador Dr. Paulo Costa Carvalho do ICC (Instituto Carlos Chagas-PR).

A hemolinfa foi coleta após a extração de veneno em tampão bicarbonato de amônio com ureia ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,4 M e Ureia 8M). Para separar as proteínas maiores e menores de 10 kDa foi utilizado ultrafiltro para pequenos volumes com *cut off* de 10kDa (Milipore - Darmstadt, HE, Alemanha). Primeiramente, o filtro foi bloqueado com PBS-Tween-20 0,1% por 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, o filtro foi equilibrado com o tampão bicarbonato de amônio e a hemolinfa foi filtrada por centrifugação a 3000 g em temperatura ambiente por 24 min. As frações acima e abaixo de

10 kDa foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976) adaptado para microplaca, utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

Todos os procedimentos descritos abaixo foram realizados igualmente para as duas frações obtidas (maior e menor de 10 kDa). As proteínas foram reduzidas com ditioneitol (DTT) 25 mM por 3 h a 22°C com e alquiladas com iodoacetamida 80 mM por 15 min a 22°C.

Posteriormente, cada uma das frações foi dividida em 5 amostras, sendo 1 mantida sem digestão e 4 amostras foram utilizadas para digestão com diferentes enzimas: tripsina (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade*, Promega Corporation, Madison, WI, USA) 4 h ou 18 h de incubação a 37°C; quimotripsina (Promega) 18 h de incubação a 25°C; e pepsina (Promega) 18 h de incubação a 37°C. Todas as enzimas foram utilizadas na proporção 1:50 (enzima:substrato).

As amostras digeridas e não-digeridas foram ligadas a um filtro C-18 (*Stage-tip*), lavadas 2 vezes com solução A (ácido fórmico 0,1%). As amostras foram eluídas com 100% de acetonitrila (ACN), secas em *speed vac* 1,5 h e então solubilizadas em  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM + 25% de ACN. Após ressuspensão, os peptídeos foram ligados a coluna de troca iônica (*Strong Cation* - SCX) e foram eluídos em concentrações crescentes de NaCl (100 mM, 170 mM, 290 mM, 400 mM) determinadas em ensaio piloto. As amostras foram secas em *speed vac* por 2 h. Em seguida foram ressuspensas em solução A e purificadas em C-18 (*stage-tip*). As colunas de C-18 com os peptídeos ligados foram lavadas 10 vezes com solução A para garantir a retirada do sal e os peptídeos foram armazenados nos *stage-tips* até o momento das amostras serem injetadas no espectrômetro de massas (LTQ Orbitrap XL ETD, Thermo Scientific).

Após lavagem e eluição em ACN 80% e ácido fórmico 0,1%, as amostras foram submetidas a HPTLC acoplada ao Orbitrap, em fluxo de 5-40% ACN em 0,5% de ácido fórmico. Os peptídeos foram ionizados por nano *electrospray* (voltagem de 2,3 kV) e injetados no espectrômetro de massas. Os espectros MS foram obtidos em modo varredura completa (m/z 350 a 1800) em analisador Orbitrap com resolução de 60.000 em m/z 400,

seguido de seleção dos 3 íons mais intensos, os quais foram fragmentados por CID, HCD, ETD. Na seleção dos íons foi usada uma lista de exclusão de 60 seg.

Os arquivos gerados (.RAW) foram analisados nos softwares Peaks (2015) e PepExplorer. O software Peaks foi utilizado para sequenciamento *de novo* (score de 75) a partir dos dados de espectrometria de massa e as sequências obtidas foram utilizadas para análise no software PepExplorer, no qual foram realizadas buscas por similaridade em um banco composto por sequências de organismos da classe Insecta e Arachnida. O banco de dados foi composto por sequências obtidas do por FASTA do UniPro. Os espectros teóricos foram confrontados com o banco de dados e apenas aqueles com score de 75 e similaridade de 85% foram considerados

### **8.9. Atividade Antimicrobiana**

Para esse ensaio, a hemolinfa foi coletada em tampão citrato e centrifugada 800 g por 15 min a 4°C para a obtenção da fração celular (*pellet*). Além disso, a fração plasmática (plasma) e uma amostra sem fracionamento (total) também foram utilizadas. As amostras celulares foram lisadas com sonificador (Unique, modelo DES500) por 3 ciclos de 15 seg em potência média. As proteínas totais dos três grupos (plasma, *pellet* e total) foram dosadas pelo método de Bradford (1976). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e precipitadas com 0,05% de TFA (ácido trifluoracético, Merck) por 30 min a 4°C. Ao final do período de precipitação, as amostras foram centrifugadas 16.000 g por 15 min a 4°C e as proteínas precipitadas foram descartadas. O sobrenadante foi ligado à coluna C-18 (*Stage-tip*) e os peptídeos foram eluídos com 5, 40 e 80% de acetonitrila (ACN) diluída em água acidificada com TFA 0,05%.

As amostras eluídas foram secas em liofilizador e ressuspendidas em 20 µl de água acidificada com 0,05% de TFA. As amostras foram purificadas em HPLC (modelo SYS-LC-240-E, marca Varian, utilizando o software Workstation) com a coluna C-8 de fase reversa, 250 x 4,6 mm, 100 Å de poro de saída, partícula interna de 5 µm (Jupiter). A separação dos picos foi

realizada por gradiente de acetonitrila 2-60% como fase móvel, com fluxo de 0,7 ml - 0,8 ml por min até 60 min de corrida, e os picos foram coletados manualmente.

Os picos e os peptídeos purificados foram secos em liofilizador e ressuspensos em 10 µl de meio ágar Müller-Hinton (MHA) (MUELLER; HINTON, 1941).

Os inóculos de *Candida albicans* (ATCC 10231), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) cresceram previamente em meio ágar Müller-Hinton (MHA) por 24 h. Em seguida, a diluição da levedura e das bactérias foi realizada em solução salina (0,9% de NaCl) para a concentração final 10<sup>8</sup>/ml (a concentração do inóculo foi ajustada com o auxílio de uma escala Mac Farland n<sup>o</sup>0,5).

Os picos isolados em HPLC foram testados contra *C. albicans*. Para o teste contra *E. coli* e *S. aureus* os peptídeos foram apenas eluídos da C-18 (*stage-tip*) com 5, 40 e 80% de ACN, liofilizados e ressuspensos em 10 µl de meio ágar Müller-Hinton (MHA).

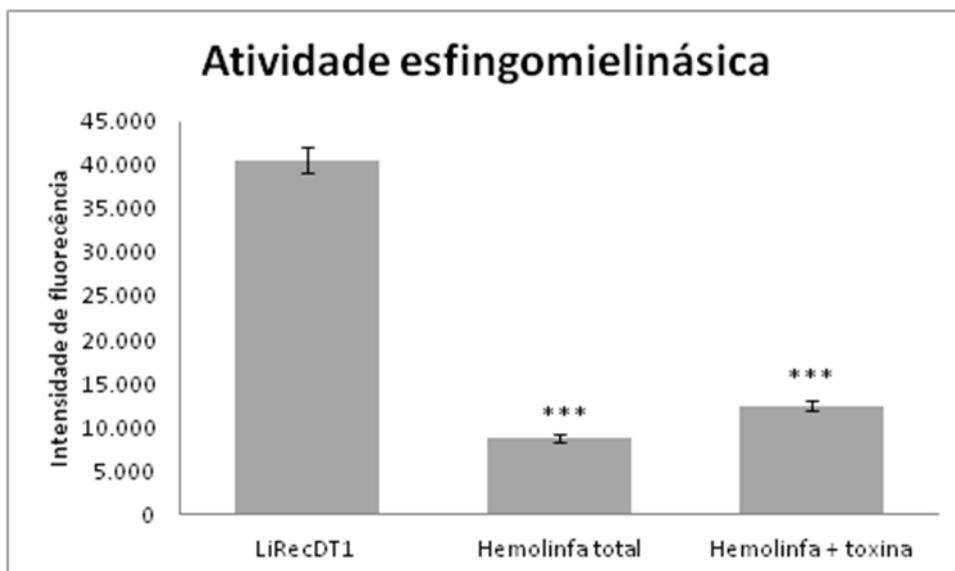
Em placa de 96 poços foram incubados os seguintes grupos: 1) controle negativo (antifúngico/antibiótico): *C. albicans* (10<sup>6</sup>/ml) ou bactéria (10<sup>6</sup>/ml) na presença de nistatina (0,05 mg/ml de antifúngico) ou gentamicina (0,05 mg/ml de antibiótico) e meio de crescimento (proporcional para 180 µl de volume final); 2) controle positivo (crescimento de microrganismo): *C. albicans* (10<sup>6</sup>/ml) ou bactéria (10<sup>6</sup>/ml) e meio de crescimento (proporcional para 180 µl de volume final); 3) teste com os peptídeos da hemolinfa: *C. albicans* (10<sup>6</sup>/ml) ou bactéria (10<sup>6</sup>/ml) incubados com os peptídeos isolados (ressuspensos em 10 µl de ágar Müller-Hinton) e meio de crescimento (proporcional para 180 µl de volume final). Após a semeadura e as amostras na placa foram mantidas em B.O.D. a 30°C e analisadas após 72 h. O crescimento dos microrganismos foi avaliado pela mensuração da absorbância em 610 nm (adaptado de RICILUCA *et al.*, 2012).

## 9- RESULTADOS

### 9.1. Atividade Esfingomielinásica

Para verificar se a hemolinfa era capaz de neutralizar ou inibir a ação da toxina dermonecrótica LiRecDT1 (proteína recombinante da isoforma 1 da fosfolipase-D presente no veneno de *L. intermedia*) foi avaliada a atividade da toxina LiRecDT1 na presença da hemolinfa. O Kit Amplex Red® foi utilizado para mensurar a atividade esfingomielinásica indireta da toxina dermonecrótica. No ensaio foi utilizado como controle positivo LiRecDT1 e para averiguar a inibição foi utilizado 30 µg de proteínas totais da hemolinfa para 1µg de toxina recombinante, o ensaio foi realizado em B.O.D. a 37°C por 30 min.

A presença da hemolinfa reduziu em cerca de 70% da atividade enzimática da LiRecDT1 (Gráfico 1-“hemolinfa+ toxina”). E em “hemolinfa total” no gráfico 1 há apenas as proteínas da hemolinfa e os componentes do kit Amplex Red® sem a toxina LiRecDT1.



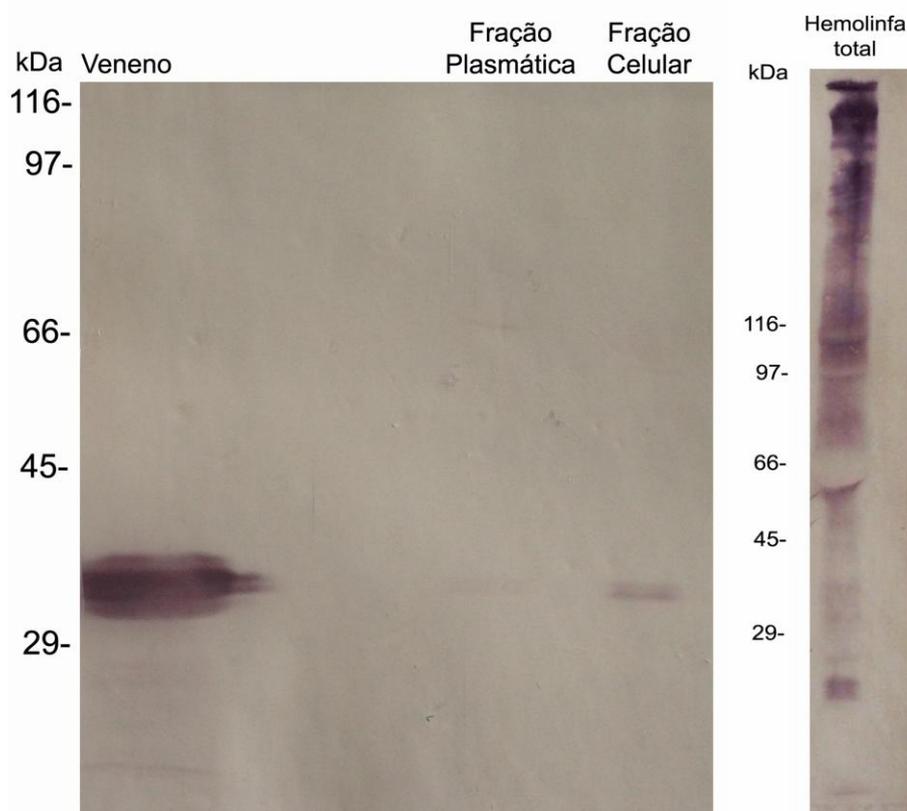
**Gráfico 1. Atividade esfingomielinásica da LiRecDT1 na presença de hemolinfa de *L. intermedia*.** Hemolinfa foi coletada em PBS contendo 5% de CIP. Foi utilizado 30 µg de proteínas totais de hemolinfa e 1 µg de toxina LiRecDT1. A atividade indireta da toxina foi avaliada com o Kit Amplex Red®. LiRecDT1 age sobre seu substrato, a esfingomielin, hidrolisando-a em colina e ceramida 1-fostato. A colina é oxidada por uma oxidase e gera peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A enzima *peroxidase horseradish* utiliza o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para oxidar o reagente Amplex Red® na proporção de 1:1, resultando no composto fluorescente *resorufin*. A fluorescência é mensurada em espectrofluorímetro (TECAN-RCHISTO INFINITE M200) com excitação em 560 nm e emissão em 590 nm. Na coluna da esquerda a toxina LiRecDT1 (1 µg) utilizada como controle positivo. Na coluna da direita a atividade de 1 µg LiRecDT1 na presença de 30 µg de proteínas totais da hemolinfa. Diferença estatística \*\*\* p < 0,001 em comparação ao controle (LiRecDT1).

## 9.2. Ensaio de imunodeteção cruzada (*Western Blotting*)

O ensaio de imunodeteção foi realizado com o objetivo de evidenciar reações imunológicas cruzadas entre a hemolinfa e o veneno de *Loxosceles intermedia*. Foi utilizado o anticorpo monoclonal que reconhece um epítipo da proteína LiRecDT1 (proteína recombinante da isoforma 1 da fosfolipase-D presente no veneno de *L. intermedia*). Foi possível notar uma reação positiva de reconhecimento de proteína na altura de aproximadamente 36 kDa tanto na amostra de plasma quanto na fração celular da hemolinfa (Figura 9). Como controle da reação utilizou-se 20 µg de veneno total (Figura 9)

As duas amostras aplicadas no gel foram normatizadas quanto à quantidade de proteínas, sendo assim, verifica-se uma quantidade maior de reação de reconhecimento pelo anticorpo monoclonal na fração celular.

Também é apresentado na figura 9 como controle a imunodeteccção de proteínas totais da hemolinfa (20µg) utilizando o anticorpo policlonal (reconhece proteínas do veneno total) (1:1000) produzido em coelho.



**Figura 9. Western blotting das frações da hemolinfa de *L. intermedia* com anticorpo monoclonal que reconhece a LiRecDT1.** Foi utilizado para separação das proteínas eletroforese em gel gradiente (5-15%) de poliacrilamida contendo 20 µg de proteínas da fração celular, da fração plasmática e do veneno total. Após a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose as proteínas foram imunodetectadas com o anticorpo monoclonal (10 µg/ml) que reconhece epítipo da LiRecDT1 (incubação de 1 h, em temperatura ambiente). Em seguida ocorreu a reação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo na diluição 1:8000 conjugado à fosfatase alcalina (incubação de 1 h, temperatura ambiente). Na coluna “veneno” como controle da reação, nota-se a presença intensa da banda em ± 36 kDa e outra banda com menor intensidade menor de 29 kDa, na coluna “Fração plasmática” a reação positiva do anticorpo contra uma proteína de ± 36 kDa presente na fração “plasma” da hemolinfa. Na coluna “Fração celular” a reação positiva mais intensa do anticorpo contra uma proteína de ± 36 kDa presente na fração celular (*pellet*) da hemolinfa. Na figura a direita a imunodeteccção (controle) com 20 µg hemolinfa total frente ao anticorpo primário antiveneno (1:1000).

### 9.3. Toxicidade

A marcação positiva verificada no ensaio de *western blotting* anteriormente relatado (Figura 9) sugeriu a presença de uma molécula relacionada à fosfolipase-D na hemolinfa. Assim, para verificar se a hemolinfa apresentava toxicidade e compará-la à toxicidade observada com o veneno, foi realizado ensaio de mortalidade em camundongos.

O ensaio de toxicidade também foi importante para verificar uma possível ação tóxica da hemolinfa em camundongos, pois essa toxicidade poderia ser um impedimento para a avaliação das atividades biológicas da hemolinfa.

Para o ensaio foram avaliados 7 grupos com 3 animais cada. Grupos 1 e 2, eram grupos controle, negativo (PBS) e positivo (veneno de *L. intermedia* 285 µg/kg), respectivamente. Os grupos 3 a 7 foram tratados intraperitonealmente com doses crescentes de hemolinfa, 715 µg/kg, 1.430 µg/kg, 2.860 µg/kg, 5.715 µg/kg e 14.285 µg/kg, respectivamente. Os animais foram observados por 48 h. Não foi notada toxicidade ou letalidade nos camundongos em nenhuma das concentrações de hemolinfa testadas. Houve letalidade apenas no grupo 1, tratado com veneno de *L. intermedia*. Nesse grupo, 6 h após a inoculação o primeiro camundongo morreu e os outros 2 animais do grupo faleceram 48 h após a inoculação (Tabela 1). Durante as 48 h de tratamento foi observado que o comportamento de *grooming* (autolimpeza) foi mais frequente nos animais inoculados com a maior concentração de hemolinfa. Além disso, observou-se imobilidade dos animais inoculados com veneno de *L. intermedia* e, portanto, ausência de *grooming* também.

Grupo	Grooming (autolimpeza)	Agitação	Coceiras alérgicas/urticária	Letalidade
Controle: PBS	Normal	Normal	Não observado	Não houve
Controle: veneno 285 µg/kg	Totalmente ausente	Totalmente ausente/imóveis	Não observado	Animal 1 – 6h Animais 2 e 3 – 48h
3: 715 µg/kg de hemolinfa	Normal	Normal	Não observado	Não houve
4: 1.430 µg/kg de hemolinfa	Normal	Normal	Não observado	Não houve
5: 2.860 µg/kg de hemolinfa	Normal	Normal	Não observado	Não houve
6: 5. 715 µg/kg de hemolinfa	Normal	Normal	Não observado	Não houve
7: 14.285 µg/kg de hemolinfa	Mais frequente	Normal	Não observado	Não houve

**Tabela 1. Ensaio de toxicidade.** A hemolinfa de *L. intermedia* foi coletada em PBS e após dosagem proteica diferentes doses foram inoculadas no peritônio dos camungondos. Os controles foram PBS (controle negativo) e veneno de *L. intermedia* (controle positivo). Os parâmetros (*grooming*, agitação, coceiras alérgicas/urticárias e letalidade) foram observados durante 48 h após inoculação. Cada um dos grupos testados continha 3 animais.

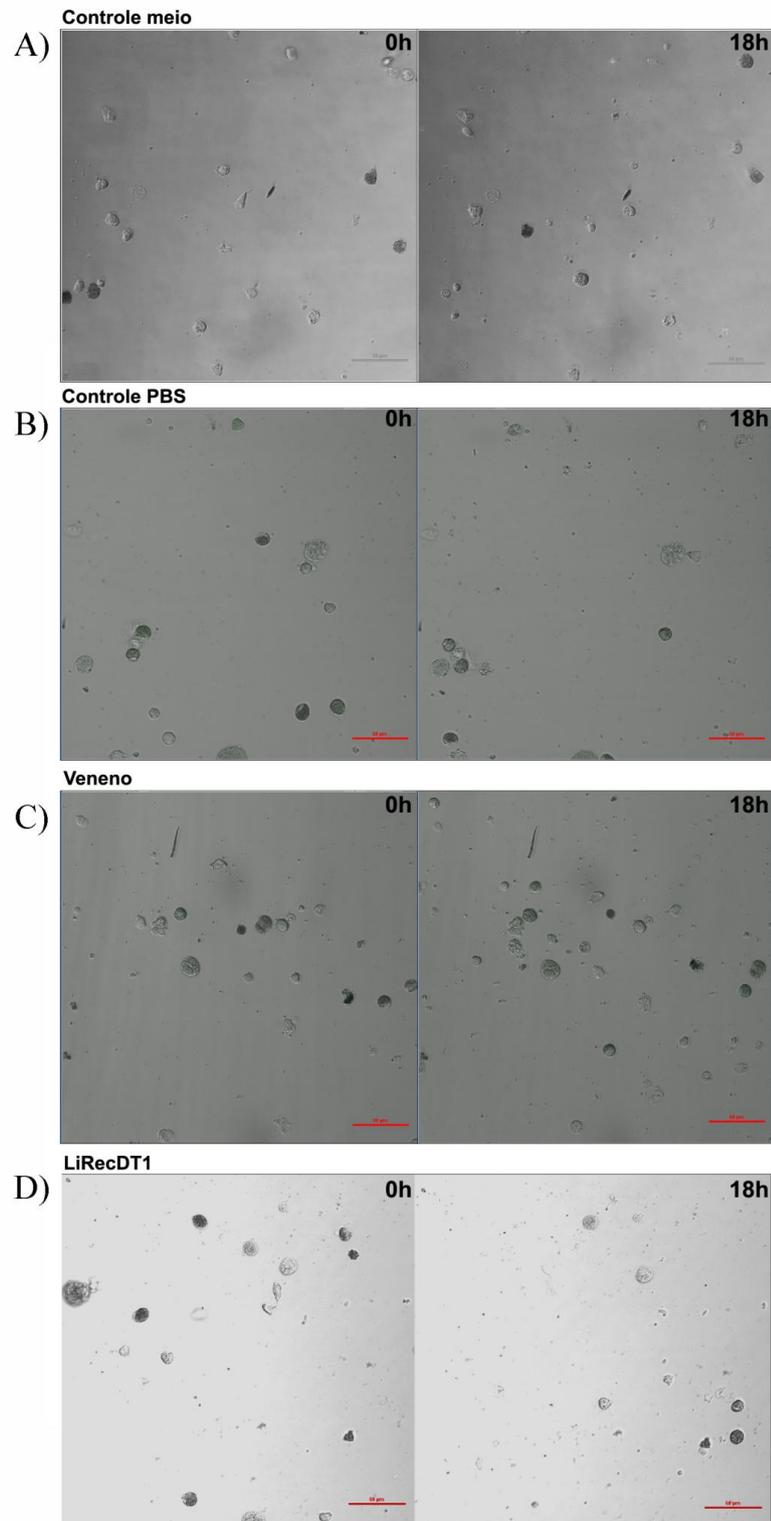
#### 9.4. Cultivo primário de hemócitos

Para o cultivo primário os hemócitos (hemolinfa) foram coletados diretamente em meio de cultura (Sf-900-III SFM) contendo antibiótico (250 mg/ml de gentamicina). As células foram plaqueadas em placa de 24 poços (TPP) e foram mantidas em cultivo (28°C) por 96 h. O meio de cultivo foi substituído após 24 h de plaqueamento. Os hemócitos aderiram à placa nos primeiros 40 min e após esse período, as células permaneceram semi-aderentes até o quarto dia de observação. Em outros meios com menores quantidades de nutrientes como o Sf-900-II SFM e meio Grace as células não aderiram, permaneceram apenas semi-aderentes. Esse comportamento foi observado repetidamente em testes preliminares. Contudo, no quarto dia de cultivo celular foi observada a presença de fungos filamentosos, não sendo observada contaminação bacteriana. As padronizações do cultivo primário dos hemócitos são dados não mostrados.

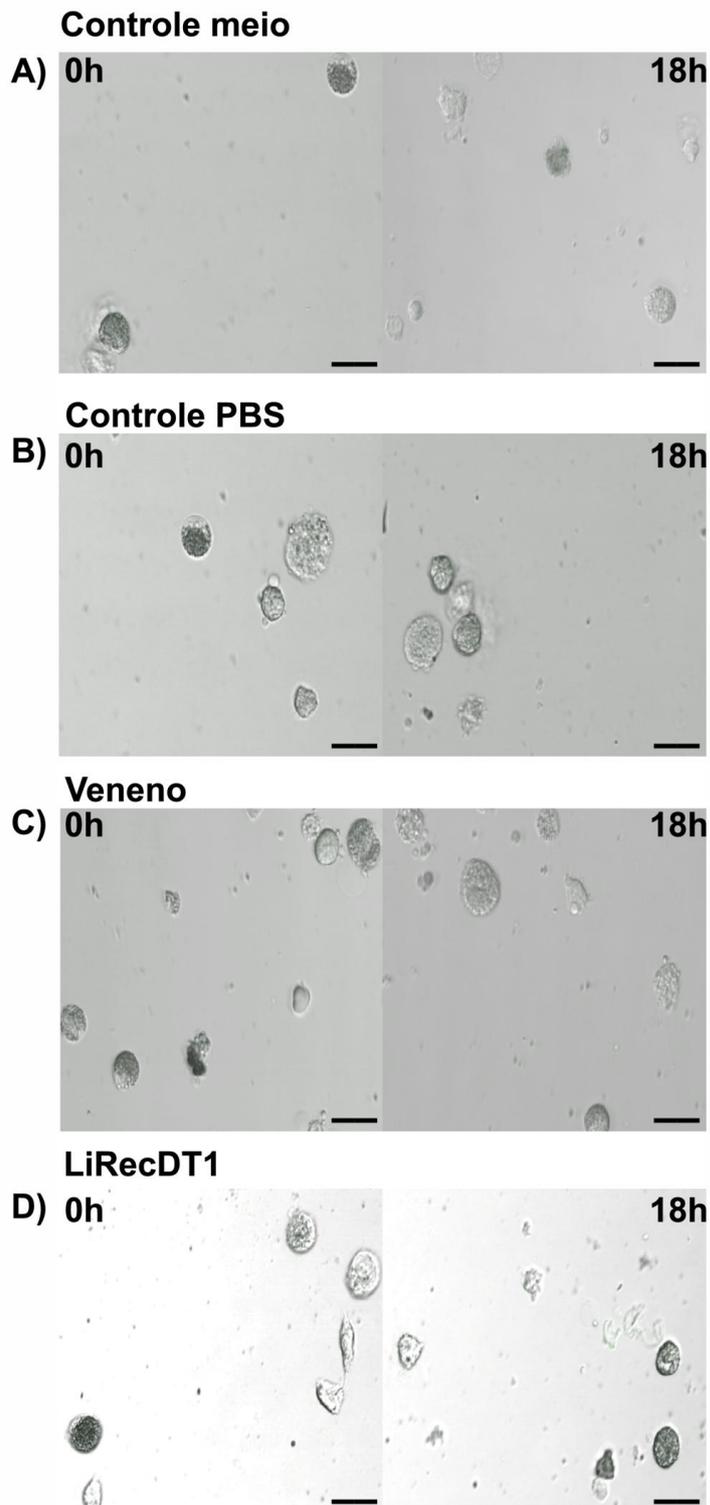
#### **9.4.1. Ensaio *in vitro* do comportamento de hemócitos frente à ação do veneno**

Os hemócitos foram coletados em meio Sf-900-III SFM e aderidos em placa de cultivo por 30 min (28°C). Após o período de aderência foi realizado o tratamento com veneno de *L. intermedia* (42 µg/ml) ou com a toxina fosfolipase-D recombinante (LiRecDT1-GFP, 42 µg/ml). A partir desse momento os hemócitos foram fotografados a cada 20 min por 18 h seguidas. Ao final da aquisição e análise das imagens não foram observadas nos hemócitos tratados: alterações morfológicas, alterações de adesão, degranulação, crescimento bacteriano ou fúngico (Figura 10). A utilização da proteína de fusão com etiqueta fluorescente (LiRecDT1-GFP) era para a observação da interação da toxina com os hemócitos, contudo a fluorescência intensa do meio não permitiu uma análise adequada dos hemócitos tratados com a toxina recombinante por microscopia de fluorescência (dados não mostrados).

Para uma análise adequada da morfologia celular foi realizado zoom digital de 4x das fotos utilizando o software NIS (Figura 11). Na figura 11 nota-se que a morfologia celular dos hemócitos incubados com a toxina LiRecDT1 ou com o veneno total de *L. intermedia* não apresentaram alterações morfológicas detectáveis na microscopia de optica.



**Figura 10. Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) dos hemócitos em cultivo primário frente à incubação com veneno de *L. intermedia* e com a toxina recombinante LiRecDT1-GFP.** As células foram coletadas em meio Sf-900-III SFM (ThermoFisher) plaqueadas e mantidas em cultivo por 30 min para adesão na placa. Os hemócitos foram tratados com veneno de *L. intermedia* (42 µg/ml) e LiRecDT1-GFP (42 µg/ml). Os hemócitos foram mantidos a 28°C sem CO<sub>2</sub> e fotografados por 18 h em DIC (microscópio Nikon A1RSiMP). A) Controle: hemócitos em meio Sf-900-III SFM nos tempos de 0h e 18h. B) Controle PBS: hemócitos em meio Sf-900-III SFM com quantidade de tampão PBS utilizada nos tratamentos com veneno (46%, v/v), nos tempos de 0h e 18h. C) Hemócitos em meio Sf-900-III SFM tratados com veneno *L. intermedia* (42 µg/ml), nos tempos de 0h e 18h. D) Hemócitos em meio Sf-900-III SFM tratados com LiRecDT1-GFP (42 µg/ml), nos tempos de 0h e 18h. Barras de 50 µm.

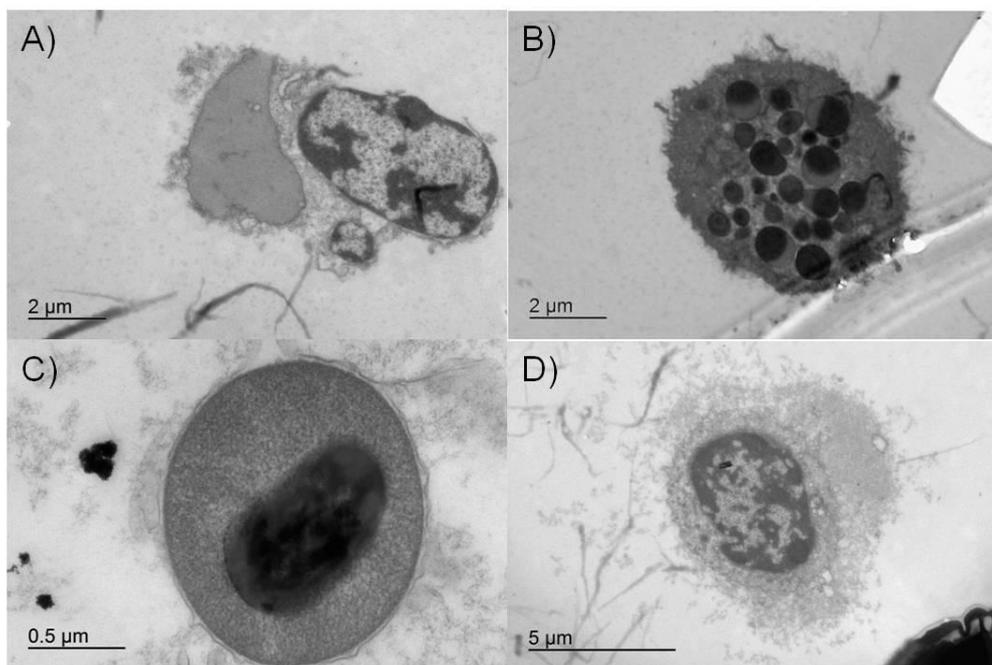


**Figura 11. Imagens com zoom digital 4x da microscopia DIC dos hemócitos em cultivo primário frente à incubação com veneno de *L. intermedia* e LiRecDT1-GFP.** As células foram coletadas em meio Sf-900-III SFM (ThermoFisher) plaqueadas e incubadas com o veneno e LiRecDT1. Os hemócitos foram mantidos a 28°C sem CO<sub>2</sub> e fotografados por 18 h em DIC. A) Controle: hemócitos em meio Sf-900-III SFM nos tempos de 0h e 18h. B) Controle PBS: hemócitos em meio Sf-900-III SFM com quantidade de tampão PBS utilizada nos tratamentos com veneno (46%, v/v), nos tempos de 0h e 18h. C) Hemócitos em meio Sf-900-III SFM tratados com veneno *L. intermedia* (42 µg/ml), nos tempos de 0h e 18h. D) Hemócitos em meio Sf-900-III SFM tratados com LiRecDT1-GFP (42 µg/ml), nos tempos de 0h e 18h. Barras de 20 µm.

### 9.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão foi empregada objetivando o estudo ultraestrutural dos hemócitos. Brevemente, após a coleta da hemolinfa em tampão citrato a amostra foi fixada com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 1h, as células foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 2% e contrastadas com uranila 2% por 2 h.

Contudo, as imagens obtidas por MET revelaram que as membranas dos hemócitos não foram preservadas durante o processamento e notou-se a ocorrência de *background* intenso. Nenhuma das imagens obtidas possibilitou a identificação ou caracterização ultraestrutural dos hemócitos. Com poucas células observadas ao final do processo, a caracterização ultraestrutural dos quatro tipos de hemócitos (pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos e adipohemócitos) foi prejudicada. A figura 12 mostra algumas imagens obtidas dos hemócitos após o processamento para MET.



**Figura 12. Microscopia Eletrônica de Transmissão de hemócitos da hemolinfa de *L. intermedia*.** Células coletadas em tampão citrato, fixadas com glutaraldeído 2,5%, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2% e contrastadas com uranila 2% por 2 h. A e D: células apresentando membranas mal preservadas durante o processamento, fragmentadas e com extravasamento do citoplasma; B: célula apresentando inclusões citoplasmáticas; C: célula artefatada, impossibilitando identificação. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (Joel modelo JEM 1200EXII Electron Microscope) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Alterações foram feitas no protocolo de processamento dos hemócitos. O aumento da concentração do fixador (glutaraldeído 4%) e o aumento do tempo de fixação (de 1h para 2h) causaram precipitação das proteínas plasmáticas e aumentaram significativamente o *background* impossibilitando a visualização dos hemócitos. Testes com adição de passos de lavagens entre a fixação, pós-fixação e contrastação também foram realizados, mas acentuava-se a perda de material e poucas células permaneciam ao final do processamento. Sendo assim, não foi possível determinar as características ultraestruturais dos hemócitos.

### 9.6. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada como o objetivo de separar os diferentes tipos celulares presentes na hemolinfa para estudos de caracterização e ensaios de atividade antimicrobiana.

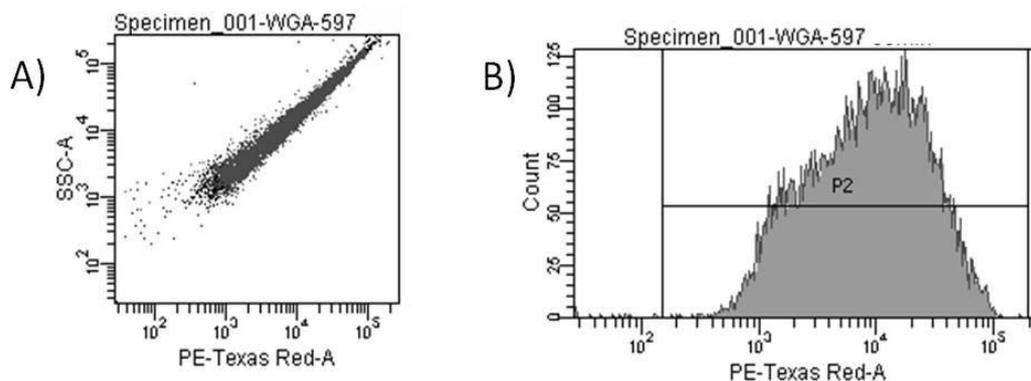
As células foram marcadas com a lectina WGA (Figura 13) e LisoTracker (Figura 14). A lectina WGA reconhece resíduos de N-acetilglucosamina e resíduos de ácido siálico (WRIGHT, 1984). O LisoTracker é um marcador de lúmen de compartimentos com pH ácido (endossomos e lisossomos). Todas as células foram marcadas indiscriminadamente pelos dois marcadores, impossibilitando assim a identificação de características particulares dos diferentes tipos de hemócitos e sua separação por *sorting*.

Utilizou-se então o MitoTracker, um corante vermelho fluorescente que marca as mitocôndrias de células vivas, o corante acumula-se no espaço intermembranas das mitocôndrias. As células marcadas pelo MitoTracker apresentaram duas populações com intensidades diferentes de fluorescência um mais intenso e outro menos intenso (Figura 15, P1 e P2 respectivamente), os 2 picos foram separados por *sorting*.

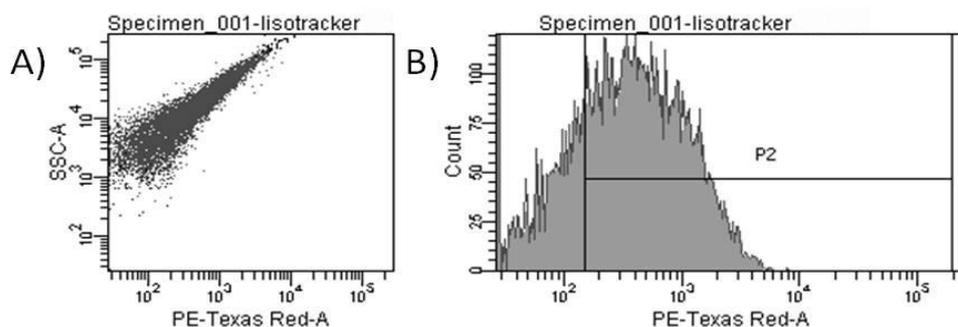
Para identificar quais células estavam contidas nas 2 populações marcadas pelo Mitotracker (maior e menor intensidade), as células foram fixadas e coradas com MGG (item 8.7 do material e métodos) e observadas em microscópio óptico. As células com maior intensidade de marcação com Mitotracker foram identificadas como plasmatócitos e granulócitos (Figura 16). As células marcadas pelo MitoTracker com menor intensidade de

fluorescência foram identificadas como pró-hemócitos e granulócitos (Figura 17). Portanto, havia uma mesma população celular em ambas as frações separadas (granulócitos), sendo assim, a coloração com MitoTracker não possibilitou o isolamento das diferentes populações de hemócitos. O MitoTracker possibilitou a separação eficiente entre pró-hemócitos e plasmatócitos, porém as células de maior interesse, os granulócitos (secretoras de peptídeos antimicrobianos), estavam presentes em ambas as frações.

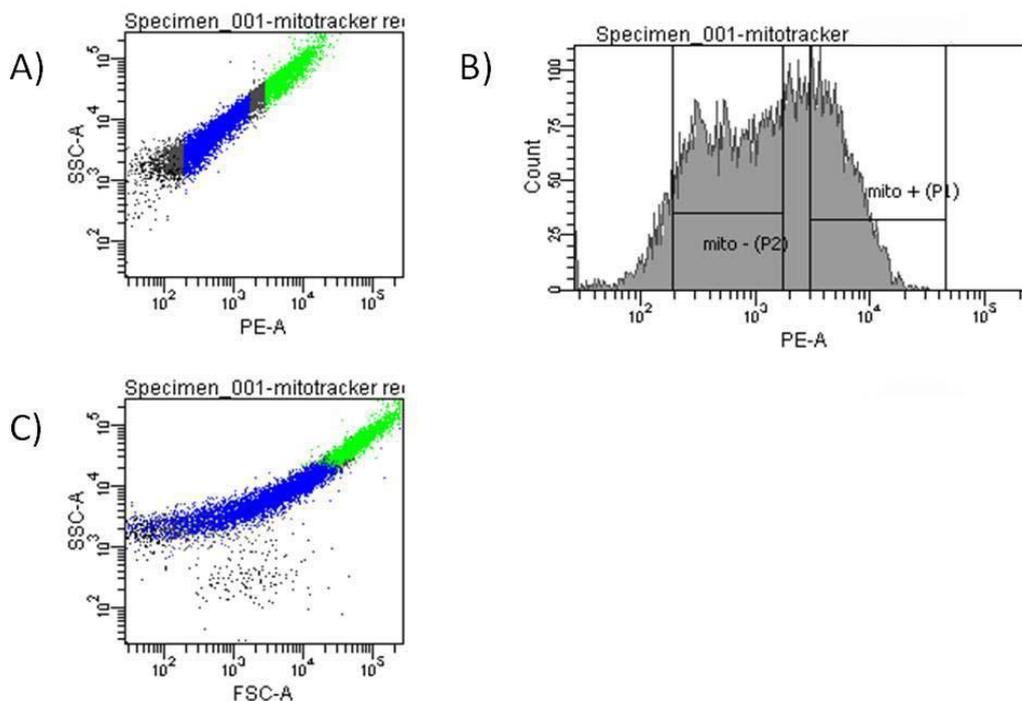
A análise das células coradas com MGG foi dificultada pela presença de poucas células e de células que se encontravam lisadas ou mal coradas (Figura 18).



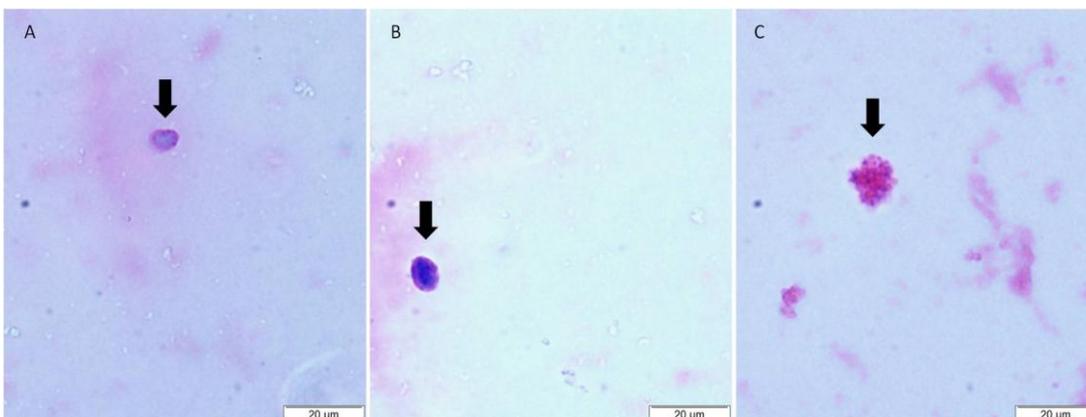
**Figura 13. Citometria de fluxo de hemócitos marcados com a lectina WGA conjugada Alexa Fluor®594.** As células foram coletadas em tampão citrato incubadas com lectina WGA conjugada a Alexa Fluor® 594 (ThermoFisher) na concentração de 5  $\mu\text{g/ml}$  por 20 min em temperatura ambiente e centrifugadas 800 g por 15 min para retirar o excesso de reagente e ressuspendidas em tampão citrato. A) gráfico que ilustra a granulosidade celular (SSC) vs laser 488nm de excitação (marcação com lectina WGA conjugada Alexa Fluor®594); B) gráfico de intensidade de fluorescência em escala logarítmica, “P2” indica células com alta intensidade de fluorescência. Citômetro de fluxo utilizado Area II - BD®.



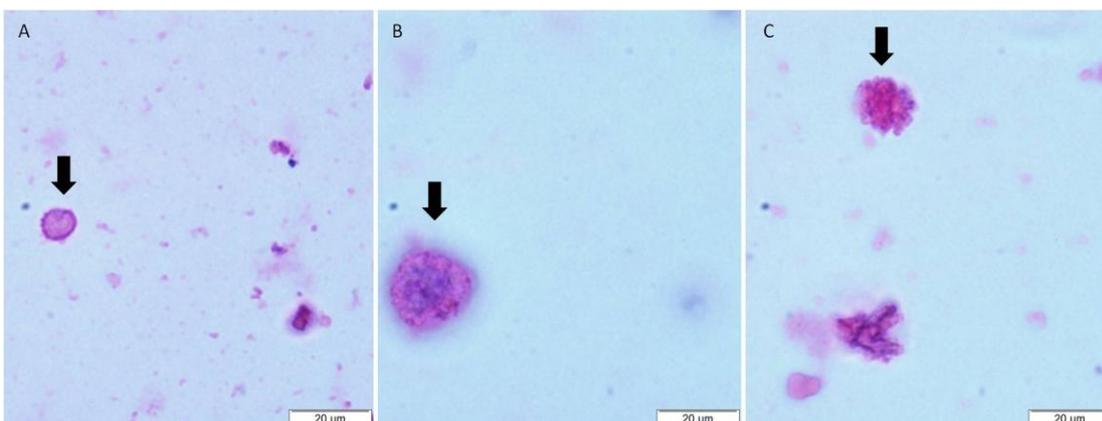
**Figura 14. Citometria de fluxo de hemócitos marcados com LisoTracker.** As células foram coletadas em tampão citrato incubadas com LisoTracker (ThermoFisher) na concentração de 75 nM por 1 h em temperatura ambiente e centrifugadas 800 g por 15 min para retirar o excesso do reagente e ressuspensas em tampão citrato. A) gráfico de granulocidade celular (SSC) vs laser 488nm de excitação (marcação para LisoTracker); B) gráfico de intensidade de fluorescência em escala logarítmica, "P2" indica células com alta intensidade de fluorescência. Citômetro de fluxo utilizado Area II - BD®.



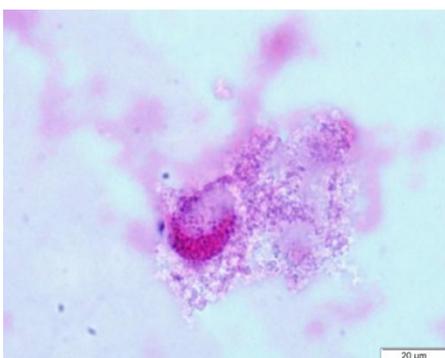
**Figura 15. Citometria de fluxo de hemócitos marcados com MitoTracker.** As células foram coletadas em tampão citrato incubadas com MitoTracker (ThermoFisher) na concentração de 100 nM por 1 h em temperatura ambiente e centrifugadas 800 g por 15 min para retirar o excesso de reagente e ressuspensas em tampão citrato. A) gráfico que representa granulocidade celular (SSC) vs laser 488nm de excitação (marcação com MitoTracker). B) gráfico de intensidade de fluorescência em escala logarítmica, em "P1" estão os hemócitos marcados com maior intensidade de fluorescência e em "P2" hemócitos marcados com menor intensidade de fluorescência quando comparados a "P1". C) gráfico que representa granulocidade celular (SSC) vs tamanho celular (FSC). Citômetro de fluxo utilizado Area II - BD®.



**Figura 16. Hemócitos corados com May-Grunwald-Giemsa (MGG) após separação por *sorting* - células isoladas a partir da maior intensidade de fluorescência pelo MitoTracker.** As células foram coletadas em tampão citrato marcadas com MitoTracker (ThermoFisher) na concentração de 100 nM, o excesso de reagente foi retirado por centrifugação e as células mais intensamente marcadas foram separadas. Após a separação as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e coradas por MGG. A) Plasmatócito; B) Plasmatócito; C) Granulócito. As células foram observadas em microscópio BX51 (Olympus System Microscopes). As setas indicam as células em cada figura.



**Figura 17. Hemócitos corados com May-Grunwald-Giemsa (MGG) após separação por *sorting*, células isoladas a partir da menor intensidade de fluorescência pelo MitoTracker.** As células foram coletadas em tampão citrato e marcadas com MitoTracker (ThermoFisher) na concentração de 100 nM, o excesso de reagente foi retirado por centrifugação e as células menos intensamente marcadas foram separadas. Após a separação as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e coradas por MGG. A) Pró-hemócito; B) Granulócito; C) Granulócito. As células foram observadas em microscópio BX51 (Olympus System Microscopes). As setas indicam as células em cada figura.



**Figura 18. Hemócito corado com May-Grunwald-Giemsa (MGG) após separação por *sorting*, célula isolada a partir da maior intensidade do corante MitoTracker.** As células marcadas mais intensamente com o MitoTracker (ThermoFisher) na concentração de 100 nM foram separadas em Citômetro de fluxo (Area II BD®). Após a separação as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% e coradas por MGG. A imagem ilustra um granulócito com corante eluído pelo Fluoromont G utilizado na montagem da lâmina. A célula foi observada em microscópio BX51 (Olympus System Microscopes).

### 9.7. Proteômica *shotgun*

As proteínas totais da hemolinfa foram coletadas em tampão bicarbonato de amônio com ureia e foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976). As proteínas totais foram digeridas com diferentes enzimas: tripsina, quimiotripsina e pepsina. As amostras digeridas e não-digeridas foram ligadas a coluna de C-18 (*Stage-tip*), eluídas e secas. Após a solubilização e ressuspensão, os peptídeos foram ligados a coluna de troca iônica (*Strong Cation* - SCX) e foram eluídos e secos. Em seguida, as amostras foram ressuspendidas e purificadas em C-18 (*Stage-tip*). Os peptídeos foram armazenados ligados nas colunas C-18 até o momento das amostras analisadas no espectrômetro de massas (LTQ Orbitrap XL ETD, ThermoScientific). Neste momento, as amostras contendo os peptídeos foram submetidas a HPTLC acoplada ao Orbitrap. Os peptídeos foram ionizados por nano *electrospray* (voltagem de 2,3 kV) e injetados no espectrômetro de massas. Os espectros MS foram obtidos em modo de varredura completa (m/z 350 a 1800) em analisador Orbitrap com resolução de 60.000 em m/z 400, seguido de seleção dos 3 íons mais intensos, os quais foram fragmentados por CID, HCD, ETD. Na seleção dos íons foi usada uma lista de exclusão de 60 seg.

Após a aquisição dos espectros foi realizado *de novo sequencing* e as sequências peptídicas obtidas (5.827 sequências obtidas para proteínas maiores de 10 kDa e 5.661 sequências obtidas para proteínas menores de 10 kDa) foram confrontadas com diferentes bancos de dados. Os bancos de dados testados continham sequências de crustáceos e moluscos, porém o banco com aracnídeos e insetos foi o que melhor representou as proteínas encontradas na hemolinfa de *L. intermedia*, pois apresentaram fragmentos de hemocianina.

Considerando os espectros obtidos por MS/MS das três fragmentações e após a realização do *de novo sequencing* cerca de mil proteínas ou fragmentos de proteínas foram identificados. As principais proteínas identificadas utilizando o banco de dados de aracnídeos e insetos estão

listadas na Tabela 2. Apenas as homologias relevantes (proteínas com possível atividade biológica) foram listadas na tabela. Há cerca de mil sequências que se correlacionam com o banco de dados (dados não-mostrados), porém há muitas repetições de sequências principalmente de hemocianina e homologias com proteínas celulares, como por exemplo, actina.

O objetivo de realizar a proteômica da hemolinfa é conhecer sua composição e encontrar proteínas com atividades biológicas passíveis de serem empregadas biotecnologicamente, a exemplo de um potencial inibidor da toxina fosfolipase-D ou inibidores de metaloproteases e serinoproteases.

Contudo, utilizando o banco de dados Insecta e Aracnidae não foi identificado nenhuma proteína similar a estes inibidores enzimáticos. Várias sequências aminoacídicas obtidas tiveram grande homologia com a hemocianina que é uma proteína abundante na hemolinfa dos invertebrados e fragmentos dessa proteína podem apresentar atividade antimicrobiana. Particularmente, houve homologia com cadeia da hemocianina com ação antifúngica já descrita (Tabela 2, terceira linha). A partir desse resultado optou-se por buscar peptídeos com atividade antimicrobiana na hemolinfa de *L. intermedia*. Para tanto, os peptídeos foram obtidos utilizando cromatografia de alta performance (HPLC) e analisados em ensaios antimicrobianos frente a diferentes patógenos.

Identificação	Alinhamento	Intervalo de confiança	Homologia	Ação/ Referência
tr A0A087UF25 A0A087UF25_9ARAC	58	0.402	Hemocyanin cadeia C sp. <i>Stegodyphus mimosarum</i>	
sp P14750 HCYA_APHCL	46	0.352	Hemocyanin cadeia A sp. <i>Aphonopelma californicum</i>	
sp P02241 HCYD_APHCL	29	0.159	Hemocyanin cadeia D sp. <i>Aphonopelma californicum</i> / <i>Acanthoscurria rondoniae</i>	Antifúngica-RICILUCA <i>et al.</i> , 2012
tr Q0VIL8 Q0VIL8_AEDAE	8	0.072	Prophenoloxidase sp. <i>Aedes aegypti</i>	Enzima primariamente responsável pela catálise da via melanização - KIM, 2005.
tr A9QQ31 A9QQ31_LYCSI	9	0.181	Actin 5C sp. <i>Lycosa singoriensis</i>	
tr E6Y2S5 E6Y2S5_MESMA	9	0.181	Beta-actin sp. <i>Mesobuthus martensii</i>	
tr A0A088SAW4 A0A088SAW4_DERFA	4	0.112	Der f 20/ 3 allergen (Fragment) SP. <i>Dermatophagoides farinae</i>	Alergeno – CAI, <i>et al.</i> , 2007.
tr A0A077D2E1 A0A077D2E1_ONCFA	3	0.024	Tyrosinase (Fragment) sp. <i>Oncopeltus fasciatus</i>	Enzima que provoca a oxidação de tirosina com a produção final de melanina – PANGA, <i>et al.</i> , 2013.
tr W8CCB6 W8CCB6_CERCA	2	0.064	Serpin B8 sp. <i>Ceratitidis capitata</i>	
tr E7D164 E7D164_LATHE	2	0.076	Metalloendopeptidase (Fragment) sp. <i>Latrodectus hesperus</i>	
tr S4PY96 S4PY96_9NEOP	2	0.02	Sphingomyelin phosphodiesterase 4 (Fragment) sp. <i>Pararge aegeria</i>	

**Tabela 2. Lista das proteínas identificadas da hemolinfa de *L. intermedia* com homologia com o banco de dados.** A hemolinfa foi coletada em tampão bicarbonato de amônio com ureia e digerida com tripsina, quimotripsina ou pepsina. Os peptídeos gerados após a digestão foram purificados em coluna C-18 (*Stage-tip*) e coluna de troca iônica (*Strong Cation* - SCX). Antes de passar pelo espectrômetro de massas (LTQ Orbitrap XL ETD, ThermoScientific), os peptídeos foram purificados em coluna de HPTLC acoplada ao equipamento. Os espectros teóricos da hemolinfa obtidos foram unidos por *de novo sequencing* e confrontados ao banco de dados de Insecta e Aracnidae. O alinhamento é a similaridade do espectro teórico com o que está no banco de dados e o intervalo de confiança é o percentual da sequência no banco de dados que representa os espectros teóricos.

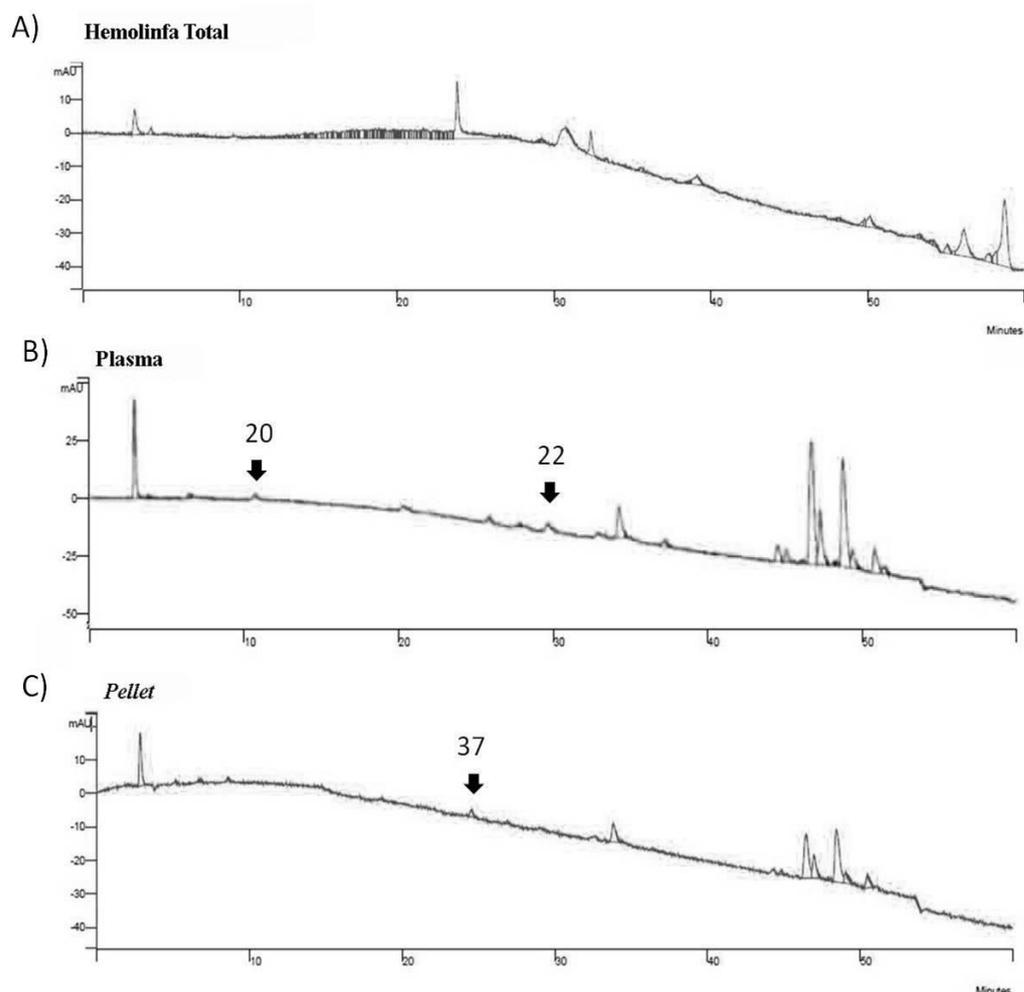
## 9.8. Atividade Antimicrobiana

Para o isolamento dos peptídeos da hemolinfa de *L. intermedia*, primeiramente foi realizada a precipitação das proteínas de alta massa molecular utilizando ácido trifluoracético (TFA 0,05%). A remoção das proteínas da amostra foi confirmada por ensaio de eletroforese (SDS-PAGE) com as proteínas precipitadas (dados não mostrados). Os peptídeos presentes na hemolinfa de *L. intermedia* foram isolados por HPLC e, posteriormente, a atividade antimicrobiana foi avaliada. Para isso, a hemolinfa foi coletada em tampão citrato e fracionada em três amostras: 1) hemolinfa total, 2) *pellet* (fração celular) e 3) plasma (fração plasmática). As amostras celulares (1 e 2) foram lisadas em sonicador. Após a separação dos peptídeos em HPLC, cada peptídeo isolado foi testado com o objetivo de avaliar a inibição do crescimento do fungo *Candida albicans*. Não foi possível realizar a triplicata técnica, pois a quantidade de proteínas extraídas ao final do processo era muito baixa.

Apenas os peptídeos eluídos da coluna C-18 (*Stage-tip*) com a concentração de 40% de ACN foram testados, pois de acordo com a literatura a maior parte dos peptídeos com atividade são eluídos com essa concentração de ACN (RICILUCA *et al.*, 2012). Primeiramente, os peptídeos foram isolados por HPLC e identificados de acordo com suas características de eluição. Os picos 20, 22 e 37 (Figura 19) inibiram o crescimento de *C. albicans* (Figura 20A). O pico 20 foi obtido da fração plasmática da hemolinfa, sendo seu tempo de retenção de 10 min e 23 seg e sua eluição com 11% de ACN. O pico 22 foi obtido da fração plasmática, com tempo de retenção de 29 min e 20 seg e eluição com 29% de ACN. O pico 37 foi obtido da fração celular, com tempo de retenção de 26 min e 20 seg e eluição com 27% de ACN. Contudo, as replicatas biológicas realizadas após esse primeiro teste não reproduziram a inibição observada (Figura 20B e 20C).

Os peptídeos eluídos da coluna C-18 com 5, 40 e 80% de ACN foram testados contra *E. coli* e *S. aureus* em pentaplicata técnica e triplicata

biológica. Nessas condições experimentais, nenhum dos peptídeos foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* (Figura 21).



**Figura 19. Purificação por HPLC dos peptídeos de hemolinfa de *L. intermedia* das amostras: total, *pellet* e plasma, obtidos após a ligação em coluna C-18 e eluído com 40% de acetonitrila.** A hemolinfa foi coletada em tampão citrato, as células foram lisadas e as proteínas foram precipitadas com 0,05% de TFA. Em seguida, os peptídeos foram previamente purificados em coluna C-18 caseira, eluídos com 40% de ACN e purificados em HPLC (modelo SYS-LC-240-E, Varian) utilizando o software Workstation (coluna C-8, 250 x 4,6 mm, 100 Å de poro de saída, partícula interna de 5 µm - Jupiter, com fase móvel 2-60% com fluxo de 0,7 ml - 0,8 ml por min até 60 min de corrida). A) Picos relativos à amostra total de hemolinfa; B) Picos relativos à fração do plasma de hemolinfa. C) Picos relativos à fração celular (*pellet*) da hemolinfa. As setas indicam os picos purificados que inicialmente apresentaram atividade antifúngica, que não foi confirmada.

C. albicans			
Pico isolado por HPLC	Crescimento	Controle de crescimento	Controle do antibiótico/antifúngico
		+	-
		+	-
		+	-
		+	-
		+	-
1T	+		
2T	+		
3T	+		
4T	+		
5T	+		
6T	+		
7T	+		
8T	+		
9T	+		
10T	+		
11T	+		
12T	+		
13T	+		
14T	+		
15T	+		
16T	+		
17T	+		
18PLA	+		
19PLA	+		
20PLA	-		
21PLA	+		
22PLA	-		
23PLA	+		
24PLA	+		
25PLA	+		
26PLA	+		
27PLA	+		
28PLA	+		
29PLA	+		
30PLA	+		
31PLA	+		
32PEL	+		
33PEL	+		
33PEL	+		
34PEL	+		
35PEL	+		
36PEL	+		
37PEL	-		
38PEL	+		
39PEL	+		
40PEL	+		
41PEL	+		
42PEL	+		

C. albicans			
Pico isolado por HPLC	Crescimento	Controle de crescimento	Controle do antibiótico/antifúngico
		+	-
		+	-
		+	-
		+	-
		+	-
1T	+		
2T	+		
3T	+		
4T	+		
5T	+		
6T	+		
7T	+		
8T	+		
9T	+		
10T	+		
11T	+		
12T	+		
13T	+		
14T	+		
15T	+		
16T	+		
17T	+		
18PLA	+		
19PLA	+		
20PLA	+		
21PLA	+		
22PLA	+		
23PLA	+		
24PLA	+		
25PLA	+		
26PLA	+		
27PLA	+		
28PLA	+		
29PLA	+		
30PLA	+		
31PLA	+		
32PEL	+		
33PEL	+		
33PEL	+		
34PEL	+		
35PEL	+		
36PEL	+		
37PEL	+		
38PEL	+		
39PEL	+		
40PEL	+		
41PEL	+		
42PEL	+		

C. albicans			
Pico isolado por HPLC	Crescimento	Controle de crescimento	Controle do antibiótico/antifúngico
		+	-
		+	-
		+	-
		+	-
		+	-
1T	+		
2T	+		
3T	+		
4T	+		
5T	+		
6T	+		
7T	+		
8T	+		
9T	+		
10T	+		
11T	+		
12T	+		
13T	+		
14T	+		
15T	+		
16T	+		
17T	+		
18PLA	+		
19PLA	+		
20PLA	+		
21PLA	+		
22PLA	+		
23PLA	+		
24PLA	+		
25PLA	+		
26PLA	+		
27PLA	+		
28PLA	+		
29PLA	+		
30PLA	+		
31PLA	+		
32PEL	+		
33PEL	+		
33PEL	+		
34PEL	+		
35PEL	+		
36PEL	+		
37PEL	+		
38PEL	+		
39PEL	+		
40PEL	+		
41PEL	+		
42PEL	+		

**Figura 20. Antibiograma dos picos purificados por HPLC da hemolinfa de *L. intermedia* contra o fungo *Candida albicans*.** Após a purificação dos peptídeos obtidos das três frações de hemolinfa: total (T), plasma (PLA) e *pellet* (PEL), as amostras foram liofilizadas e ressuspensas em ágar Müller-Hinton. A atividade antimicrobiana foi realizada em placa de 96 poços com o crescimento do fungo em 72 h a 30°C e a obtenção da absorbância em 610 nm. A) Primeira replicata biológica: antibiograma com atividade de inibição dos picos 20, 22 e 37. B) Segunda replicata biológica: nenhum dos picos purificados que apresentou inibição do crescimento fúngico. C) Terceira replicata biológica: nenhum dos picos purificados que apresentou inibição do crescimento fúngico.

A)						B)					
<i>E. coli</i>						<i>S. aureus</i>					
	Total	Plasma	Pellet	Controle de crescimento	Controle fungico/antibiótico		Total	Plasma	Pellet	Controle de crescimento	Controle fungico/antibiótico
				+	-					+	-
				+	-					+	-
				+	-					+	-
				+	-					+	-
				+	-					+	-
Eluidos em 5% de ACN	+	+	+			Eluidos em 5% de ACN	+	+	+		
5%	+	+	+			5%	+	+	+		
5%	+	+	+			5%	+	+	+		
5%	+	+	+			5%	+	+	+		
5%	+	+	+			5%	+	+	+		
Eluidos em 40% de ACN	+	+	+			Eluidos em 40% de ACN	+	+	+		
40%	+	+	+			40%	+	+	+		
40%	+	+	+			40%	+	+	+		
40%	+	+	+			40%	+	+	+		
40%	+	+	+			40%	+	+	+		
Eluidos em 80% de ACN	+	+	+			Eluidos em 80% de ACN	+	+	+		
80%	+	+	+			80%	+	+	+		
80%	+	+	+			80%	+	+	+		
80%	+	+	+			80%	+	+	+		
80%	+	+	+			80%	+	+	+		

**Figura 211. Antibiograma de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com os peptídeos eluídos da coluna C-18.** A hemolinfa foi fracionada em três amostras (total, plasma e *pellet*), ligada à coluna C-18 e eluída com 5, 40 e 80% de acetonitrila (ACN). Em seguida as amostras foram liofilizadas e ressuspendidas em ágar Müller-Hinton, a atividade antimicrobiana foi realizada em placa de 96 poços com o crescimento das bactérias a 30°C por 72 h. O crescimento foi avaliado pela mensuração da absorvância em 610 nm. A) Antibiograma das amostras de hemolinfa de *L. intermedia* utilizando *E. coli*, não foi observada atividade antimicrobiana. B) Antibiograma das amostras de hemolinfa de *L. intermedia* utilizando *S. aureus*, não foi observada atividade antimicrobiana. (+) indica crescimento bacteriano e (-) indica ausência de crescimento bacteriano.

## 10- DISCUSSÃO

A literatura descreve a hemolinfa como um fluido rico em diferentes tipos de moléculas e células importantes para o sistema imunológico inato dos artrópodes. A hemolinfa banha a hemocele dos invertebrados, sendo uma reserva de água e nutrientes que são disponibilizados em períodos de escassez, além de possibilitar excretas celulares. A hemolinfa é rica em proteases, as quais participam das cascatas de sinalização durante a defesa imunológica dos artrópodes (KANOST, 1999; VILCINSKAS; WEDDE, 2006). As principais proteases já descritas na hemolinfa dos artrópodes são as serinoproteases e metaloproteases. Inibidores de serinoproteases, metaloproteases e fenoloxidasas também são encontrados naturalmente na hemolinfa, pois exercem o papel de reguladores durante a resposta imune (KANOST, 1999; CHERQUI *et al.*, 2001; VILCINSKAS; WEDDE, 2006; RIMPHANITCHAYAKIT; TASSANAKAJON, 2010). Dois inibidores de serinoproteases foram isolados da hemolinfa da larva de mariposa da espécie *Mythimna unipuncta*: um inibidor de tripsina, com massa estimada em 52 kDa e um inibidor de  $\alpha$ -quimiotripsina, com massa estimada em 43 kDa (CHERQUI *et al.*, 2001).

Alguns inibidores podem apresentar reação cruzada, por exemplo, inibidores de proteases da hemolinfa também podem inibir proteases de bactérias (RIMPHANITCHAYAKIT; TASSANAKAJON, 2010). Isso ocorre porque a ligação do inibidor à protease pode interferir facilmente na atividade da enzima, o inibidor dificulta principalmente a ligação da protease ao seu substrato. Muitas dessas proteases foram conservadas durante a evolução, então seu inibidor também conservado poderia se ligar a outras proteases que possuem caráter semelhante (RAWLINGS *et al.*, 2016). Sendo assim, sugerimos e buscamos moléculas inibidoras de enzimas na hemolinfa de *L. intermedia* que pudessem proteger o animal da ação das toxinas do seu próprio veneno.

As fosfolipases-D são a principal classe de toxinas no veneno de *L. intermedia*. Estas enzimas hidrolisam fosfolipídeos e são responsáveis pela maioria dos sinais e sintomas decorrentes do envenenamento

(Loxoscelismo), juntamente com a hialuronidase e metaloproteases. Isoladamente a fosfolipase-D é capaz de causar dermonecrose, hemólise, agregação plaquetária, lesão renal, aumento da permeabilidade vascular e resposta inflamatória intensa, observados no envenenamento (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011, GREMSKI *et al.*, 2014). Sendo assim, consideramos a possibilidade de encontrar um inibidor natural da fosfolipase-D na hemolinfa de *L. intermedia*.

Com o objetivo de buscar um inibidor de fosfolipase-D na hemolinfa de *L. intermedia* avaliou-se a atividade da enzima fosfolipase-D recombinante do veneno de *L. intermedia* (LiRecDT1) na presença da hemolinfa. Para tanto foi utilizado ensaio que avalia indiretamente a atividade esfingomielinásica (Kit de Amplex Red®) da toxina recombinante. A LiRecDT1 foi produzida em larga escala em sistema de expressão bacteriano e sua atividade foi confirmada com o Kit de Amplex Red®.

Para o ensaio de inibição utilizou-se 1 µg de LiRecDT1 na presença de 30 µg de proteínas totais da hemolinfa e foi observado uma diminuição de 70% da atividade da enzima (Gráfico 1). A possibilidade da LiRecDT1 estar utilizando moléculas da hemolinfa como substrato não pode ser descartada, contudo a enzima LiRecDT1 tem uma grande preferência por esfingomielinina e a composição lipídica primordial da hemolinfa é fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (fosfolipídios não-preferenciais da toxina) (CHAIM *et al.*, 2011a; BEDNASKI *et al.*, 2015). Outro fator que explicaria a redução da atividade da toxina recombinante observado no ensaio (gráfico 1) é que a presença da hemolinfa poderia estar dificultando o acesso da toxina ao seu substrato, pois com a adição da hemolinfa no teste várias moléculas (proteínas/lipídios da hemolinfa) que não estão presentes no grupo controle estão presentes na amostra em teste. Ainda assim pode haver um inibidor de fosfolipase-D na hemolinfa, mas que não foi identificado nos ensaios realizados neste trabalho de tese.

A presença de uma fosfolipase-D circulante na hemolinfa indicaria a presença também do seu inibidor sendo assim foi realizado o ensaio de imunodeteção (*western blotting*) para detectar a presença dessa proteína na hemolinfa. O ensaio de imunodeteção com a hemolinfa imobilizada e

anticorpo monoclonal que reconhece epítipo específico da LiRecDT1 (*Loxosceles intermedia recombinant dermonecrotic toxin 1*) (DIAS-LOPES *et al.*, 2014) mostrou a presença de proteínas relacionadas à toxina LiRecDT1 na hemolinfa (figura 9). A reação cruzada foi observada na altura de 36 kDa, que é a massa esperada para a fosfolipase-D. Como a ligação antígeno-anticorpo é uma reação específica, podemos afirmar que a hemolinfa possui uma proteína relacionada com a LiRecDT1, porém não podemos afirmar se trata de uma fosfolipase-D ou ainda de alguma proteína homóloga à toxina. O resultado indica apenas que a molécula na hemolinfa possui epítipo conservado relacionado ao reconhecido pelo anticorpo monoclonal anti-LiRecDT1. Ainda que qualquer comparação para quantificação não seja adequada na ausência de um controle endógeno, quando comparamos os resultados observados nas duas amostras: plasma e *pellet*, o sinal de detecção dessa proteína é maior na fração celular (*pellet*). Esse fato sugere que pode estar ocorrendo o reconhecimento de fosfolipases celulares dos hemócitos. Sabe-se que há fosfolipases constitutivas no citoplasma celular as quais participam de cascatas de sinalização (WILLE *et al.*, 2013).

A fosfolipase-D presente no veneno de *L. intermedia* apresenta toxicidade e letalidade quando administrada em camundongos (APPEL *et al.*, 2008). Portanto, avaliou-se a possibilidade da hemolinfa também apresentar toxicidade ou mesmo letalidade em camundongos. Além disso, a informação sobre apresentação de toxicidade pela hemolinfa seria muito importante para a avaliação de atividades biológicas da amostra.

A hemolinfa não apresentou toxicidade ou letalidade em camundongos em nenhuma das doses testadas, mesmo na maior concentração testada (14.285 µg/kg). Por outro lado, a dose de veneno de *L. intermedia* (285 µg/kg) resultou em 100% de letalidade após 48 h. Esse resultado reforça a ideia de que a proteína da hemolinfa, identificada no ensaio de imunodeteção com anticorpo monoclonal contra LiRecDT1, não apresenta efeitos como os observados para a fosfolipase-D do veneno, embora ambas possuam epítopos conservados entre si. Durante o acompanhamento dos animais após a administração da hemolinfa ou veneno foi observado o comportamento de *grooming* (autolimpeza) mais frequente nos

camundongos inoculados com a maior concentração de hemolinfa (Tabela 1). O *grooming* é um comportamento natural dos camundongos, e só passa ser considerado alterado quando ocorre fora do contexto social ou quando apresenta tricotilomania (AGUDELO *et al.*, 2013). Nos animais inoculados com veneno observou-se a ausência de mobilidade previamente à morte (Tabela 1).

A proteína identificada no ensaio de imunodeteção com epítomos conservados da LiRecDT1 com aproximadamente 36 kDa não foi identificada, mas isso não exclui a possibilidade de ser um fosfolipase-D inativa ou citosólica.

A toxina LiRecDT1 apresenta citotoxicidade em RAEC (células do endotélio da aorta de coelhos) no cultivo celular (CHAIM *et al.*, 2011a). Para avaliar a possível ação do veneno sobre os hemócitos realizou-se o cultivo primário dessas células. O estabelecimento das condições ideais para o cultivo primário de hemócitos era de grande interesse para determinar as funções de cada um dos hemócitos (BEDNASKI *et al.*, 2015).

Os hemócitos foram coletados em meio Sf-900-III SFM com antibiótico e mantidos em cultura a 28°C sem CO<sub>2</sub>. Durante os 3 dias em que foi mantido o cultivo primário dos hemócitos de *L. intermedia* não houve crescimento bacteriano. Contudo, no quarto dia de cultivo foi observada a presença de fungos filamentosos, uma vez que não havia antimicótico no meio de cultivo. Portanto, sugere-se a adição de antimicótico ao meio de cultivo para que os hemócitos possam ser mantidos por períodos de tempo maiores em cultura.

Os meios mais utilizados para células de cultura de insetos são os meios Grace, Sf-900-II SFM e Sf-900-III SFM (GUPTA, 2009). Para o cultivo primário dos hemócitos de *L. intermedia* foram testados todos os três meios de cultivo acima citados. O meio Sf-900-III SFM foi o escolhido para continuar o cultivo primário por conter maior concentração de nutrientes.

Para cultivar hemócitos de carrapato (*Rhipicephalus microplus*) Rezende e colaboradores (2015) utilizaram o antifúngico anfotericina B (250 µg/ml) em meio Leibovitz's L-15 (40% de SFB e 10% do suplemento de

*tryptose phosphate broth*, TPB) sem CO<sub>2</sub>. Os experimentos *in vitro* foram realizados após dois dias de cultivo dos hemócitos (REZENDE *et al.*, 2015).

No entanto, no trabalho de Tomiotto-Pellissier e colaboradores (2016) com hemócitos de *Galleria mellonella* (mariposa), os autores utilizaram meio RPMI 1640 (Gibco®, USA) com 10% SFB a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 1 h para adesão das células em placa de 24 poços. Sendo assim, outros meios de cultivo e condições podem ser utilizados para novas tentativas de cultivo primário dos hemócitos de *L. intermedia*. O meio de cultivo RPMI 1640, possui bicarbonato de sódio para realizar o tamponamento da solução por isso os hemócitos quando nesse meio devem ser mantidos em estufa de CO<sub>2</sub>. Em meios sem sistema de tamponamento (bicarbonato de sódio) os hemócitos podem ser mantidos sem CO<sub>2</sub>.

Após estabelecer o cultivo primário dos hemócitos de *L. intermedia* foi analisada a possível ação direta do veneno e da toxina LiRecDT1 sobre essas células. Os hemócitos foram incubados com veneno (42 µg/ml) e LiRecDT1 (42 µg/ml) e após 18 h não apresentaram alterações morfológicas, degranulação, apoptose ou necrose aparentes avaliadas em DIC utilizando o microscópio Nikon (A1RSiMP) (Figura 11). Diferentemente do que foi observado com as células de RAEC quando tratadas com 10 µg/ml de LiRecDT1, que apresentam vacuolização no citoplasma, lise celular e alteração da adesão ao substrato e às células vizinhas (CHAIM *et al.*, 2011a). Contudo, células tumorais (B16F10) tratadas com 10 µg/ml de LiRecDT1 não apresentam alterações na viabilidade celular e alterações morfológicas, porém geraram metabólitos lipídicos ativos que aumentaram o influxo de cálcio na presença de esfingomielina exógena (WILLE, 2014). Sabe-se que essas células tumorais apresentam alterações metabólicas que podem alterar o comportamento celular e são resistentes a morte celular, sendo assim essas células podem não ser responsivas ao veneno e a LiRecDT1 por possuir vários outros mecanismos de sobrevivência (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Os metabólitos lipídicos não foram avaliados neste trabalho.

A ausência de efeito deletério do veneno ou da toxina recombinante sobre os hemócitos pode sugerir que a composição da membrana

plasmática dessas células não favoreça a interação da fosfolipase-D do veneno e da LiRecDT1 com as mesmas. Como já discutido anteriormente, o fosfolípido mais abundante na hemolinfa é a fostatidilcolina (BEDNASKI *et al.*, 2015) e o substrato preferencial da toxina fosfolipase-D de *L. intermedia* é a esfingomielina (CHAIM *et al.*, 2011).

A observação da interação da toxina LiRecDT1-GFP com os hemócitos por meio na visualização da fluorescência da GFP foi prejudicada pela autofluorescência da própria amostra. A fluorescência basal do controle (amostra na ausência LiRecDT1 ou de veneno) era alta (elevou o *threshold*), o impediu a visualização da fluorescência pouco abundante da proteína recombinante (não detectável) (Figura 10D e 11D).

A caracterização inicial dos hemócitos, por microscopia óptica e utilização de colorações e citoquímicas, permitiu a identificação de quatro tipos de hemócitos (BEDNASKI *et al.*, 2015). Contudo, uma análise morfológica mais detalhada depende da compreensão da organização ultraestrutural dos hemócitos. Além disso, a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) seria importante para analisar os hemócitos após a incubação com o veneno ou a toxina recombinante, buscando uma análise mais detalhada dos possíveis efeitos nos hemócitos. Porém, ao final do processamento da MET observou-se que a membrana dos hemócitos não foi bem preservada, o que dificultou a identificação e caracterização das células (Figura 12). Além disso, o baixo número de células observadas ao final do processamento inviabilizou a obtenção de imagens pelo microscópio eletrônico. O *background* criado por proteínas insolúveis (precipitadas durante o processamento) também dificultou muito a visualização dos hemócitos na amostra. Dificuldades técnicas impediram a caracterização dos hemócitos por microscopia eletrônica (MET). Novas tentativas com alteração de parâmetros do protocolo de processamento podem ser testadas, além disso, uma grande quantidade de amostra será necessária para possibilitar a avaliação ultraestrutural dos hemócitos.

Para os estudos ultraestruturais dos hemócitos de *L. intermedia* foram considerados dados de Costa-Ayub e colaboradores (2005). Os autores determinaram a melhor metodologia de fixação e processamento para

observação de tecidos da aranha-marrom em microscopia eletrônica. Além disso, para escolher os tampões favoráveis para fixação do material, a osmolaridade da hemolinfa de *L. intermedia* foi determinada: 478 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Contudo, deve-se observar que como as aranhas passam por períodos de escassez de recursos alimentares e hídricos a osmolaridade da hemolinfa pode variar muito se o animal é capturado ou mantido em laboratório (MUELLER, 1987; COSTA-AYUB *et al.*, 2005).

Costa-Ayub e colaboradores (2005) concluíram que o melhor fixador é o glutaraldeído 2,5% associado ao tampão fosfato 100 mM com 50 mM de NaCl, pois preservou bem as membranas do complexo de Golgi e do retículo. Bednaski (2013) também verificou que o glutaraldeído 2,5% foi o melhor fixador para os hemócitos de *L. intermedia*. Sendo assim, a metodologia utilizada para caracterizar os hemócitos por MET foi a descrita como adequada para tecidos da aranha-marrom.

Na literatura científica encontram-se trabalhos de caracterização ultraestrutural de hemócitos. Araújo *et al.*, (2008) e Soares *et al.*, (2013) utilizaram cacodilato (0,2 M) como tampão diluente dos fixadores. Araújo e colaboradores (2008) realizaram como método a infusão de fixador para melhor preservar os pró-hemócitos, adipohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e trombocitóides de *Aedes aegypti*. E Soares e colaboradores (2013) não realizam a infusão, mas utilizaram glutaraldeído 4% para caracterizar os pró-hemócitos, os granulócitos do tipo I e II, esferulócito, oenocitóide e plasmatócito da aranha *Lasiadora sp.* (Araneae: Theraphosidae). Contudo, em nossas condições experimentais aumentar a concentração do fixador e/ou tempo de fixação causou precipitação das proteínas da hemolinfa de *L. intermedia*, formando um imenso *background* impedindo a observação da amostra.

Para tentar caracterizar os hemócitos de outra forma, essas células foram submetidas a separação por gradiente de Percoll®, mas os ensaios não foram reprodutíveis uma vez que o pH do gradiente de Percoll® era incompatível com a amostra da hemolinfa coletada em tampão citrato pH 4,6 (dados não mostrados).

Pode-se encontrar na literatura científica vários trabalhos de caracterização de hemócitos que utilizam a técnica de citometria de fluxo, para separar essas células. A partir da identificação de características exclusivas dos tipos específicos de hemócitos pode-se separá-los. Alguns pesquisadores descreveram e relataram características dos hemócitos que podem ser utilizadas para separar as células em citometria de fluxo por *sorting*, algumas delas são: ativação, marcadores específicos, diferenças fisiológicas provocadas por hormônios e diferenças de expressões gênicas (NAKAHARA *et al.*, 2009; MARRINGA *et al.*, 2014; ANDERL *et al.*, 2016).

Em um trabalho utilizando hemócitos de abelha foi mostrado que as células possuem diferenças na exposição de N-acetil-glucosamina e ácido siálico (MARRINGA *et al.*, 2014). Portanto, há hemócitos na hemolinfa das abelhas que apresentam mais ou menos esses resíduos glicídicos em sua superfície celular.

Sabe-se pouco sobre as características glicosídicas e bioquímicas dos hemócitos da hemolinfa de aranha-marrom, sendo assim, foram utilizados marcadores fluorescentes que pudessem evidenciar possíveis diferenças entre as populações dessas células e assim isolá-las com o auxílio da citometria de fluxo.

A lectina WGA conjugada a Alexa Fluor® 594 identificaria hemócitos com resíduos de N-acetilglucosamina e ácido siálico no glicocálix. O LisoTracker evidenciaria lúmens dos compartimentos do sistema de endomembranas com pH ácido. Contudo, a utilização dessas duas marcações não evidenciou diferenças entre as populações de hemócito, resultou em uma grande população marcada (Figuras 13 e 14). O MitoTracker é uma marcação que evidencia o conteúdo de mitocôndria das células. A utilização dessa marcação mostrou pequenas diferenças de intensidade de fluorescência, permitindo a separação da amostra em duas populações (mais e menos marcadas com Mitotracker) (Figura 15). Essa marcação diferenciada para os hemócitos foi utilizada para realização do *sorting*. Porém, ao analisar as populações isoladas de hemócitos observou-se a presença de granulócitos nas duas amostras (Figuras 16 e 17). Entretanto, os pró-hemócitos e os plasmatócitos foram observados

isoladamente indicando que a coloração com MitoTracker facilitou o isolamento dessas duas populações, ainda que na presença de granulócitos.

A separação dos pró-hemócitos e dos plasmatócitos por meio da marcação das mitocôndrias reflete o número dessa organela contido nessas células. Sugere-se que os pró-hemócitos estão em estado de pouca demanda energética devido a sua indiferenciação celular, apresentando uma menor quantidade de mitocôndrias. Os plasmatócitos são células mais ativas se comparado aos pró-hemócitos, portanto teriam um conteúdo de mitocôndrias maior (KUHN-NENTWIG *et al.*, 2014; GUPTA, 2009). Outra possibilidade é que a quantidade de mitocôndrias esteja relacionada com o tamanho celular; os pró-hemócitos são células que apresentam um volume citoplasmático menor e teriam possivelmente menos mitocôndrias. Além disso, as populações de hemócitos podem variar muito quando estimuladas pelo contato com patógenos, pelo estado nutricional do animal, por hormônios ou pela idade (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; GUPTA, 2009). A análise das lâminas que continham os hemócitos provenientes do *sorting*, corados com MGG, foi dificultada pela baixa quantidade de células e pela grande quantidade de células lisadas. Acredita-se que isso se deve à baixa eficiência do fixador ou mesmo do processamento das células durante e após o *sorting* (durante a coloração). Para produção das lâminas, o glutaraldeído 2,5% foi o fixador de escolha devido aos bons resultados observados anteriormente e por ser um bom fixador para outros tecidos de *L. intermedia* (BEDNASKI, 2013; COSTA-AYUB *et al.*, 2006). Observou-se também que o Fluoromount-G utilizado para a montagem das lâminas acabou eluindo o corante prejudicando a coloração MGG (Figura 18).

Os estudos sobre hemócitos disponíveis na literatura indicam que os granulócitos são os principais produtores de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (JIRAVANICHPAISAL, *et al.*, 2006; KUHN-NENTWIG *et al.*, 2014). Por isso o interesse em purificar os granulócitos da hemolinfa de *L. intermedia*. Os AMPs são peptídeos circulantes na hemolinfa dos artrópodes, responsáveis pela defesa imunológica dos animais contra bactérias, fungos e vírus (PARK *et al.*, 2015).

Buscando verificar um estudo mais amplo da hemolinfa de *L. intermedia* optamos por realizar um estudo proteômico do tipo *shotgun*. Além de um conhecimento mais detalhado sobre as proteínas presentes na hemolinfa buscava-se identificar a presença de inibidores enzimáticos. A proteômica baseada em espectrometria de massas é um campo da ciência que tem crescido bastante na última década. Essa ferramenta é utilizada para diversos objetivos e fins. A capacidade de resolução dos espectrômetros de massas e software de análise de dados tem acompanhado esse crescimento (CARVALHO *et al.*, 2015). A combinação de espectros de alta resolução com sistemas cromatográficos possibilitou a identificação de mais de 8.400 proteínas em pouco tempo de análise por LC-MS/MS (WISNIEWSKI *et al.*, 2013), demonstrando assim que a proteômica é o método analítico mais adequado para avaliar misturas complexas de proteínas, como é o caso da hemolinfa de *L. intermedia*.

Os artigos mais recentes indicam que a metodologia de clivagem com enzimas de digestão e a cromatografia acoplada ao espectrômetro de massas (MS) são as que mais facilitam o trabalho de leitura dos peptídeos no MS e são os que mais auxiliam na identificação de diversas proteínas (WISNIEWSKI *et al.*, 2013; MEISSNER; MANN, 2014).

Após a obtenção dos espectros teóricos, as sequências aminoacídicas obtidas pela técnica *de novo sequencing* foram confrontadas com as informações contidas em um banco de dados de proteínas (construído especificamente para este fim). Este processo buscou identificar as proteínas contidas na hemolinfa de *L. intermedia*.

Embora a escolha do método da proteômica neste trabalho tenha sido adequada, a grande maioria das proteínas identificadas na hemolinfa de *L. intermedia* estava relacionada a funções celulares (*housekeeping*). Nenhum possível inibidor foi identificado, embora a presença de esfingomielinase-D tenha sido detectada com baixo intervalo de confiança (Tabela 2, linha 11).

Grande parte das sequências aminoacídicas obtidas na análise proteômica foram homólogas à hemocianina. A hemocianina é uma proteína multifuncional altamente conservada entre os invertebrados e que tem associação com o cobre e possui alta afinidade pelo oxigênio, atuando nos

eventos de trocas gasosas e resposta imune (PINNOW *et al.*, 2016). A hemocianina pode atuar como fenoxidase em artrópodes quelicerados e também pode atuar na imunidade inata (DECKER *et al.*, 2007; CERENIUS; SODERHALL, 2004; SCHENK *et al.*, 2015). A hemocianina é uma proteína bastante representativa na hemolinfa da *L. intermedia* (BEDNASKI *et al.*, 2015), assim como em outros aracnídeos mais próximos (TRABALON *et al.*, 2010; SANGGAARD *et al.*, 2016). Os fragmentos da hemocianina de *Haliotis tuberculata* (ostra) são capazes de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (SCHENK *et al.*, 2015).

As sequências aminoacídicas da hemolinfa de *L. intermedia* revelaram similaridade com uma proteína com atividade antifúngica anteriormente caracterizada e denominada como rondonina (cadeia da hemocianina) (Tabela 2, linha 3). E como nenhuma proteína com ação inibitória de enzimas foi identificada, nos ensaios realizados neste trabalho de tese, optou-se por investigar a atividade antimicrobiana da hemolinfa de *L. intermedia*.

A possível atividade antimicrobiana da hemolinfa de *L. intermedia* foi avaliada a partir do fracionamento da amostra em cromatografia de alta performance (HPLC). Uma das técnicas que tem sido amplamente utilizada para encontrar moléculas bioativas na hemolinfa de artrópodes é a cromatografia (SIVAKAMAVALLI *et al.*, 2015). Pesquisadores utilizam frações purificadas de hemolinfa obtidas por cromatografia para segregar os peptídeos antimicrobianos (AMPs) e determinar suas atividades (SILVA JR, 2000, FUKUZAWA *et al.*, 2008). Esses AMPs são liberados pelos hemócitos na hemolinfa dos artrópodes para constituir o sistema de defesa (GUIMARÃES *et al.*, 2014). Como os invertebrados não apresentam imunidade adaptativa os AMPs liberados apresentam atividade contra uma grande variedade de microrganismos patogênicos (PARK *et al.*, 2015). Em insetos a produção dos AMPs pode ser estimulada, mas para aracnídeos essa produção é constitutiva e não há como estimular os granulócitos a produzirem mais peptídeos (FUKUZAWA *et al.*, 2008; OYANEDEL *et al.*, 2016). Sendo assim, o fracionamento dos AMPs originários de hemolinfa de aracnídeos pode ser dificultado pela baixa concentração desses peptídeos.

Para o fracionamento e isolamento dos peptídeos da hemolinfa de *L. intermedia* foi adaptado o protocolo de Riciluca e colaboradores (2012). Os autores desse trabalho isolaram da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria rondoniae* um peptídeo antifúngico por HPLC. Após a precipitação das proteínas de alta massa molecular, os peptídeos da hemolinfa foram isolados por HPLC (Figura 19).

As frações isoladas da hemolinfa de *L. intermedia* não apresentaram atividade de inibição do crescimento de *C. albicans* (Figura 20) e também não inibiram o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* (Figura 21). A ausência de atividade antimicrobiana pode estar relacionada com a baixa concentração de peptídeos isolados ao final da purificação, não sendo suficientes para inibir o crescimento dos microrganismos. Outra possível justificativa para ausência de atividade antimicrobiana pode estar na escolha dos microrganismos testados, ou seja, os peptídeos isolados podem apresentar atividade antifúngica e/ou antibacteriana contra outras espécies de patógenos ou microrganismos não testados.

## 11- CONCLUSÕES

A presença da hemolinfa de *L. intermedia* promoveu uma redução de 70% da atividade esfingomielinásica da toxina recombinante LiRecDT1, não pode ser descartada a presença de um inibidor ou da hemolinfa estar sendo utilizada como substrato.

Há na hemolinfa uma proteína com massa molecular de aproximadamente 36 kDa que apresenta um epítipo conservado relacionado com a fosfolipase-D (isoforma 1) do veneno de *L. intermedia*. Nos ensaios em camundongos a hemolinfa não foi letal e não apresentou toxicidade nas concentrações e condições testadas.

Para o cultivo primário de hemócitos devem ser utilizados antibiótico (250 µg/ml de gentamicina) e também antimicótico. Os hemócitos tratados com veneno de *L. intermedia* ou toxina LiRecDT1 não apresentaram efeitos como alterações morfológicas, degranulação, apoptose ou necrose aparente.

O protocolo de processamento da hemolinfa para observação em microscopia eletrônica precisa ser estabelecido. As condições utilizadas neste estudo não permitiram a caracterização ultraestrutural dos hemócitos.

A marcação diferencial com MitoTracker foi capaz de separar dois tipos de hemócitos por *sorting* no citômetro de fluxo: pró-hemócitos e plasmatócitos, contudo foram encontrados granulócitos nas duas amostras, impedindo a separação desse tipo celular. As marcações com LisoTracker e lectina WGA não evidenciaram características particulares dos diferentes hemócitos.

A análise proteômica *shotgun* da hemolinfa de *L. intermedia* indicou a presença de proteínas estruturais, hemocianina e uma proteína com homologia a proteína com ação antifúngica (rondonina), nortando assim os ensaios antimicrobianos.

Os peptídeos obtidos da hemolinfa por HPLC não apresentaram atividade contra *C. albicans* nas condições testadas. E os peptídeos

purificados por colunas C-18 não foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*. Contudo, a presença de peptídeos antimicrobianos na hemolinfa não pode ser descartada.

A hemolinfa de *L. intermedia* é uma amostra biológica extremamente rica e deve ser estudada em maior profundidade. As dificuldades de caracterização do conteúdo molecular e celular da hemolinfa estão relacionadas com a complexidade da amostra e com o baixo rendimento na obtenção do material.

## 12- REFERÊNCIAS

AGUDELO, J.A.B.; QUADROS, A.S.F.; FILHO, L.C.P.M; Scratching, cleaning and social bonding: grooming and their biological meaning in ruminants. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**. v. 8, n. 2, p.1-12. 2013.

ANDERL, I.; VESALA, L.; IHALAINEN, T.O.; VANHA-AHO, L. M.; ANDÓ, I.; RÄMET, M.; HULTMARK, D. Transdifferentiation and proliferation in two distinct hemocyte lineages in *Drosophila melanogaster* larvae after wasp infection. **PLOS Pathogens**. v. 12, n. 7, p. 1-34. 2016.

ARAÚJO, H.C.R.; CAVALCANTI, M.G.S.; SANTOS, S.S.; ALVES, L.C.; BRAYNER, F.A. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Micron**. v.39, p. 184–189, 2008.

APPEL, M.H.; da SILVEIRA R.B.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SILVA, D.T.; CHAVES, D.M.; da SILVA, P.H.; MANGILI, O.C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochemical et Biophysica Acta**. v.1780, p.167- 178, 2008.

BAEK, J.H.; LEE, S.H.; KIM, W.Y.; KIM, M.G. An insulin-binding protein from the venom of a solitary wasp *Eumenes pomiformis* binds to apolipoprotein III in lepidopteran hemolymph. **Toxicon**. v. 111, p. 62-64. 2016.

BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C. Mecanismo de ação do veneno de *Loxosceles* e aspectos clínicos do loxoscelismo. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**. p. 160–174. 2003.

BARBARO, K.C.; KNYSAK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**. v.45, p.489-499, 2005.

BAUMANN, T.; KÄMPFERSTEFAN, R.; SCHÜRCH, S.; JOHANN, S.; LARGIADÈR, C.; NENTWIG, W.; KUHN-NENTWIG, L. Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 67, n. 16, p. 2787–2798. 2010a.

BAUMANN, T.; KUHN-NENTWIG, L.; LARGIADÈR, C.R.; NENTWIG, W. Expression of defensins in non-infected araneomorph spiders. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 67, n. 15, p. 2643-2651. 2010b

BEDNASKI, A.V. **Avaliação do perfil lipídico e proteico e caracterização dos hemócitos da hemolinfa de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)**. 96 p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) pela Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2013.

BEDNASKI, A.V.; TREVISAN-SILVA, D.; MATSUBARA, F.H.; BOIA-FERREIRA, M.; OLIVÉRIO, M. M.; GREMSKI, L.H.; CAVALHEIRO, R.P.; DE PAULA, B.M.B.; PAREDES-GAMERO, E.J.; TAKAHASHI, H.K.; TOLEDO, M.S.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; CHAIM, O.M.; SENFF-RIBEIRO, A. Characterization of Brown spider (*Loxosceles intermedia*) hemolymph: Cellular and biochemical analyses. **Toxicon**. v.98, p. 62–74, 2015.

BIARDI J.E.; HO C.Y.L.; MARCINCZYK J.; NAMBIAR K.P. Isolation and identification of a snake venom metalloproteinase inhibitor from California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) blood sera. **Toxicon**. v. 58, p. 486–493, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.

BRYANT, W.B.; MICHEL, K. *Anopheles gambiae* hemocytes exhibit transient states of activation. **Developmental & Comparative Immunology**. v. 55, p. 119–129. 2016.

CABRERIZO, S.; DOCAMPO, P.C.; CARI, C.; ROZAS, M.O.; DÍAZ, M.; de ROODT A.; CURCI, O. Loxoscelismo: epidemiología y clínica de una patología endémica em el país. **Archivos argentinos de pediatría, Argentina**, v.107, p.152-159, 2009.

CAMPO, M.D.; ARANCIBIA, S.; NOVA, E.; SALAZAR, F.; GONZÁLEZ, A.; MOLTEDO, B.; IOANNES, P.; FERREIRA, J.; MANUBENS, A.; BECKER, M.I. Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina actual. **Revista médica de Chile**. v. 139, p. 236-246. 2011.

CANALS, M.; VELOSO, C.; SOLÍS, R. Adaptation of the spiders to the environment: the case of some Chilean species. **Frontiers in Physiology**. v.11, n. 6, p. 220. 2015.

CAPPELARI, F.A.; TURCATTO, A.P.; MORAIS, M.M.; DE JONG, D. Africanized honey bees more efficiently convert protein diets into hemolymph protein than do Carniolan bees (*Apis mellifera carnica*). **Genetics and Molecular Research**. v. 8, n. 4, p. 1245-1249, 2009.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**. v. 198, p. 116–126, 2004.

CERENIUS, L.; KAWABATA, S.; LEE, B.L.; NONAKA, M; SÖDERHÄLL, K. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. **Trends in Biochemical Science**. v. 35, n. 10, p. 575-583. 2010.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; da SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E. ; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.221, p. 64- 77, 2006.

CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V.P.; SADE, Y.B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H.K.; TOLEDO, M.S.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochemical Biophys Acta**. v.1811, n. 2, p. 84-96, 2011a.

CHAIM, O.M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A.C.; FERRER, V.P.; MATSUBARA, F.H.; MANGILI, O.C.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. **Toxins (Basel)**. v.3, n.3, p. 309-44. 2011b.

CHAN, Q.W.T.; HOWES, C.G.; FOSTER, L.J. Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 5, p.2252–2262, 2006.

CHAVES-MOREIRA, D.; SOUZA, F.N.; FOGAÇA, R.T.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.112, n. 9, p. 2529-2540, 2011.

CHAVES-MOREIRA, D.; DE MORAES, F.R.; CARUSO, Í.P.; CHAIM, O.M.; SENFF-RIBEIRO, A.; ULLAH, A.; DA SILVA, L.S.; CHAHINE, J.; ARNI, R.K.; VEIGA, S.S. Potential Implications for Designing Drugs Against the Brown Spider Venom Phospholipase-D. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 9999, p. 1–13. 2016.

CHEN, Y.; CAO, J.; ZHANG, X. The Role of Cytokine PF4 in the Antiviral Immune Response of Shrimp. **PLOS one**. v. 11, n. 9. 2016.

CHERQUI, A.; CRUZ, N.; SIMÕES, N. Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimna unipuncta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 31, p. 761-9. 2001.

CHRISTOFF, A.O.; OLIVEIRA, A.; CHAIM, O.M.; LUGARINI, D.; PEREIRA, A.L.B.; PALUDO, K.S.; TELLES, J.E.Q.; BRACHT, A.; VEIGA, S.S.; ACCO,

A. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**. v.52, p.695-704, 2008.

COATES, C.J.; NAIRN, J. Diverse immune functions of hemocyanins. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 45, p. 43–55. 2014.

COSTA-AYUB, C. L. S.; FARACO, C. D.; FREIRE, C. A. Evaluation of fixative solutions for ultrastructural analysis of brown spider *Loxosceles intermedia* (araneae: sicariidae) tissues. **Brazilian Journal of Biology**. v.66, n. 4, p. 1117-1122. 2006.

CUNNINGHAM, M.; POLLERO, R.J. Characterization of lipoprotein fractions with high content of hemocyanin in the hemolymphatic plasma of *Polybetes pythagoricus*. **The Journal Of Experimental Zoology**. v.274, p.275-280, 1996.

DAFFRE, S.; MIRANDA, A.; MIRANDA, M.T.M.; BULET, P.; SILVA JR, P.I.; MACHADO, A.; FOGAÇA, A.C.; LORENZINI, D.M.; PEREIRA, L.S.; FÁZIO, M.A.; ESTEVES, E.; BURGIERMAN, M.R. Peptídeos antibióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 23, p. 48-55. 2001.

DANG, V.T.; BENKENDORFFT, K.; SPECK, P.; In vitro antiviral activity against herpes simplex virus in the abalone *Haliotis laevigata*. **Journal of General Virology**. v. 92, p. 627–637. 2011.

DAQUINAG, A.C.; SATO, T.; KODA, H.; TAKAO, T.; FUKUDA, M.; SHIMONISHI, Y.; TSUKAMOTO, T. A novel endogenous inhibitor of phenoloxidase from *Musca domestica* has a cystine motif commonly found in snail and spider toxins. **Biochemistry**. v. 38, p. 2179-2188. 1999.

DECKER, H.; HELLMANN, N.; JAENICKE, E.; LIEB, B.; MEISSNER, U.; MARKL, J. Minireview: Recent progress in hemocyanin research. **Integrative and Comparative Biology**. v. 47, n. 4, p. 631–644, 2007.

DEFFERRARI, M.S.; ORCHARD, I.; LANGE, A.B. An Insulin-Like Growth Factor in *Rhodnius prolixus* Is Involved in Post-feeding Nutrient Balance and Growth. **Frontiers in Neuroscience**. v. 10, n. 566, p. 1-12. 2016.

DIAS-LOPES, C.; FELICORI, L.; RUBRECHT, L.; COBO, S.; MOLINA, L.; NGUYEN, C., GALÉA, P.; GRANIER, C.; MOLINA, F.; CHÁVEZ-OLORTEGUI C. Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms. **Vaccine**. v. 32, n.18, p. 2086-2092, 2014.

DOSSEY, A.T. Insects and their chemical weaponry: new potential for drug discovery. **Natural Product Reports**. v.27, n.12, p:1737-57, 2010.

EVANGELISTA, S.S.; OLIVEIRA, A.C. *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 68, n. 1. 2015.

FERREIRA, F.R.B. **Identificação e caracterização parcial da atividade hemaglutinante e inibidor de proteases na hemolinfa de aranha caranguejeira *Lasiodora* sp.** 69 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE, 2006.

FERRER, V.P.; DE MARI, T.L.; GREMSKI, L.H.; TREVISAN-SILVA, D.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, W.; CHAIM, O.M.; SENFF-RIBEIRO, A.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v.7, n. 5, p. 1-12. 2013.

FIGUEIREDO, M.B.; CASTRO, D.P.; NOGUEIRA, N.F.S.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Cellular immune response in *Rhodnius prolixus*: Role of ecdysone in hemocyte phagocytosis. **Journal of Insect Physiology**. v. 52, n. 7, p. 711–716. 2006.

FIGUEIREDO, M.B.; GENTA, F.A.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Lipid mediators and vector infection: *Trypanosoma rangeli* inhibits *Rhodnius prolixus* hemocyte phagocytosis by modulation of phospholipase A2 and PAF-acetylhydrolase activities. **Journal of Insect Physiology**. v. 54, p. 1528–1537. 2008.

FISCHER, M.L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Medical Entomology**. v.42, p.756-765, 2005.

FISCHER, M.L.; GROSSKOPF, C.B.; BAZÍLIO, S.; RICETTI, J. Araneofauna sinantrópica associada com a família Sicariidae no município de União da Vitória, Paraná, Brasil. *Sitentibus série Ciências Biológicas*. v.11, n.1, p. 48–56. 2011.

FISCHER, M.L.; DINIZ, S.; VASCONCELLOS-NETO, J. Do agonistic interactions underlie the segregation and relative abundances between two *Loxosceles* species (araneae: sicariidae)? **Journal of Medical Entomology**. v.51, n.3, p.547-559, 2014.

FRUTTERO, L.L.; LEYRIA, J.; RAMOS, F.O.; STARIOLO, R.; SETTEMBRINI, B.P.; CANAVOSO, L.E. The process of lipid storage in insect oocytes: The involvement of  $\beta$ -chain of ATP synthase in lipophorin-mediated lipid transfer in the chagas' disease vector *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Insect Physiology**. v. 96, p. 82-92. 2017.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American journal of the medical sciences**. v. 304, p.261-267, 1992.

FUKUZAWA, A.H.; VELLUTINI, B.C.; LORENZINI, D.M.; SILVA JUNIOR, P.I.; MORTARAD,R.A.; SILVA, J.M.C.; DAFFRE, S. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental and Comparative Immunology**. v.32, p.716–725, 2008.

GARCÍA, F.; GONZÁLEZ-BARÓ, M.; POLLERO, R. Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borellii*. **Lipids**. v. 37, n. 6, p.581-585. 2002.

GERTSCH, W.J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Aranae, Scytodidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v.136, p.117-174, 1967.

GUIMARÃES, J.; MARQUES, E.J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; DE ALBUQUERQUE, A.C.; DOS PASSOS, E.M.; SILVA, C.C.M.; TEIXEIRA, A.A.C. Sublethal effect of concentrations of *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok on the larval stage and immunologic characteristics of *Diatraea flavipennella* (box) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 86. n. 4. 2014.

GREMSKI, L.H.; SILVEIRA, B.R.; CHAIM, O.M.; PROBST, M.C.; FERRER, V.P.; NOWATZKI, J. WEINSCHUTZ, H.C.; MADEIRA, H.M.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**. v.6, n. 12, p. 2403–2416, 2010.

GREMSKI, L.H.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V.P.; MATSUBARA, F.H.; MEISSNER, G.O.; WILLE, A.C.; VUITIKA, L.; DIAS-LOPES, C.; ULLAH, A.; DE MORAES, F.R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; BARBARO, K.C.; MURAKAMI, M.T.; ARNI, R.K.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**. v. 83, p.91-120. 2014.

GULLAN, P.J. ; CRANSTON, P.S. **Os insetos, um resumo de entomologia**. Ed. Roca, São Paulo, 3° ed., 2008.

GUPTA, A.P. **Insect hemocyte**. 2009. Cambridge University Press, Cambridge- England. p.85-128, 2009.

KANOST, M.R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental & Comparative Immunology**. v. 23, p. 291–301. 1999.

KLUBMANN-FRICKE, B.J.; POMREHN, S.W.; WIRKNER, C.S. A wonderful network unraveled - Detailed description of capillaries in the prosomal ganglion of scorpions. **Frontiers in Zoology**. v.11, p.28, 2014.

KONUMA, T.; TSUKAMOTO, Y.; NAGASAWA, H.; NAGATA, S. Imbalanced Hemolymph Lipid Levels Affect Feeding Motivation in the Two-Spotted Cricket, *Gryllus bimaculatus*. **PLoS One**. v. 11, n. 5, p.1-16. 2016

KUHN-NENTWIG, L.; LARGIADÈR, C.R.; STREITBERGER, K.; CHANDRU, S.; BAUMANN, T.; KÄMPFER, U.; SCHALLER, J.; SCHÜRCH, S.; NENTWIG, W. Purification, cDNA structure and biological significance of a single insulin-like growth factor-binding domain protein (SIBD-1) identified in the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.41, n. 11, p. 891-901. 2011.

KUHN-NENTWIG, L.; NENTWIG, W. The Immune System of Spiders. In: **Spider Ecophysiology**. (1 ed.). Berlin: Springer, 2013. p. 81-91.

KUHN-NENTWIG, L.; KOPP, L.S.; NENTWIG, W.; HAENNI, B.; STREITBERGER, K.; SCHÜRCH, S.; SCHALLER, J. Functional differentiation of spider hemocytes by light and transmission electron microscopy, and MALDI-MS-imaging. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 43, p. 59–67, 2014.

KURTI, D.; KAYIŞ, T. Effects of the pyrethroid insecticide deltamethrin on the hemocytes of *Galleria mellonella*. **Turkish Journal of Zoology**. v. 39, p. 1405–1466. 2015.

HADANNY, A.; FISHLEV, G.; BECHOR, Y.; MEIR, O.; EFRATI, S.; Nonhealing Wounds Caused by Brown Spider Bites: Application of Hyperbaric Oxygen Therapy. **Advances in Skin & Wound Care**. v. 29, n. 12, p. 560-566. 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. v. 144, p. 646-674. 2011.

HELLMANN, N.; RAITHEL, K.; DECKER, H. A potential role for water in the modulation of oxygen-binding by tarantula hemocyanin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 136, p. 725–734. 2003.

IWANAGA,S.; LEE, B.L. Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v. 38, n. 2, p.128-150. 2005.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**.v. 211, p. 213–236, 2006.

JOAZEIRO, A.C.; COUTINHO, M.L.; MARTINS, J.R.; MASUDA, A.; SEIXAS, A.; JUNIOR, I.S.V. Peptídeos antimicrobianos em Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.40, n.4, p. 1066. 2012.

LAINO, A.; MATTONI, C.; OJANGUREN-AFFILASTRO, A.; CUNNINGHAM, M.; GARCIA, C.F. Analysis of lipid and fatty acid composition of three species of scorpions with relation to different organs. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. v. 190, p. 27–36. 2015.

LORENZINI, D.M.; FUKUZAWA, A.H.; SILVA JR, P.I.; MACHADO-SANTELLIC, G.; BIJOVSKYA, A.T.; DAFFRE, S. Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 33, n. 10, p.1011–1016. 2003a.

LORENZINI, D.M.; SILVA JR, P.I.; FOGAÇA, A.C.; BULETC, P.; DAFFRE, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental & Comparative Immunology**. v. 27, n. 9, p. 781–791. 2003b.

KWON, H.; BANG, K.; CHO, S. Characterization of the hemocytes in Larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis*: involvement of granulocyte-mediated phagocytosis. **PLOS one**. v. 9, n. 8. 2014.

MARCUSSI S.; STÁBELI R. G.; SANTOS-FILHO N. A.; MENALDO D. L.; PEREIRA L. L. S.; ZULIANI J. P.; CALDERON L. A.; SILVA S. L.; ANTUNES L. M. G.; SOARES A.M. Genotoxic effect of Bothrops snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**. v. 65, p. 9–14, 2013.

MARRINGA, W.J.; KRUEGER, M.J.; BURRITT, N.L.; BURRITT, J.B. Honey bee hemocyte profiling by flow cytometry. **PLOS One**. v.9, n.10, p. 1-10, 2014.

MAFRA, D.G.; SILVA JR, P.I.; GALHARDO, C.S.; NASSAR, R.; DAFFRE, S.; SATO, M.N.; BORGES, M.M. The spider acylpolyamine Mygalin is a potent modulator of innate immune responses. **Cellular Immunology**. v. 275, p. 5–11. 2012.

MAKAROVA, O.; RODRIGUEZ-ROJAS, A.; ERAVCI, M.; WEISE, C.; DOBSON, A.; JOHNSTON, P.; ROLFF, J. Antimicrobial defence and persistent infection in insects revisited. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. v.371, n.1695. 2016.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, p.331-335, 2005.

MATSUBARA, F.H.; MEISSNER, G.O.; HERZIG, V.; JUSTA, H.C.; DIAS, B.C.; TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; KING, G.F., VEIGA, S.S. Insecticidal activity of a recombinant knottin peptide from *Loxosceles intermedia* venom and recognition of these peptides as a conserved family in the genus. **Insect Molecular Biology**. v.26, n. 1, p. 25–34. 2017.

MEISSNER, F.; MANN, M. Quantitative shotgun proteomics: considerations for a high-quality workflow in immunology. **Nature Immunology**. v.15, n.2, p.112-117, 2014.

MUELLER, J.H.; HINTON, J. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. v. 48, p. 330-333. 1941.

MUELLER, H.M. ionic concentrations, osmolarity and pH of the haemolymph of the common house spider *Tegenaria atrica* c.l. koch (agelenidae, arachnida). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 87A, n. 2, p. 433-437. 1987.

NAKAHARA, Y.; SHIMURA, S.; UENO, C.; KANAMORI, Y.; MITA, K.; KIUCHI, M.; KAMIMURA, M. Purification and characterization of silkworm hemocytes by flow cytometry. **Developmental and Comparative Immunology**. v.33, p. 439–448, 2009.

PALM, W.; SAMPAIO, J.L.; BRANKATSCHK, M.; CARVALHO, M.; MAHMOUD, A.; SHEVCHENKO, A.; EATON, S. Lipoproteins in *Drosophila melanogaster* assembly, function, and influence on tissue lipid composition. **PLOS Genetics**. v. 8, n. 7, p.1-18. 2012.

PAREDES, J.C.; HERREN, J.K.; SCHÜPFER, F.; LEMAITRE, B. The Role of Lipid Competition for Endosymbiont-Mediated Protection against Parasitoid Wasps in *Drosophila*. **MBio**. v. 7, n. 4, p. 1-16. 2016.

PAULI, I. **Avaliação do efeito terapêutico do soro antiloxoscélico em coelhos em diferentes intervalos de tempo após exposição ao veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)**. 108 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) pela Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2008.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**. n. 2, p. 74–79. 2011.

PARK, S.I; KIMB, J.W.; YOE, SM. Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Developmental & Comparative Immunology**. v.52, n.1, p. 98–106, 2015.

PEREIRA, L.S.; SILVA JR, P.I.; MIRANDA, M.T.M.; ALMEIDA, I.C.; NAOKI, H.; KONNO, K.; DAFFRE, S. Structural and biological characterization of one

antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 352, p. 953–959. 2007.

PERKHULYN, N.V.; ROVENKO, B.M.; ZVARYCH, T.V.; LUSHCHAK, O.V.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. Sodium chromate demonstrates some insulin-mimetic properties in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. v.15, n. 167, p.74-80, 2014.

PINNOW, P.; FABRIZIUS, A.; PICK, C.; BURMESTER, T. Identification and characterisation of hemocyanin of the fish louse *Argulus* (Crustacea: Branchiura). **Journal of Comparative Physiology B**. v. 186, n. 2, p. 161–168. 2016.

PLATINICK, N.I. **The World Spider Catalog**. American Museum of Natural History; New York, NY, USA: 2014. Version. 14.5.

PORCHER, R.D. **Estudo sobre a capacidade glicogênica da aranha caranguejeira (*Grammostola sp- Mygalomorphae*) durante o inverno e o verão**. 84 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2005.

RAHMAN, M.S.; CHOI, Y.H.; CHOI, Y.S.; YOO, J.C. Glycin-rich antimicrobial peptide YD1 from *B. amyloliquefaciens*, induced morphological alteration in and showed affinity for plasmid DNA of *E. coli*. **AMB Express**. v.7, n. 8, p. 2-11. 2017.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; FINN, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**. v.44, p. D343–D350. 2016.

REZENDE, J.; RANGEL, C.P.; MCINTOSH, D.; SILVEIRA, J.A.G.; CUNHA, N.C.; RAMOS, C.A.N.; FONSECA, A.H. In vitro cultivation and cryopreservation of *Babesia bigemina* sporokinetes in hemocytes of *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**. v. 212, p. 400–403. 2015.

RICILUCA, K.C.T.; SAYEGH, R.S.R.; MELO, R.L.; SILVA, P.I. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. **Results in immunology**. v. 2, p.66-71, 2012.

RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. **Developmental & Comparative Immunology**. v.34, n. 4, p. 377–386. 2010.

RODRIGUES, J.; BRAYNER, F.A.; ALVES, L.C.; DIXIT, R.; BARILLAS-MURY, C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in

*Anopheles gambiae* mosquitoes. **Science**. v. 329, n. 5997, p. 1353–1355. 2010.

OLIVEIRA, A.C.; DAMASCENO, Q.S. Superfícies do ambiente hospitalar como possíveis reservatórios de bactérias resistentes: uma revisão. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. v. 44, n. 4, p. 1118-23. 2010.

OYANEDEL, D.; GONZALEZ, R.; FLORES-HERRERA, R. BROKORDT, K.; ROSA, R.D.; MERCADO, L.; SCHMITT, P. Molecular characterization of an inhibitor of NF- $\kappa$ B in the scallop *Argopecten purpuratus*: First insights into its role on antimicrobial peptide regulation in a mollusk. **Fish and Shellfish Immunology**. v. 52, p. 85-93. 2016.

SINAN (Sistema de Informação de Agravos e Notificações). Acesso em 16 de Janeiro de 2017, às 21:30.

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>

SADE, Y.B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.44, n. 1, p. 170-7. 2012.

SANGGAARD, K.W.; DYRLUND, T.F.; BECHSGAARD, J.S.; SCAVENIUS, C.; WANG, T.; BILDE, T.; ENGHILD, J.J. The spider hemolymph clot proteome reveals high concentrations of hemocyanin and von Willebrand factor-like proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1864, p. 233–241. 2016.

SANTOS, V.L.P. **Caracterização estrutural e bioquímica das glândulas produtoras de veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom)**. 120p. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e Molecular) pela Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR. 1999.

SANTOS, H.A.; THOMÉ, S.M.; BALDANI, C.D.; SILVA, C.B.; PEIXOTO, M.P.; PIRES, M.S.; VITARI, G.L.; COSTA, R.L.; SANTOS, T.M.; ANGELO, I.C.; SANTOS, L.A.; FACCINI, J.L.; MASSARD, C.L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites & Vectors**. v.11, n.6, p.348, 2013.

SCHENK, S.; SCHMIDTA, J.; HOEGERB, U.; DECKERA, H. Lipoprotein-induced phenoloxidase-activity in tarantula hemocyanin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**. v.1854, n.8, p.939–949, 2015.

SCHMITT, S.; UGRANKAR, R.; GREENE, S.E.; PRAJAPATI, M.; LEHMANN, M. *Drosophila* Lipin interacts with insulin and TOR signaling

pathways in the control of growth and lipid metabolism. **Journal of Cell Science**. v. 128, n. 23, p. 4395-406. 2015.

SHESHADRI, P., ABRAHAM, J. Antimicrobial properties of hemoglobin. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. v. 34, p. 896–900. 2012.

SILVA JUNIOR, P.I. **Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana***. 169 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) pela Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, 2000.

SIVAKAMAVALLI, J.; NIROSHA, R.; VASEEHARAN, B. Purification and Characterization of a Cysteine-Rich 14-kDa Antibacterial Peptide from the Granular Hemocytes of Mangrove Crab *Episesarma tetragonum* and Its Antibiofilm Activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.176, n.4, p. 1084-101, 2015.

SOARES, T. **Hemocitos da aranha *Lasiadora* sp. (Araneae: Theraphosidae) caracterização e purificação de inibidor de serino protease**. 67p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) pela universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2011.

SOARES, T.; FERREIRA, F.R.B.; GOMES, F.S.; COELHO, L.C.B.B.; TORQUATO, R.J.S.; NAPOLEAO, T.H.; CAVALCANTI, M.S.M.; TANAKA, A.S.; PAIVA, P.M.G. The first serine protease inhibitor from *Lasiadora* sp. (Araneae: Theraphosidae) hemocytes. **Progress in Biochemistry and Biophysics**. v. 46, p.2317–2321. 2011.

SOARES, T.; CAVALCANTI, M.G.; FERREIRA, F.R.; CAVALCANTI, Mdo. S.; ALVES, L.C.; BRAYNER, F.A.; PAIVA, P.M. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Lasiadora* sp. (Koch, 1850) (Araneae: Theraphosidae). **Micron**. v. 48, p. 11-6. 2013.

SODERHALL, K.; SMITH, V.J.; Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Developmental And Comparative Immunology**. v. 7, p. 229-239, 1983.

STALMACH, M.; WILCZEKA, G.; HOMAB, J.; SZULINSKA, E. Antioxidative and immunological responses in the haemolymph of wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) exposed to starvation and dimethoate. **Environmental Pollution**. v. 206, p. 551–559. 2015.

STANGE, C.; SIDHU, J.P.S.; TIEHM, A.; TOZE, S. Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates **International journal of hygiene and environmental health**. v. 219, n. 8, p. 823–831, 2016.

STROMDAHL, E. Y.; HICKLING, G. J. Beyond Lyme: aetiology of Tick-borne human diseases with emphasis on the South-Eastern United States. **Zoonoses Public Health**. v.59, p.48–64, 2012.

TRABALON, M.; CARAPITO, C.; VOINOT, F.; MARTRETTE, J.M.; DORSSELAER, A.V.; GILBERT, C.; BERTILE, F. Differences in *Brachypelma albopilosa* (Theraphosidae) hemolymph proteome between subadult and adult females. **The Journal of Experimental Zoology A**. v.313, p. 651–659, 2010.

TRABALON, M. Agonistic interactions, cuticular and hemolymphatic lipid variations during the foraging period in spider females *Brachypelma albopilosa* (Theraphosidae). **Journal of Insect Physiology**. v.57, n. 6, p. 735-743, 2011.

TREVISAN-SILVA, D.; BEDNASKI, A.V.; GREMSKI, L.H.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S.; SENFF-RIBEIRO, A. Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. **Toxicon**. v.76, p.11–22, 2013.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; CATANEO, A.H.; ORSINI, T.M.; THOMAZELLI, A.P.; DALEVEDO, G.A.; DE OLIVEIRA, A.G.; PANAGIO, L.A.; COSTA, I.N.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W.R.; ALMEIDA, R.S. *Galleria mellonella* hemocytes: A novel phagocytic assay for *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 3, n. 131, p. 45-50. 2016.

VIEIRA, C.S.; WANIEK, P.J.; CASTRO, D.P.; MATTOS, D.P.; MOREIRA, O.C.; AZAMBUJA, P. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. **Parasites & Vectors**. v.1, n. 9, p.119. 2016.

VILCINSKAS, A.; WEDDE, M. Insect Inhibitors of Metalloproteinases. **IUBMB Life**. v.54, p.339–343, 2002.

VILCINSKAS A. Evolutionary plasticity of insect immunity. **Journal of Insect Physiology**. v. 59, n. 2, p. 123-129. 2013.

VUITIKA, L.; CHAVES-MOREIRA, D.; CARUSO, I.; LIMA, M.A.; MATSUBARA, F.H.; MURAKAMI, M.T.; TAKAHASHI, H.K.; TOLEDO, M.S.; CORONADO, M.A.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; ARNI, R.K.; VEIGA, S.S. Active site mapping of *Loxosceles* phospholipases D: Biochemical and biological features. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1861, n. 9 Pt A, p. 970-9. 2016.

WILLE, A.C.; CHAVES-MOREIRA, D.; TREVISAN-SILVA, D.; MAGNONI, M.G.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; CHAIM, O.M.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-

F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**. v. 1, n. 67, p.17-30. 2013.

WILLE, A.C. Avaliação da atividade de fosfolipase-d recombinante do veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*) sobre a proliferação, influxo de cálcio e metabolismo de fosfolipídios em células tumorais. 217 p. Tese de doutorado (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) pela Universidade Federal do Paraná. 2014.

WISNIEWSKI, J.R.; DUS, K.; MANN, M. Proteomic workflow for analysis of archival formalin-fixed and paraffin-embedded clinical samples to a depth of 10 000 proteins. **PROTEOMICS - Clinical Applications**. v. 7, n.3-4, p.225-233.

WRIGHT, C.S. Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. **Journal of Molecular Biology**. v. 178, n.1, p. 91-104. 1984.

XIE, X.; TAO, T.; LIU, M.; ZHOU, Y.; LIU, Z.; ZHU, D. The potential role of juvenile hormone acid methyltransferase in methyl farnesoate (MF) biosynthesis in the swimming crab, *Portunus trituberculatus*. **Animal Reproduction Science**. v.168, p. 40-49. 2016.

ZACHARIAH, T.T.; MITCHELL, M.A. Vitamin D3 in the hemolymph of goliath birdeater spiders (*Theraphosa blondi*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.40, n.2, p. 344-346, 2009.

## 13- ANEXO 1

Toxicol 98 (2015) 62–74



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicol

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicol](http://www.elsevier.com/locate/toxicol)

## Characterization of Brown spider (*Loxosceles intermedia*) hemolymph: Cellular and biochemical analyses



A.V. Bednaski<sup>a</sup>, D. Trevisan-Silva<sup>a</sup>, F.H. Matsubara<sup>a</sup>, M. Boia-Ferreira<sup>a</sup>, M.M. Olivério<sup>a</sup>, L.H. Gremski<sup>b</sup>, R.P. Cavalheiro<sup>d</sup>, D.M.B. De Paula<sup>c</sup>, E.J. Paredes-Gamero<sup>d</sup>, H.K. Takahashi<sup>c</sup>, M.S. Toledo<sup>c</sup>, H.B. Nader<sup>d</sup>, S.S. Veiga<sup>a</sup>, O.M. Chaim<sup>a</sup>, A. Senff-Ribeiro<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, UFPR, Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Department of Clinical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Brazil

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, Laboratory of Immunochemistry of Glycoconjugates, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>d</sup> Department of Biochemistry, Discipline of Molecular Biology, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 December 2014

Received in revised form

11 February 2015

Accepted 17 February 2015

Available online 24 February 2015

#### Keywords:

Brown spider

*Loxosceles intermedia*

Hemolymph

Hemocytes

### ABSTRACT

This is the first study on the hemolymph from a spider of the *Loxosceles* genus. These animals are responsible for a great number of envenomation cases worldwide. Several studies on *Loxosceles* venoms have been published, and the knowledge about the venom and its toxins is considerable, not only regarding the biological and biochemical characterization, but also regarding structural, genetic and phylogenetic approaches. However, the literature on *Loxosceles* hemolymph is nonexistent. The main goal of the present study was to characterize biochemically the hemolymph content, and especially, to identify its different hemocytes. Moreover, many papers have already shown molecules whose source is the hemolymph and their very interesting activities and biomedical applications, for example, antifungal and antibacterial activities. A 2D-SDS-PAGE of brown spider hemolymph showed approximately 111 spots for pH 3–10 and 150 spots for pH 4–7. A lectin-blotting assay showed that hemolymph carbohydrate residues were similar to those found in venom. Several types of TAG and DAG phospholipids were found in the hemolymph and characterized by HPTLC and mass spectrometry. Four different hemocytes were characterized in *Loxosceles intermedia* hemolymph: prohemocyte, plasmatocyte, granulocyte and adipohemocyte. This paper opens new possibilities on toxinology, studying an unknown biological material, and it characterizes a source of molecules with putative biotechnological applications.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Loxosceles* venoms are well-studied topics in toxinology, with a broad range of studies concerning their composition and toxic effects (Gremski et al., 2014). Spiders from the *Loxosceles* genus, also known as brown spiders, are responsible for a great number of envenomations, which generally trigger cutaneous effects and development of a dermonecrotic lesion. Occasionally, victims can present systemic symptoms (fever, nausea, hemolysis, and kidney

commitment), and in rare cases, the victims can die (Paludo et al., 2006; Chaim et al., 2011). Considering the medical relevance of *Loxosceles* genus, its venom has been well characterized, and several toxins have been identified and studied. Phospholipases-D, metalloproteases, hyaluronidases, and insecticidal peptides, among others, have already been described and characterized as components of *Loxosceles* venoms, whose effects are due to the synergistic effect of the several toxins. Transcriptome analysis has also been performed, showing the percentages of each toxin in the total mRNA of the venom gland (Gremski et al., 2010; Fernandes-Pedrosa et al., 2008). Concerning proteomic approaches, there are 2 studies on the venom of *Loxosceles* spiders (Machado et al., 2005; dos Santos et al., 2009). In contrast, the hemolymph from *Loxosceles* has been neglected by the scientific community. Arachnid hemolymph and immune system are generally not well investigated.

\* Corresponding author. Centro Politécnico, Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, UFPR, Jardim das Américas, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.

E-mail addresses: [senffribeiro@ufpr.br](mailto:senffribeiro@ufpr.br), [senffribeiro@gmail.com](mailto:senffribeiro@gmail.com) (A. Senff-Ribeiro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicol.2015.02.008>

0041-0101/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 14 - ANEXO 2



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 29801-6	Data da Emissão: 22/08/2016 12:14	Data para Revalidação*: 21/09/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Silvio Sanches Velga	CPF: 078.970.128-67
Título do Projeto: Avaliação bioquímica e biológica de toxinas Ixoscoelctas recombinantes	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA	CNPJ: 75.095.679/0001-49

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Análises em Microscopia Confocal, Citometria de Fluxo e Espectroscopia	02/2015	02/2020
2	Análises de atividade biológica das proteínas recombinantes	03/2015	03/2020
3	Realização de Imunoensaios para pesquisa de terapias racionais	04/2015	04/2020
4	Imunização de animais para verificação da imunogenicidade de toxinas recombinantes	04/2015	04/2020
5	Experimentos de Cristalografia das toxinas recombinantes de interesse	05/2015	05/2020
6	Análise dos dados cristalográficos	07/2015	07/2020
7	Coleta dos espécimes de aranha-marrom	08/2015	08/2020
8	Coleta de veneno, hemolinfa e glândulas produtoras de veneno	08/2015	08/2020
9	Processamento das amostras coletadas (extração de RNA total das glândulas, análises qualitativas)	09/2015	09/2020
10	Processamento das amostras coletadas (análises qualitativas e quantitativas do veneno e hemolinfa)	09/2015	09/2020
11	Desenho de oligonucleotídeos específicos para as toxinas de interesse	10/2015	10/2020
12	Obtenção das sequências completas das toxinas de interesse	10/2015	10/2020
13	Clonagem das sequências das proteínas maduras em vetor	11/2015	11/2020
14	Transfecção e Expressão das proteínas Recombinantes	12/2015	12/2020
15	Purificação das Proteínas Recombinantes	12/2015	12/2020
16	Confecção de artigos científicos e apresentação de trabalhos em congressos da área	12/2015	12/2020
17	Transformação e Expressão das proteínas Recombinantes	12/2015	12/2020

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anulações previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para Importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 79451149



Página 1/3

## 15- ANEXO 3



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 547

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

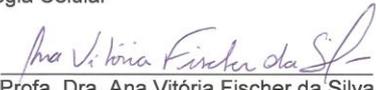
**PROCESSO/PROCESS:** 23075.086737/2011-02

**APROVADO/APPROVAL:** 09/08/2011 – R.O. 07/2011

**TÍTULO/TITLE:** Caracterização bioquímica e biológica da hemolinfa de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)

**AUTORES/AUTHORS:** Andrea Senff Ribeiro, Aline Viana Bednaski, Olga Meire Chaim, Marta de Mauro Oliverio, Silvio Sanches Veiga

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Biologia Celular

  
Prof. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva  
Coordenadora da CEUA

## 16- ANEXO 4 (artigos publicado/ submetido em colaboração)

Toxicon 76 (2013) 11–22



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

## Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches



Dilza Trevisan-Silva <sup>a</sup>, Aline Viana Bednaski <sup>a</sup>, Luiza Helena Gremski <sup>a, b</sup>,  
Olga Meiri Chaim <sup>a</sup>, Silvio Sanches Veiga <sup>a</sup>, Andrea Senff-Ribeiro <sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Department of Clinical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Rua Padre Camargo, 280, 80069-900 Curitiba, Paraná, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 April 2013

Received in revised form 2 August 2013

Accepted 29 August 2013

Available online 7 September 2013

#### Keywords:

Astacin family

*Loxosceles* venom

Proteolytic activity

Two-dimensional electrophoresis

### ABSTRACT

*Loxosceles* bites have been associated with characteristic dermonecrotic lesions with gravitational spreading and systemic manifestations. Venom primarily comprises peptides and protein molecules (5–40 kDa) with multiple biological activities. Although poorly studied, metalloproteases have been identified in venoms of several *Loxosceles* species, presenting proteolytic effects on extracellular matrix components. The characterization of an Astacin-like protease (LALP) in *Loxosceles intermedia* venom was the first report of an Astacin family member as a component of animal venom. Recently, these proteases were described as a gene family in *L. intermedia*, *Loxosceles laeta* and *Loxosceles gaucho*. Herein, the whole venom complexity of these three *Loxosceles* species was analyzed using two-dimensional electrophoresis (2DE). Subproteomes of LALPs were explored through 2DE immunostaining using anti-LALP1 antibodies and 2DE gelatin zymogram. Proteins presented molecular masses ranging from 24 to 29 kDa and the majority of these molecules had basic or neutral isoelectric points (6.89–9.93). Likewise, the measurement of gelatinolytic effects of *Loxosceles* venom using fluorescein-gelatin showed that the three venoms have distinct proteolytic activities. The metalloprotease fibrinolytic activities were also evaluated. All venoms showed fibrinolytic activity with different proteolytic effects on  $\alpha$ 2 and  $\beta$ 2 chains of fibrinogen. The results reported herein suggest that the LALP family is larger than indicated in previously published data and that the complex profile of the gelatinolytic activity reflects their relevance in loxoscelism. Furthermore, our investigation implicates the brown spider venom as a source of Astacin-like proteases for use in loxoscelism studies, cell biology research and biotechnological applications.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Brown spiders are cosmopolitan species identified on almost all continents (Platnick, 2013). *Loxosceles* are venomous arachnids, with toxins produced from a pair of

specialized glands in the cephalothorax (Chaim et al., 2011a; dos Santos et al., 2000). The venom is a complex mixture of bioactive molecules enriched with proteins and peptides ranging between 5 and 40 kDa (Veiga et al., 2000). These molecules induce toxic effects and *Loxosceles* species have been implicated in human envenomation. In Brazil, there are three *Loxosceles* species with medical importance: *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta* (Fischer and Vasconcellos-Neto, 2005; Malaque et al., 2002, 2011). The

\* Corresponding author. Fax: +55 41 3266 2042.  
E-mail address: [senff@beiro@ufpr.br](mailto:senff@beiro@ufpr.br) (A. Senff-Ribeiro).

Artigo submetido Dezembro de 2016 revista :Scientific Data - Nature

**A multi-protease, multi-dissociation, bottom-up-to-top-down proteomic view of the *Loxosceles intermedia* venom**

Dilza Trevisan-Silva<sup>1</sup>; Aline Viana Bednaski<sup>1</sup>; Juliana de Saldanha da Gama Fischer<sup>2</sup>; Silvio Sanches Veiga<sup>1</sup>; Nuno Bandeira<sup>3</sup>; Adrian Guthals<sup>3</sup>; Fabricio K Marchini<sup>4</sup>; Felipe Veiga Leprevost<sup>2</sup>; Valmir C Barbosa<sup>6</sup>; Andrea Senff-Ribeiro, A.<sup>1\*</sup>; Paulo C Carvalho<sup>2\*</sup>

\*Corresponding authors.

1. Department of Cell Biology, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil.
2. Computational Mass Spectrometry Group, Carlos Chagas Institute, Fiocruz – Parana, Brazil
3. Center for Computational Mass Spectrometry, University of San Diego, San Diego, USA
4. Functional Genomics Laboratory, Carlos Chagas Institute, Fiocruz – Parana, Brazil
5. Mass Spectrometry Facility RPT02H, Carlos Chagas Institute, Fiocruz– Parana, Brazil
6. Systems Engineering and Computer Science Program, COPPE, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

**Abstract**

Venoms are a rich source for the discovery of molecules with biotechnological applications, but their analysis is challenging even for state-of-the-art proteomics. Here we report on a large-scale proteomic assessment of the venom of *Loxosceles intermedia*, the so-called brown spider. Venom of 200 spiders was extracted and fractioned into aliquots greater than or less than 10kDa. Then, each aliquot was further aliquoted and digested with trypsin (4h), trypsin (18h), pepsin (18h), chymotrypsin (18h), and analyzed by MudPIT on an LTQ-Orbitrap XL ETD mass spectrometer fragmenting precursors by CID, HCD, and ETD. Aliquots of undigested samples were also analyzed. Our experimental design allowed us to apply spectral networks, thus enabling us to obtain de meta-contig assemblies, and consequently *de novo* sequencing of practically complete proteins, culminating in a deep proteome assessment of this venom. Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD005523.