

Katie Cristina Takeuti Riciluca

**"PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS PRESENTES NA HEMOLINFA DE
Acanthoscurria rondoniae (Mygalomorphae,
Theraphosidae)"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Dr. Pedro Ismael da Silva Jr.

**São Paulo
2011**

Katie Cristina Takeuti Riciluca

**"PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS PRESENTES NA HEMOLINFA DE
Acanthoscurria rondoniae (Mygalomorphae,
Theraphosidae)"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Dr. Pedro Ismael da Silva Jr.

**São Paulo
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Riciluca, Katie Cristina Takeuti

Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acanthoscurria rondoniae* (Mygalomorphae, Theraphosidae) / Katie Cristina Takeuti Riciluca. São Paulo, 2011.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientador: Pedro Ismael da Silva Júnior

1. Aranha/imunologia
2. Hemolinfa
3. Peptídeos/ isolamento & purificação
4. Hemocianina
5. Aracnídeos

SES/CCD/CD-250/11

**Dedico este trabalho aos meus pais
que sempre me apoiaram e me
incentivaram a correr atrás
do meu sonho.**

***Ao meu namorado Danilo
pelo incentivo e força nos
momentos mais difíceis.***

Agradecimentos

Estou cumprindo mais uma etapa em minha vida, com momentos muito difíceis, mas vitórias fáceis são vitórias baratas, portanto os obstáculos foram feitos para serem superados e quando conseguimos superá-los o gostinho da vitória se torna muito melhor.

Durante essa fase muitas pessoas estiveram presentes, me apoiando, ajudando e até criticando e acredito que serviu muito para o aprendizado e no crescimento profissional, intelectual e pessoal.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma direta ou indiretamente, doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível:

A Deus, por acreditar que nossa existência pressupõe uma outra infinitamente superior;

Ao meu orientador, Dr. Pedro Ismael da Silva Júnior, o qual me acolheu sem ao menos me conhecer, por acreditar que sou capaz, pela confiança, pelo auxílio, pelas broncas, pela aprendizagem, paciência, disponibilidade de tempo e material, sempre com uma simpatia contagiante;

Aos meus pais, Riciluca e Suemi, que sempre disseram pra correr atrás e nunca desistir dos meus sonhos, pelo incentivo, principalmente pela ajuda financeira, compreensão, amizade, o carinho e o amor;

As minhas irmãs, Thamie e Silie, que sempre me apoiaram, pelos momentos difíceis, pelo ombro quando precisei chorar, pela paciência, amizade, sinceridade e cumplicidade;

Ao meu namorado, companheiro e confidente, Danilo, que sempre esteve ao meu lado com muita paciência, compreensão, inclusive quando tive

que ficar no laboratório até tarde ou em pleno feriado ou final de semana e que me ajudou a superar as horas mais difíceis;

Aos meus amigos e companheiros de Laboratório, Gabriela, Luana, Elisa, Amanda, Raphael, Roberta, Ivan, George, Carol, Nicole, Leonardo, Rubens, Shayne e Denise pela amizade, compreensão e principalmente na ajuda na obtenção e interpretação dos dados;

Ao pesquisador Dr. Robson Melo pela ajuda na síntese do peptídeo e a ajuda na interpretação de dados;

A Dra Sirlei Dafre, pela disponibilidade do laboratório e Dra Cláudia Blanes Angeli, técnica do laboratório do ICB – USP, que me ajudou na obtenção e análise de alguns resultados;

Ao Dr. Rogério Bertani, Carol e Roberto pela cumplicidade, amizade, disponibilidade, ajuda na identificação e análise sistemática dos animais;

A minhas primas, Mitsue, Renata, Fernanda, Juliana e minha madrinha Kazue e amigas Aline e Patricia Kossugue que mesmo de longe acreditaram na minha capacidade e sempre estiveram do meu lado;

A Dra Solange Serrano e Dr. Hugo Armelin pela permissão de desenvolver meu trabalho no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) Cat-Cepid;

A pesquisadora Dra Júlia Cunha e Ismael, técnico da *facility* Espectrometria de massas do LETA pela ajuda e apoio nas análises;

Aos pesquisadores da *facility* Imunofarmacologia do LETA pela ajuda no protocolo de hemólise;

Aos pesquisadores e alunos da *facility* Proteômica do LETA pela disponibilidade de equipamentos;

Aos pesquisadores e alunos da *facility* Biologia Molecular do LETA e LECC pela disponibilidade de material e equipamentos;

A todos os funcionários da secretária, técnicos e o pessoal da limpeza do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada que sempre estavam dispostos a ajudar;

A Capes, pela concessão de bolsa de mestrado;

Aos membros da secretária da Pós-Graduação em Ciências, Coordenadoria de Controle de Doenças;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, pelo aprendizado adquirido nesse período;

A todos os membros que participaram da minha banca de qualificação e defesa contribuindo com suas críticas e sugestões para a melhoria do trabalho;

Enfim, agradeço a todos que estiveram presentes durante mais essa etapa da vida concluída.

Obrigada por tudo!

***“Nunca deixe que te digam
que não vale a pena acreditar
no sonho que se tem”***

Renato Russo

Resumo

Todos os organismos vivos, abrangendo desde microrganismos até plantas e animais, evoluíram de forma a desenvolver mecanismos para ativamente defender-se contra o ataque de patógenos. Peptídeos antimicrobianos são importantes componentes do sistema imune dos vertebrados e invertebrados podendo ser agrupados de acordo com suas propriedades químicas e estruturais. Podem agir na membrana plasmática de microorganismos formando poros na bicamada de fosfolípidos ou serem internalizados e atuar sobre alvos intracelulares. Estudos sobre a biodiversidade de moléculas antimicrobianas nos vários grupos de artrópodes podem ser importantes para se entender o processo imunológico de uma maneira mais ampla, possibilitando compreender as relações existentes entre os vários sistemas, bem como sua origem, além de poder contribuir para o desenvolvimento e utilização de novas drogas para o uso na medicina e na agricultura. O objetivo deste trabalho foi verificar a produção de substâncias antimicrobianas, como observada em outros artrópodes, utilizando a aranha *Acanthoscurria rondoniae* como exemplo, através da purificação e caracterização de moléculas presentes na hemolinfa e caracterizando-as para um entendimento mais amplo dos processos envolvidos no sistema imune de aracnídeos e dos artrópodes em geral. Neste trabalho foram encontradas três frações com atividade antimicrobiana nos hemócitos que apresentaram massa molecular de 2.270,3 Da, 418,2 Da e 10.111,8 Da, respectivamente. Essas massas quando comparadas as encontradas em *A. gomesiana*, mostram similaridade com a gomesina, mygalina e acanthoscurrina, podendo indicar que as duas espécies apresentam as mesmas moléculas antimicrobianas em seus hemócitos. No plasma, foram encontradas seis frações, mais somente uma foi caracterizada, que apresentou massa molecular de 1.236,776 Da, recebeu o nome de rondonina em homenagem a espécie estudada. Pela primeira vez foi observado em aracnídeos um peptídeo antimicrobiano que provavelmente é processado a partir da hemocianina, um fragmento C-terminal. É um peptídeo de baixa massa molecular e teve sua sequência primária elucidada IIIQYEGHKK, com identidade com um fragmento C-terminal da subunidade "D" da hemocianina da aranha *Eurypelma californicum* e, quando comparada ao

banco de dados dos hemócitos de *Acanthoscurria gomesiana*, esta mostrou identidade com um fragmento da hemocianina da subunidade “D” e 90% de identidade com um fragmento da subunidade “F”. Também foi encontrada no plasma de *Vitalius wacketi*, *Nhandu coloratovillosus*, *A. gomesiana*, *Lasiadora parahybana*. Rondonina foi sintetizada e sua atividade contra bactérias gram-negativas, gram-positivas, fungos e leveduras foi avaliada. Mostrou-se um antifúngico que em 10 minutos não se encontra nenhum conídeo viável, agindo em concentração na faixa de micromolar (μM). Não apresenta atividade hemolítica, o que pode permitir o desenvolvimento de uma nova droga responsável no combate a microorganismos patógenos.

Palavras-chave: Peptídeos Antimicrobianos, fragmento da hemocianina, rondonina, *Acanthoscurria rondoniae*, aranha caranguejeira

Abstract

All living organisms, ranging from microorganisms to plants and animals have developed mechanisms to defend themselves against attack by pathogens. Antimicrobial peptides are important components of the immune system of vertebrates and invertebrates and can be grouped according to their chemical and structural properties. They may act in the plasma membrane of microorganisms forming pores in phospholipid bilayer or be internalized and act on intracellular targets. Studies on the biodiversity of antimicrobial molecules in various groups of arthropods may be important for understanding the immunological process in a more comprehensive, enabling to understand the relationships between the various systems, as well as its source, and can contribute to the production and use of new drugs for use in medicine and agriculture. The objective of this study was to evaluate the production of antimicrobial substances, as observed in other arthropods, the spider *Acanthoscurria rondoniae* using as an example, through purification and characterization of molecules present in the hemolymph and characterized them to a broader understanding of the processes involved in the system immune arachnids and arthropods in general. In this work we found three fractions with antimicrobial activity in haemocytes that had a molecular mass of 2,270.3 Da, 418.2 Da and 10,111.8 Da, respectively. These masses compared to those found in *A. gomesiana* show similarity to gomesiana, and mygalina acanthoscurrina, which may indicate that the two species have the same antimicrobial molecules in their haemocytes. In plasma, six fractions were found, only one more was characterized, which showed a molecular mass of 1,236.776 Da, was named in honor rondonina the species studied. Was first observed in arachnids an antimicrobial peptide is probably processed from the hemocyanin, a C-terminal fragment. It is a low molecular weight peptide and had his primary sequence elucidated IIIQYEGHKH with identity with a C-terminal fragment of the subunit "D" of the spider *Eurypelma californicum* hemocyanin, and when compared to the database of the haemocytes of *Acanthoscurria gomesiana*, this showed identity with a fragment of the hemocyanin subunit "D" and 90% identity with a fragment of the subunit "F". Also found in plasma *Vitalius wacketi*, *Nhandu coloratovillosus*, *A. gomesiana*,

Lasiadora parahybana. Rondonina was synthesized and its activity against gram-negative, gram-positive bacteria, fungi and yeast was evaluated. Rondonina is an antifungal that in 10 minutes is not any viable conidia, acting in concentration in the micromolar range (mM). It has no hemolytic activity, which may allow the development of a new drug responsible for combating pathogenic microorganisms.

Keywords: Antimicrobial Peptides, hemocyanin fragment, rondonin, *Acanthoscurria rondoniae*, tarantula spider

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACN	Acetonitrila
ATCC	“American Type Culture Collection”
AF	Ácido Fórmico
CLAE – FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESI – MS	“Eletrospray Ionization – Mass Spectrometry”
Fmoc	9- fluorenilmetoxicarbonil
LPS	Lipopolissacarídeo
m/z	massa/carga
MALDI/TOF	“Matriz Assisted Laser Desorption Ionization/ Time of flight “
MCI	Menor Concentração Inibitória
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PAMA	Peptídeo antimicrobiano aniônico
PBS	Tampão fosfato salino
RNA	Ácido ribonucléico
TFA	Ácido Trifluoroacético
UFC	Unidade formadora de colônia

Lista de Símbolos
Aminoácidos

Alanina	A
Cisteina	C
Ácido Aspartico	D
Ácido Glutâmico	E
Fenilalanina	F
Glicina	G
Histidina.....	H
Lisina	K
Isoleucina	I
Leucina.....	L
Metionina.....	M
Asparagina	N
Prolina	P
Glutamina	Q
Arginina	R
Serina	S
Treonina	T
Valina	V
Triptofano	W
Tirosina.....	Y

Lista de Quadros

Quadro 1 - Classificação dos Peptídeos Antimicrobianos Catiônicos (AMPs)	30
Quadro 2- Classificação dos Peptídeos Antimicrobianos Aniônicos (PAMAs).....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Atividade Antimicrobiana dos hemócitos	62
Tabela 2 – Atividade Antimicrobiana do Plasma	69
Tabela 3– Espectro de Atividade Antimicrobiana do sintético rondonina comparado a gomesina.....	80

Lista de Figuras

Figura 1 – Cladograma das subfamílias de Theraphosidae.....	23
Figura 2– Estrutura 24-mer da Hemocianina da tarantula <i>E. californicum</i>	29
Figura 3– Mecanismos propostos de peptídeos antimicrobianos mediados pela ruptura da membrana.....	32
Figura 4 - Esquema das possíveis vias de interação de peptídeos antimicrobianos com lipídios. I.....	33
Figura 5 – Esquema simplificado do modo de ação intracelular de peptídeos antimicrobianos	34
Figura 6 – Aranha caranguejeira <i>Acanthoscurria rondoniae</i> (Theraphosidae, Mygalomorphae).	44
Figura 7 – Aranha caranguejeira <i>Vitalius wacketi</i> (Theraphosidae, Mygalomorphae)	45
Figura 8 – Aranha caranguejeira <i>Nhandu coloratovilosus</i> (Theraphosidae, Mygalomorphae)	46
Figura 9 – Aranha caranguejeira <i>Lasiodora parahybana</i> (Theraphosidae, Mygalomorphae)	46
Figura 10 – Aranha caranguejeira <i>Acanthoscurria gomesiana</i> (Theraphosidae, Mygalomorphae)	47
Figura 11 – Aranha caranguejeira <i>Grammostola pulchra</i> (Theraphosidae, Mygalomorphae)	47
Figura 12 – Aranha caranguejeira <i>Avicularia juruensis</i> (Theraphosidae, Mygalomorphae)	48

Figura 13– Detalhes da região dorsal do abdome da aranha <i>Acanthoscurria rondoniae</i> ..	49
Figura 14– Esquema de ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido em microplaca.....	58
Figura 15– Esquema de ensaio hemolítico em microplaca.....	60
Figura 16 – Fracionamento de fatores antimicrobianos dos hemócitos de <i>A. rondoniae</i> .	62
Figura 17 - Purificação da Fração A.....	63
Figura 18 – Espectro de Massas (ESI-MS) da fração A1.....	64
Figura 19 - Espectro de Massas (LC-MS) da fração B.....	65
Figura 20 – Perfil Cromatográfico da Fração C.....	66
Figura 21 – Espectro de Massas (LTQ-MS) da fração C.....	67
Figura 22 – Análise do perfil MS/MS do fator C..	68
Figura 23 - Fracionamento de fatores antimicrobianos do plasma de <i>A. rondoniae</i> ..	69
Figura 24– Espectro de massa (Maldi-TOF) fração P2.....	70
Figura 25 – Espectro de massa (Maldi-TOF) fração P3.....	71
Figura 26 – Espectro de massa (Maldi-TOF) fração P7. 8.....	72
Figura 27 – Espectro de massa (Maldi-TOF) fração P11.....	73
Figura 28 – Sequenciamento “De Novo” da fração P2 do plasma de <i>A. rondoniae</i> no Q-TOF Micro™ (Micromass). ..	75
Figura 29 – Subunidades da hemocianina (a,b,c,d,e,f,g) de <i>Eurypelma californicum</i> (Theraphosidae).....	76
Figura 30 – Alinhamento da seqüência de Rondonina com o banco de dados disponível pelo Blast (http://ca.expasy.org/cgi-bin/blast.pl).....	76

Figura 31 – Alinhamento da seqüência da Rondonina com o banco de dados de hemócitos de <i>A. gomesiana</i>	77
Figura 32 – Estrutura Tridimensional da subunidade II do artrópode <i>Limulus polyphemus</i>	78
Figura 33 – Estrutura Tridimensional do hexâmero do crustáceo <i>Panulirus interruptus</i>	79
Figura 34 – Atividade da Rondonina sobre eritrócitos humanos..	81
Figura 35 – Inibição de crescimento de <i>Candida albicans</i> MDM8 por rondonina..	82
Figura 36 –Fracionamento do plasma de <i>V. wacketi</i>	84
Figura 37 – Sequenciamento “de novo” da fração R do plasma de <i>V. wacketi</i> no Q-TOF Micro TM (Micromass).....	84
Figura 38 – Fracionamento do plasma de <i>N. coloratovillosus</i>	85
Figura 39 – Sequenciamento “de novo” da fração R do plasma de <i>N. coloratovillosus</i> no Q-TOF Micro TM (Micromass)..	86
Figura 40 – Fracionamento do plasma de <i>A. gomesiana</i>	87
Figura 41 – Sequenciamento “de novo” da fração R do plasma de <i>A. gomesiana</i> no Q-TOF Micro TM (Micromass)..	87
Figura 42 – Fracionamento do plasma de <i>L. parahybana</i>	88
Figura 43– Sequenciamento “de novo” da fração R do plasma de <i>L. parahybana</i> no Q-TOF Micro TM (Micromass).....	89
Figura 44 – Fracionamento do plasma de <i>G. pulchra</i>	90
Figura 45 – Fracionamento do plasma de <i>A. juruensis</i>	90
Figura 46 - Árvore simples de Theraphosidae obtida com X-Pee-Wee, “fit 3284.0, 117 passos	91

Figura 47- Árvore filogenética dos gêneros de Theraphosinae	92
Figura 48 – Rondonina como provável carácter em um grupo de aranhas da subfamília Theraphosinae.	93

Índice

I – Introdução	22
II Objetivos	43
2.1 - Objetivo Geral.....	43
2.2 - Objetivos Específicos	43
III - Material e Métodos.....	44
1 – Animais e Coleta de Hemolinfa.....	44
2 – Extração e Purificação de Peptídeos Antimicrobianos.....	49
2.1 – Hemócitos	49
2.2 – Plasma	50
3- Caracterização Estrutural	51
3.1 – Espectrometria de Massas.....	51
3.2 – Sequenciamento “de novo”	53
3.3 – Redução e Alquilação	54
3.4 – Síntese de Peptídeos	55
3.5 – Cálculo da Concentração do Peptídeo Sintético	56
4 – Bioensaios	57
4.1 – Microorganismos.....	57
4.2 – Atividade Antimicrobiana.....	57
4.3 – Atividade Fungicida.....	58
4.4 - Ensaio Hemolítico	59
IV – Resultados e Discussão.....	61
1 - Hemócitos.....	61
2 – Plasma.....	68
V – Conclusão	93
VI – Referências Bibliográficas.....	96
VII – ANEXOS	112
Anexo 1 - Comissão de Ética.....	112
Anexo 2 - Manuscrito aceito na revista Results in Immunology.....	113
Anexo 3 - Manuscrito em fase de elaboração para submissão a revista Journal of Life Science.....	136

I – Introdução

As aranhas estão distribuídas por todo o planeta e conquistaram praticamente todos os ecossistemas, exceto o ar e o oceano. Todos os indivíduos são carnívoros, sendo o grupo dos insetos a maior fonte de presas, embora outros artrópodes também possam ser consumidos. A maioria das aranhas mede de 0,2 a 1 cm de comprimento, mas os espécimes pertencentes ao grupo das caranguejeiras podem medir até 9 cm. Em geral os machos são menores que as fêmeas (Foelix, 1996). As evidências mostram que sua origem foi no Siluriano ou início do Devoniano, com a maior irradiação de Araneomorphae no fim do Paleozóico e começo do Mesozóico (Coddington & Levi, 1991). São conhecidas atualmente 109 famílias, com 3802 gêneros e mais de 41 mil espécies (Platnick, 2011).

A ordem Araneae, a qual pertencem esses animais, é composta por duas subordens: Mesothele e Opisthothele. A primeira abriga a infraordem Liphistiomorphae, contendo as aranhas que retêm caracteres mais primitivos, como segmentação externa no abdômen. A segunda se divide em duas infraordens: Mygalomorphae, que abrange todo o grupo das caranguejeiras, e Araneomorphae, que inclui cerca de 90% das espécies, nas quais as fiandeiras médias anteriores estão ausentes e as demais se localizam mais posteriormente no abdômen do que em Mesosthele (Platnick & Gertsch, 1976; Foelix, 1996).

As migalomorfos ou aranhas caranguejeiras ocorrem em todos os continentes com exceção da Antártida. Elas retêm algumas características plesiomórficas como a presença de quatro pulmões foliáceos e ferrões das quelíceras em posição paraxial. Apresentam como sinapomorfia a perda das fiandeiras medianas anteriores e a redução das fiandeiras laterais anteriores. Além disso, exibem uma combinação única de caracteres: presença de cúspides nas maxilas, número reduzido de escleritos nos bulbos copuladores dos machos, segmento basal das fiandeiras posteriores subsegmentado e sigilas no esterno (Raven, 1985).

A família Theraphosidae é a maior da infraordem, possuindo 933 espécies distribuídas em 118 gêneros, sendo responsável por 35% de toda a

receptáculo semínífero da espermateca de muitas espécies em combinação com os padrões a seguir: 1) Presença de muitos grupos de cerdas estridulatórias na face retrolateral do trocanter do palpo; 2) macho com uma apófise tibial com um único ramo; 3) macho também apresenta na tíbia do palpo outra apófise prolateral; 4) presença de pelos urticantes do tipo I.

O gênero atualmente está representado principalmente por 38 grandes espécies terrestres de tarântula, habitando florestas tropicais e pampas da América do Sul. Vivem em buracos suficientemente profundos, os quais, em regra, cavadas por elas mesmas. A média do tamanho do corpo é cerca de 6-8 cm, e pode alcançar 23 cm com as patas.

Não são aranhas muito agressivas, mas em geral são aranhas nervosas. Frequentemente quando ameaçadas esfregam as patas traseiras sobre o abdômen liberando pelos urticantes utilizados em sua defesa. Uma informação disponível de picadas de espécies do gênero *Acanthoscurria* é que estas não causam nenhum dano para os humanos. Todos os representantes deste gênero habitam áreas continentais da América do Sul (Brasil), apenas uma única espécie é encontrada nas Antilhas (Thorell, T., 1870).

Existem ainda poucos trabalhos em relação à imunidade das aranhas. O estudo do grupo das migalomorfas é bastante interessante do ponto de vista evolutivo da imunidade inata, uma vez que este representa um dos grupos mais antigos da ordem Araneae. Outra característica interessante é a longevidade destes animais. Em determinadas condições, algumas fêmeas das grandes caranguejeiras chegam a viver por mais de vinte anos (Livros de registros do Instituto Butantan; Foelix, 1996; Silva Jr, 2000).

Theraphosidae é um grupo de aranhas migalomorfas com aproximadamente 800 espécies descritas (Coddington & Levi, 1991). Este grupo apresenta uma homogeneidade morfológica enorme e muitos problemas taxonômicos (Raven, 1990).

Enfim, todos os organismos vivos, abrangendo desde microorganismos até plantas e animais, evoluíram de forma a desenvolver mecanismos para ativamente defender-se contra o ataque de patógenos. O mais sofisticado desses mecanismos desenvolve anticorpos, após um primeiro reconhecimento, os quais permitem eliminar invasores específicos (Bulet *et al.*, 2004; Pelegrini &

Franco, 2005; Franco *et al.*, 2006). Porém, essa ação de resposta imune adquirida no reconhecimento de organismos estranhos, é apenas elaborada por um pequeno subtipo de organismos, denominados vertebrados superiores. Entretanto, a imunidade inata é muito mais comum, e entre suas respostas, incluem-se componentes cruciais como fenóis, substâncias secundárias e peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Thomma *et al.*, 2001; Freceer *et al.*, 2004).

Os artrópodes são animais com ampla distribuição e adaptados a sobreviver em quase todos os ambientes. Sua sobrevivência e a enorme diversidade devem-se à adaptação a diferentes ambientes, às vantagens na competição com outras espécies, à excepcional capacidade reprodutora, à eficiência na execução de suas funções e à resistência a substâncias tóxicas. A conquista de diferentes hábitat provavelmente esta relacionada também à capacidade de se defenderem contra diversos tipos de microorganismos e parasitas, pois muitos artrópodes vivem em ambientes onde esses microorganismos são abundantes. É, portanto, evidente que esses invertebrados devam possuir um sistema imunológico eficiente para combater esses microorganismos perigosamente potentes (Barraviera, 1994).

Nos invertebrados, a defesa é muito semelhante à imunidade inata dos vertebrados, sendo os insetos, o grupo mais bem estudado. Após o rompimento da barreira físico-química constituída pela cutícula e invasão dos microorganismos, o sistema é ativado. A ativação desse sistema é mediada por fatores presentes na hemolinfa, que é composta por células (os hemócitos) e pelo plasma (fluido rico em proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, hormônios e íons). Desta forma, a resposta imune dos invertebrados consiste em reações celulares como a fagocitose, encapsulação e/ou formação de nódulos, e de reações humorais incluindo as cascatas de serino proteinases que participam da coagulação e da melanização, além da produção de intermediários reativos de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Ratcliffe e Whitten, 2004). Em algumas reações de defesa, uma série de substâncias que estão presentes em pequenas quantidades na hemolinfa ou que aparecem somente no curso de uma infecção, tem sua síntese estimulada. Essas substâncias estão envolvidas no reconhecimento, na mediação da resposta imune-celular ou na ação direta

antimicrobiana. Entre estas substâncias, as mais estudadas são as lectinas, hemolina e os peptídeos e as proteínas antimicrobianas (Sun et al, 1990; Daffre & Faye, 1997; André & Ricas, 1998; Mendonza & Faye, 1999; Kawabata & Imanaga, 1990; Wilson et al, 1999).

As Lectinas e/ou aglutininas são proteínas ou glicoproteínas, de origem não-imune, com capacidade de se ligar especificamente a açúcares da superfície de diferentes células, causando sua aglutinação. Esta propriedade deriva do fato de estas moléculas, assim como os anticorpos dos vertebrados, possuírem pelo menos dois sítios de ligação (moléculas bivalentes), sendo assim capazes de aglutinar células que expressem determinados açúcares na sua superfície, através de pontes de hidrogênio e interações de Van Der Waals. As lectinas foram inicialmente identificadas em plantas, mas se sabe que são de ocorrência ubíqua, sendo encontradas em todos os seres vivos, desde vírus até mamíferos (Sharon & Lis, 1989).

Devido a propriedade de aglutinar células e de estar envolvidas no reconhecimento do não-próprio, as lectinas dos invertebrados foram inicialmente consideradas análogas funcionais dos anticorpos dos vertebrados. No entanto, é sabido que as lectinas dos invertebrados são estrutural e funcionalmente distintas das imunoglobulinas (Marques & Barraco, 2000). Nos invertebrados, o mais antigo exemplo nessa categoria, provavelmente, é a lectina da hemolinfa do artrópode *Limulus*, também conhecido como caranguejo-ferradura. Apesar do nome, esta espécie está mais próxima das aranhas e escorpiões que dos carangueijos propriamente ditos. O lisado dos amebócitos deste animal, após preparação por fracionamento e coagulação de enzimas, tem sido utilizado em ensaios cromogênicos no desenvolvimento de testes específicos para endotoxinas (Obayashi et al, 1985).

A hemolina está presente na hemolinfa de *Hyalophora cecropia* e *Manduca sexta* e também está relacionada com o reconhecimento do LPS pelo lipídio A (Daffre e Faye, 1997), ligando-se à superfície das bactérias e, também, dos hemócitos, constituindo um fator de opsonização que participa na formação de um complexo protéico que, ao tudo indica, iniciador da fagocitose. (Andersson e Steiner, 1987; Sun et al, 1990; Su et al, 1998; Wang et al., 1995; Zao e Kanost, 1996). Esta proteína não apresenta atividade antimicrobiana e

foi verificada que pertence a superfamília das imunoglobulinas. A esta família também pertencem as moléculas que funcionam como anticorpos em vertebrados e várias proteínas envolvidas em adesão celular (Faye & Hultmark, 1993).

Diferentemente dos anticorpos, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) por serem simples produtos da transcrição e tradução gênica podem ser rapidamente sintetizados após a infecção, com um gasto limitado de energia e biomassa (Thomma *et al.*, 2002; Boman *et al.*, 2003; Bulet *et al.*, 2004; Pelegrini & Franco, 2005).

Os PAMs são convencionalmente descritos como moléculas anfipáticas e catiônicas, compostas de 12 a 45 resíduos de aminoácidos e codificadas por genes, mais já há evidências de que outros PAMs ou polipeptídios possam se originar de várias outras fontes, tais como de hidrólises de proteínas inativas (Bachère *et al.*, 2004).

A geração de peptídeos biologicamente ativos e polipeptídeos (criptídeos) ou proteínas (cripteínas) pela clivagem de uma proteína precursora é um fenômeno comum que ocorre em toda a natureza, de vírus até humanos (Ng & Ilag, 2006). Há muitos exemplos ilustrando que um ou mais fragmento(s) peptídico(s) clivado(s) proteoliticamente pode ser derivado de uma única proteína precursora, e esses peptídeos geralmente mostram atividades que são diferentes da molécula precursora. Em muitos casos, essa atividade biológica divergente são crípticas e não podem ser previstas a partir de qualquer sequência de amino ácidos ou a atividade da proteína precursora. Esses peptídeos e/ou polipeptídeos são classificados como cripteínas e a proposta que muitas classes de cripteínas existem, tanto como fragmentos processados naturalmente ou, alternadamente, como o resultado de uma clivagem proteolítica artificial. Eles são divididos em três classes:

Tipo 1: são produzidos quando uma proteína precursora é naturalmente clivada por uma ou mais proteases para gerar um peptídeo ou um grupo de peptídeos com novas bioatividades que são distintas da proteína precursora;

Tipo 2: são fragmentos naturalmente liberados da proteína precursora que ou mantém a original ou a bioatividade relacionada com a molécula precursora;

Tipo 3: fragmentos de proteínas-peptídeos gerados *in vitro* com novas bioatividades. Fragmentos idênticos ou similares podem não ser necessariamente gerados naturalmente (Autelitano *et al*, 2006).

Na hemolinfa dos artrópodes também encontramos livremente dissolvidas as hemocianinas que são grandes proteínas respiratória alostéricas que são constituídas de múltiplos hexâmeros onde cada hexâmero é feito por monômeros de aproximadamente 75 kDa (van Holde *et al*, 2001). O sítio de transporte de oxigênio envolve um par de átomos de cobre, no qual o estado Cu (I) está na forma desoxigenada, mas torna-se Cu (II) após oxigenação. Isso explica a mudança para a cor azul após a oxigenação (Magnus *et al*, 1994, Cuff *et al*, 1998). Essas ligações com oxigênio são coordenadas pelo cobre através de seis resíduos de histidina (van Holde, *et al* 1995, Cuff *et al*, 1998).

A hemocianina da tarântula norte americana *Eurypelma californicum* (Fig 2) é um complexo de proteínas nativas de 24-mer constituindo de dois dodecameros idênticos com uma massa molecular total estimada em cerca de 1.800 kDa (Shneider *et al*, 1977; Markl *et al*, 1979; Markl *et al*, 1980; Markl *et al*, 1986). A formação do complexo 24 mer exige a agregação de sete tipos diferentes de subunidades na mesma quantidade com quatro cópias de cada uma das subunidades a, d, e, f e g, e duas cópias da subunidade b e c (Markl, 1981; Markl, 1986)

Além do seu papel como carregadora de oxigênio, a hemocianina aparece como uma proteína multifuncional, pois também está envolvida na osmorregulação, estoque de proteínas e algumas reações imunes (Decker and Jeanicke, 2004). Em chelicerados, a região N-terminal da hemocianina foi sugerida por ter atividade de fenoloxidase após clivagem proteolítica (Decker & Rimke, 1998; Nagai & Kawabata, 2000). O sistema profenoloxidase (ou sistema proPO) envolve uma cascata complexa na qual compostos fenólicos são oxidados e muitas moléculas tóxicas (quinonas e espécies reativas de oxigênio) são geradas em resposta a infecção microbiana (Cerenius & Soderhall, 2004; Cerenius *et al*, 2008).

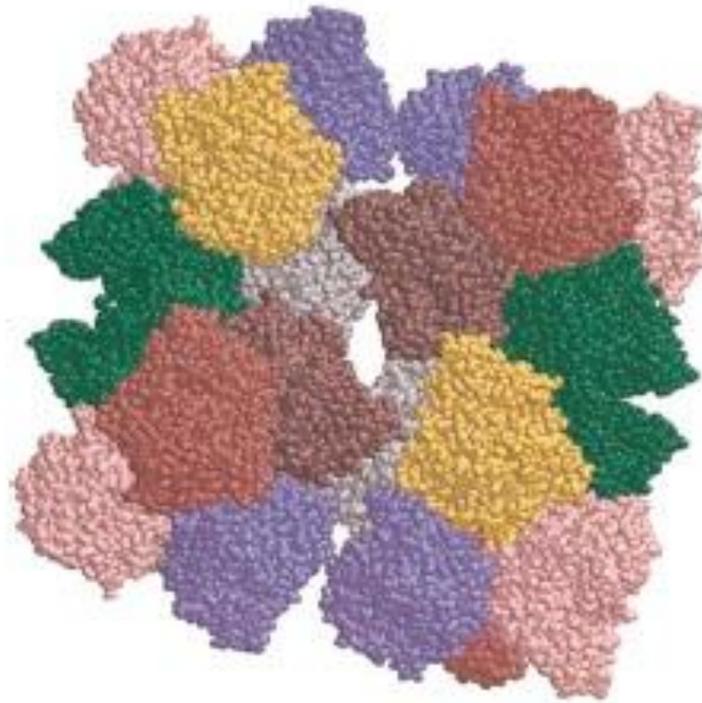


Figura 2– Estrutura 24-mer da Hemocianina da tarantula *E. californicum*. As diferentes cores se referem as diferentes subunidades: a -verde; b - cinza; c - marron; d - amarelo; e - rosa; f - azul; g – vermelho (Voit et al, 2000).

Os peptídeos catiônicos representam o maior grupo e o primeiro a ser relatado, sendo amplamente distribuídos entre os animais e as plantas. Deste modo, milhares destes têm sido caracterizados (Andreu e Rivas, 1998; Bullet *et al*, 1999, <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/antimic.html>). Estes apresentam grande diversidade em termos de características estruturais, propriedades e funções biológicas, e também em sua distribuição no tecido e nível de expressão (Quadro 1) (Bachère, 2000) por isso, baseados em suas características estruturais, podem ser divididos em três diferentes classes:

- 1- Peptídeos lineares formando estruturas de hélice

- 2- Peptídeos ricos em cisteínas apresentando uma única ou várias pontes de dissulfeto

- 3- Moléculas ricas em aminoácidos específicos como prolina, histidina e triptofano.

Quadro 1 - Classificação dos Peptídeos Antimicrobianos Catiônicos (AMPs) (Bachère, 2000)

Famílias	Características	Exemplos	Grupos de Invertebrados
Peptídeos Lineares	Formam estruturas anfipáticas em α -hélice	Cecropinas, Moricina	Díptera, lepidópteras
Peptídeos ricos em cisteína	Apresentam pontes dissulfeto intramoleculares	Defensinas, Drosomicinas, Taquipesinas	Insetos, aracnídeos, quelicerados, moluscos
Peptídeos ricos em prolina	Aminoácidos compostos por resíduos de prolina	Apidaecinas, Abaecinas, Drosocinas	Díptera, himenóptera, hemíptera
Peptídeos ricos em glicina	Aminoácidos compostos por resíduos de glicina	Atacinas, Dipterocinas, Sarcotoxinas	Coleóptera, lepidóptera

O principal modo de ação dessas moléculas é por meio do aumento da permeabilidade da membrana plasmática. Inicialmente há uma interação eletrostática entre o PAM positivamente carregado e os componentes da membrana dos microorganismos, carregados negativamente. Posteriormente, a interação entre a porção apolar da membrana das células e os resíduos hidrofóbicos dos PAMs culmina na permeabilização das membranas (Silva Jr, 2000).

Com relação à ruptura da membrana plasmática foram propostos quatro modos de ação (Fig 03):

- Modelo “barrel-stave” – Neste, os PAMs anfipáticos, α -hélice, após interação eletrostática com a face externa da membrana bacteriana, formam poros do tipo barril, aonde a porção apolar do peptídeo interage com a porção hidrofóbica dos fosfolipídios da membrana e a região hidrofílica do peptídeo fica voltada para dentro do poro. O vazamento do conteúdo intracelular através destes poros pode levar a morte celular. A alameticina é um exemplo de PAM que induz este tipo de poro (Brogden, 2005).

- Modelo “carpet” – a membrana da bactéria é totalmente coberta pelo peptídeo. Quando uma concentração crítica é atingida, os peptídeos danificam a membrana de modo semelhante ao dos detergentes, com a desintegração e formação de micelas, o que leva a morte da bactéria. A ovispirina é um exemplo de PAM com este tipo de ação (Brogden, 2005).

- Formação de poro toroidal – Após a interação com fosfolipídios da membrana, várias moléculas de peptídeo se agregam e formam um complexo com moléculas de água associadas. Este complexo induz a formação de canais transmembrânicos temporários que podem permitir a passagem de íons, moléculas de grande massa molecular e inclusive, do próprio peptídeo, sem que haja grandes alterações na estrutura da membrana. A diferença entre este modelo e o modelo barril é que os peptídeos estão sempre associados com as cabeças polares dos fosfolipídeos, mesmo quando inseridos perpendicularmente a bicamada lipídica. Este tipo de poro transmembrânico é induzido pelas magaininas, protegrinas e melitinas (Brogden, 2005).

- Formação de poro toroidal desordenado – uma modificação recente do poro toroidal propõe que são formadas conformações menos rígidas da orientação do peptídeo (Melo et al, 2009); na simulação por dinâmica molecular realizada com o peptídeo Melitina em presença da bicamada lipídica de dipalmitoilfosfatidilcolina, mostrou a formação espontânea de poros transmembrânicos acima da concentração crítica de peptídeo/lipídio (P/L). Porém, diferente do modelo tradicional, eles mostraram que um ou dois peptídeos era suficientes para formar o poro toroidal (Fig 04) (Sengupta, 2008).

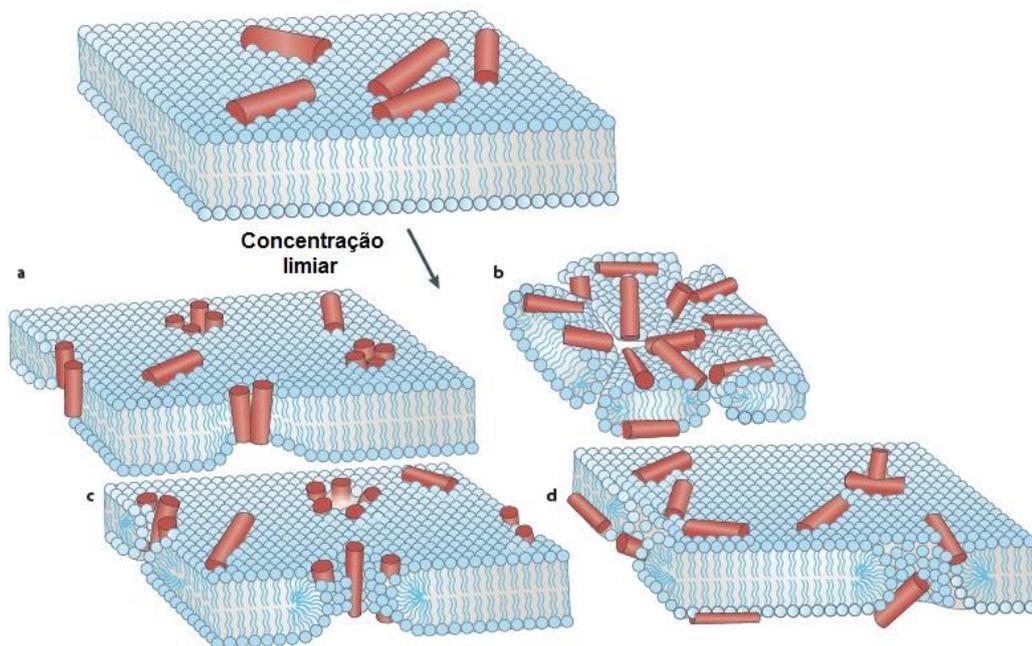


Figura 3– Mecanismos propostos de peptídeos antimicrobianos mediados pela ruptura da membrana. a) Modelo “Barrel-stave”, b) Modelo “Carpet”, c) Formação Poro Toroidal, d) Formação Poro Toroidal desordenado (Melo *et al*, 2009).

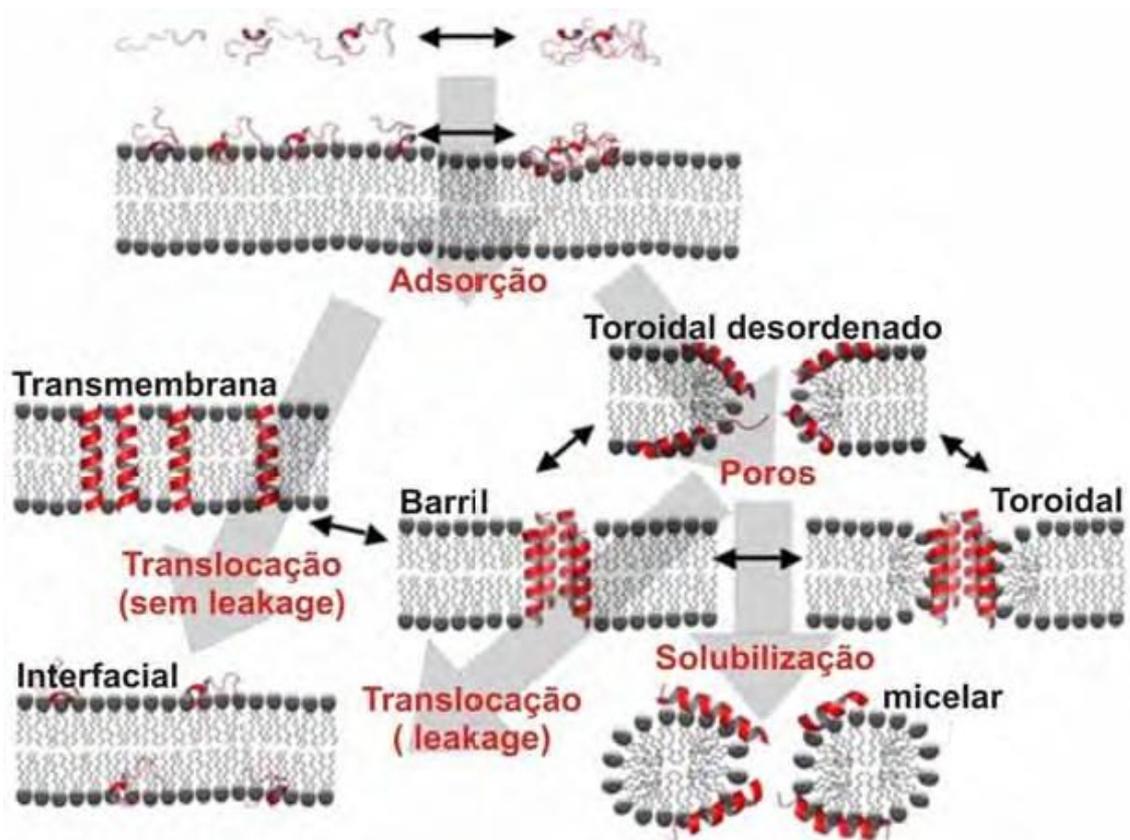


Figura 4 - Esquema das possíveis vias de interação de peptídeos antimicrobianos com lipídios. Monômeros e pequenas agregações de peptídeos, em contato com a membrana, que acabam se ligando na interface (adsorção). Eventualmente os peptídeos distribuem-se equitativamente entre as duas camadas lipídicas. Isto pode ocorrer por duas vias de translocação diferentes. Na translocação sem “leakage”(vazamento), os peptídeos são capazes de cruzar a membrana sem a formação de poros. Em alguns casos, o estado intermediário transmembranar é termodinamicamente estável (por exemplo, peptídeos hidrofóbicos que adotam uma orientação transmembranar). A principal característica dos peptídeos antimicrobianos é a permeabilização da membrana seguindo a via translocação com “leakage”. Acima de certa razão peptídeo/lipídio, os peptídeos inserem na membrana formando poros. Uma variedade de estrutura de poros diferentes pode ser formada, incluindo os estados: “barril”; toroidal e toroidal desordenado. Estes estados separados devem ser interpretados em casos extremos, podendo ocorrer uma mistura de variedades desses modelos. O poro pode ser uma estrutura estável, mas também pode ser uma estrutura transiente. Neste caso, uma vez que os peptídeos distribuídos nas monocamadas opostas, a formação do poro é reduzida, desativando o processo. Por outro lado, o acúmulo de certos peptídeos podem levar a desintegração da membrana como um detergente, resultando na formação de micelas (via solubilização). Observa-se que a estrutura secundária do peptídeo pode variar ao longo das várias vias. A configuração em random ou em hélice são meramente ilustrativas desses processos e não devem ser interpretadas literalmente (esquema adaptado de Sengupta et al, 2008).

Alguns peptídeos catiônicos têm como alvo constituinte interno celular como DNA, RNA, ou paredes celulares enquanto outros parecem indiretamente modular a atividade antimicrobiana por interação com outros componentes do sistema imune inato (Fig 05) (Finlay & Hancock, 2004, Zaio, 2007; Hammil *et al*, 2008).

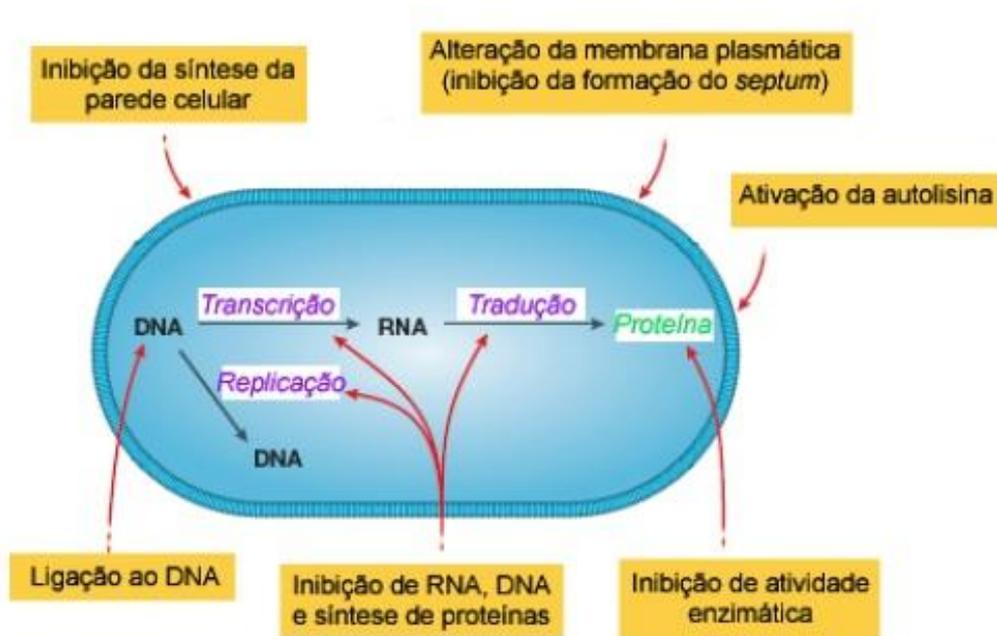


Figura 5 – Esquema simplificado do modo de ação intracelular de peptídeos antimicrobianos (modificado de Brogden, 2005)

Os peptídeos antimicrobianos também podem ser aniônicos (PAMAs) e correspondem a um pequeno grupo de moléculas apresentando atividade antimicrobiana que foram isoladas principalmente de mamíferos. Podem ser divididos em quatro classes (Quadro 2) (Marshall e Arenas, 2003):

- 1- Moléculas derivadas dos neuropeptídeos;
- 2 - Moléculas ricas em ácido aspártico;

3 - Dipeptídeos aromáticos;

4 – Proteínas que ligam oxigênio.

Quadro 2– Classificação dos Peptídeos Antimicrobianos Aniônicos (PAMAs)
(Marshal e Arenas, 2003)

Famílias	Características	Exemplos	Grupos encontrados
Derivados dos neuropeptídeos	Processamento de neuropeptídeos precursores	Pro-enkephalin-A, peptídeo B, enkelytin	Bovinos, humanos e invertebrados
Moléculas ricas em ácido aspártico	Peptídeos compostos por resíduos de ácido aspártico	Dermicidina	Humanos
Dipeptídeos aromáticos	Apresentam baixa massa molecular	N-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxy-phenilalanine, <i>p</i> -hydroxycinnamaldehy	Larvas de dípteros
Proteínas que ligam Oxigênio	Derivados de proteínas que ligam oxigênio	PvHCt , PsHCt1, PsHC2,	Camarões

Os PAMAs, cujo modo de ação pode se diferenciar daqueles dos peptídeos catiônicos e, de outros antibióticos convencionais, pode complementar a atividade de outros compostos e constituir uma base que sirva para desenvolver novos derivados sintéticos (Marshal e Arenas, 2003).

Sendo assim, são necessárias quatro características para os peptídeos antimicrobianos serem eficazes contra os patógenos. A primeira é a

seletividade da toxicidade, com os peptídeos sendo capaz de discriminar entre células hospedeiras e microbianas, a segunda, matar rapidamente, pois o ciclo de vida de bactérias é curto, sendo de 20 minutos no caso da *Escherichia coli*. A terceira é amplo espectro de atividade antimicrobiana, com um peptídeo sendo eficiente contra muitas espécies de microorganismos. E por ultimo, deve apresentar um mecanismo de ação que a bactéria não possa facilmente desenvolver resistência (Matsuzaki, 1999).

Em *Drosophila*, um díptero bem estudado entre os insetos, sete distintos AMPs foram descritos. Eles são produzidos primariamente no corpo gorduroso (função semelhante ao fígado dos mamíferos) (Tzou, 2000), células da hemolinfa (sangue de invertebrados) e epitélios do tubo digestório, sistema traqueal entre outros (Bulet e Stocklin, 2005) e secretado no sangue em resposta a desafios microbianos, os quais caracterizam uma resposta humoral sistêmica nos insetos. A expressão desses peptídeos está também na superfície epitelial de muitos tecidos de *Drosophila* (Tzou, 2000), como também observado nos epitélios dos mamíferos. Além disso, em mamíferos, PAMs, são produzidos constitutivamente por células sanguíneas (Lehrer *et al.*, 1999). Além de dípteras e lepidópteras, a maioria dos PAMs relatados em diferentes grupos dos invertebrados foram isolados dos hemócitos. No inseto *Pseudocanthotermes spiniger* (isóptero - cupim), os peptídeos “termicin” e “spinigerin” são constitutivamente produzidos nos hemócitos e nas glândulas salivares, mas não são liberados na hemolinfa como resultado de desafio microbiano (Lamberty *et al.*, 2001).

Nos quelicerados, muitos PAMs têm sido caracterizados dos hemócitos dos limulídeos (“horseshoecrabs”) (Iwanaga *et al.*, 1998). Nos crustáceos, moléculas antimicrobianas foram encontradas nos hemócitos de caranguejos. Um peptídeo de 6,5 kDa (Schnapp *et al.*, 1996) e “callinectin” de 3,7 kDa (Khoo *et al.*, 1999) foram parcialmente caracterizados de *Carcinus maenas* e *Callinectes sapidus*, respectivamente. Além disso, em camarões, dois tipos de AMPs tem sido inteiramente caracterizados, nomeados “penaeidins” dos hemócitos (Destoumieux *et al.*, 1997) e três tipos de PAMs derivados da hemocianina presente no plasma (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001). Peptídeos

semelhantes derivados da hemocianina foram recentemente purificados da hemolinfa de lagostins (Lee *et al.*, 2003).

Estudos com crustáceos, como nos camarões *Penaeus stylirostris* e o *Penaeus vannamei*, mostrou a presença de PAMAs (peptídeos antimicrobianos aniônicos) no plasma desses organismos (Destoumieux *et al.*, 2001). Também foi identificado em um caranguejo na Índia, *Scylla serrata*, um peptídeo aniônico (scygonadin-2) encontrado no plasma seminal dos machos, que apresenta atividade contra a bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus*. Este peptídeo isolado do plasma seminal apresenta 24 resíduos e 102 resíduos na proteína madura (Huang *et al.*, 2006).

Em aracnídeos, diversos PAMs foram caracterizados em venenos de escorpiões e aranhas. No veneno de escorpiões foram isolados peptídeos com propriedades antimicrobianas como “scorpine” de *Pandinus imperator* (Conde *et al.*, 2000) e “hadrurin” de *Hadrurus aztecus* (Torres-Larios *et al.*, 2000). “Scorpine” é um polipeptídeo com 75 resíduos de aminoácidos, com três pontes de dissulfeto e com atividade antibacteriana e antimalárica. “Hadrurin” é um polipeptídeo com 41 resíduos de aminoácidos, sem ponte de dissulfeto e com atividade antimicrobiana e alguma atividade hemolítica. Também foram identificados vários peptídeos lineares com atividade antimicrobiana no veneno de aranhas: “lycotoxins I e II” isolados do veneno da aranha *Lycosa carolinensis* (Yan & Adams, 1998). No veneno da aranha *Cupiennius salei* uma família de peptídeos, as cupieninas, mostraram atividade antimicrobiana e inseticida (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2002). As oxioquinas, isoladas do veneno da aranha *Oxyopes kitabensis*, apresentam atividade hemolítica e inseticida (Corzo *et al.*, 2002) e a “Oxyopinina 1” apresenta grande similaridade com o peptídeo ponerico L2 de formigas (Orivel *et al.*, 2001).

Em contraste os PAMs oriundos da hemolinfa de aracnídeos são pouco estudados. Moléculas semelhantes às defensinas de insetos foram identificadas na hemolinfa de escorpiões não desafiados, da espécie *Leiurus quinquestriatus* e *Androctonus australis* (Cociancich *et al.*, 1993; Ehret-Sabatier *et al.*, 1996). Em *A. australis* foram encontrados também os seguintes peptídeos antimicrobianos: “buthinin” e “androctonin” (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996). “Butinin” é um peptídeo com 34 resíduos de aminoácidos, três pontes

dissulfeto e com atividade contra bactérias Gram positiva e negativa. “Androctonin” apresenta 25 resíduos de aminoácidos, duas pontes dissulfeto, atividade contra fungos e bactérias e alta similaridade com as tachiplesinas e polifemusinas encontradas nos limúlideos (Nakamura *et al*, 1988; Miyata *et al*, 1989).

Na hemolinfa da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, uma aranha pertencente à família Theraphosidae, foram identificados três peptídeos com atividade antimicrobiana: a “theraphosinina” (4.052Da) que foi purificada a partir do plasma (Silva Jr., 2000) e, a “gomesina” (2270Da) e as “acanthoscurrinas” (10.111 Da e 10.225 Da), purificadas a partir dos hemócitos (Silva Jr *et al.*, 2000; Lorenzini *et al.*, 2003). Theraphosinina é um peptídeo com atividade contra a bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus* e que ainda não teve sua sequência de amino ácidos completamente elucidada (Silva Jr *et al.*, 2000). Gomesina, um peptídeos com 18 resíduos de amino ácidos, duas pontes dissulfeto, com amplo espectro de atividade antimicrobiana e antiparásita e grande similaridade em sequência primária e estrutura 3D com taquiplesina e polifemusina dos limúlideos (Silva Jr *et al.*, 2000.). Acanthoscurrina é um peptídeo antimicrobiano constitutivo, rico em glicina, com atividade contra bactéria Gram negativa e contra levedura *Candida albicans* (Silva Jr *et al.*, 2000; Lorenzini *et al.*, 2003). Recentemente, nos hemócitos da aranha *Cupienius salei* foi encontrado um peptídeo antimicrobiano rico em glicina, “Ctenidin” muito semelhante à Acanthoscurrina (Baumann *et al*, 2010). Também foi encontrado nos hemócitos da aranha caranguejeira *A. gomesiana* uma molécula de baixa massa (417 Da), a mygalina, uma acil poliamina com atividade contra bactérias Gram negativas e cuja atividade é inibida em presença de catalase, indicando um possível modo de ação através da produção de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) (Silva Jr. *et al*, 2000; Pereira *et al*, 2007).

Nos últimos anos foram encontrados em carrapatos vários peptídeos antimicrobianos tanto na hemolinfa como no trato digestivo. Na hemolinfa do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram purificados três peptídeos com atividade antimicrobiana. O primeiro peptídeo foi isolado do plasma enquanto o segundo e o terceiro foram isolados dos hemócitos. O

peptídeo isolado do plasma, chamado microplusina, tem massa molecular de 10.204 Da, contêm seis resíduos de cisteína e possui alta identidade (62%) com a hebraína, um PAM isolado dos glânglios nervososs do carrapato *Amblyomma hebraeum*, com perfeita correspondência entre suas seis cisteínas (Lai et al, 2004). Em adição as cisteína, parte das histidinas também possuem correspondência entre estes dois peptídeos (Fogaça et al, 2004; Lai et al, 2004). Além da hebraína, a microplusina também possui identidade (cerca de 40%) com PAMs isolados da glândula salivar de outras espécies de carrapatos tais como *Ornithodoros coriaceus*, *O. parkeri* e *Argas monolakensis* (Mans et al, 2008). Um PAM similar a microplusina também foi encontrado nas glândulas salivares do carrapado *A. americanum* (Mulenga et al, 2007). Estes dados indicam a existência de uma nova família de PAMs (Silva, 2008). O segundo peptídeo, obtido dos hemócitos, é uma defesina com similaridade com as da família das defensinas de insetos (Fogaça et al., 2004). O terceiro, ixodidina, é um peptídeo rico em resíduos de cisteína, apresenta atividade contra a bactéria Gram negativa *E. coli* e contra a Gram positiva *M. luteus* além de apresentar atividade inibidora de protease (Fogaça et al., 2006). Em carrapatos também foram observados fragmentos de hemoglobina com atividade antimicrobiana no tubo digestivo. Em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, um fragmento da hemoglobina bovina (segmento do amino acido 33 ao 61) com atividade antimicrobiana foi isolado do conteúdo do tubo digestivo (Fogaça et al, 1999). Esse fragmento de hemoglobina apresentou atividade contra bactéria Gram positiva e fungo. Dois outros fragmentos de hemoglobina, correspondentes aos segmentos de amino ácidos 1 a 32 and 3 a 32 de hemoglobina de coelho, foram recentemente isolados do conteúdo do tubo digestivo de *Ornithodoros moubata* (Nakajima et al, 2003). Também foi purificada uma lisozima do tubo digestivo de *O. moubata*, sendo mostrado que sua atividade aumentava fortemente após o repasto sanguíneo (Kopáček 1999). Recentemente, quatro defensinas de *O. moubata* (Nakajima et al, 2001; Nakajima, 2002) e uma de *Dermacentor variabilis* (Johns et al, 2001) foram isoladas e caracterizadas. A defensina de *D. variabilis* foi detectada na hemolinfa de carrapatos inoculados experimentalmente com *Borrelia burgdorferi* ou *Bacillus subtilis* (Johns et al, 2001).

Peptídeos antimicrobianos estão amplamente distribuídos nos organismos. A ampla ocorrência dessas substâncias sugere que elas desempenham um papel importante na imunidade inata contra microorganismos e outros patógenos (Boman, 1995; Ganz & Lehrer, 1999; Hoffmann *et al.*, 1999). PAMs são particularmente potentes e apresentam um amplo espectro de ação. Normalmente sua atividade não se restringe a um único tipo de patógeno como bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos, protozoários. Alguns PAMs também apresentam uma tendência a ser hemolítico, enquanto outros podem ser usados como inseticidas (Hancock *et al.*, 2006). Recentemente, foi evidenciado que alguns PAMs podem exercer funções na modulação da imunidade, as quais têm impacto em infecções e inflamações (Brown & Hancock, 2006).

Os PAMs também são de grande importância na defesa de plantas como parte da barreira constitutiva pré-existente, e também como resposta induzida por infecção, e podem interagir um com o outro de forma aditiva, sinérgica ou antagonística (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001)

Estudos sobre a biodiversidade de moléculas antimicrobianas nos vários grupos de artrópodes podem ser importantes para se entender o processo imunológico de uma maneira mais ampla, possibilitando compreender as relações existentes entre os vários sistemas bem como sua origem (Silva Jr., 2000).

Os produtos naturais representam uma rica fonte de compostos a serem explorados na seleção de novos defensivos agrícolas para plantas e como suas principais características podem-se citar a baixa toxicidade para humanos e para a vida selvagem, o baixo impacto ambiental, a presença de baixa quantidade de resíduos em alimentos e a compatibilidade com o manejo integrado de pragas.

Estima-se que perdas causadas por ação de fitopatógenos em todo mundo alcance 20% da produção de alimentos e dos lucros econômicos dos agricultores (Rommens e Kishore, 2000). Os fungicidas são, hoje em dia, essenciais para o efetivo controle de doenças de plantas, seja na cobertura de sementes, visando aumentar a sobrevivência das plantas recém-germinadas (Broekaert, *et al.*, 1995) ou em fase mais adiantada de cultivo. Há uma longa

tradição no uso de fungicidas e inseticidas para o controle de pragas. Entretanto, a alta frequência de aplicação desses defensivos tem frequentemente, resultado na emergência de pragas resistentes ao princípio ativo. O único caminho para prevenir ou retardar o aparecimento de resistência é desenvolver compostos com outros modos de ação e usar estratégia de controle de pragas que incluam a proteção de organismos benéficos, (Oerke, 2006).

Recentes estudos mostraram que vários peptídeos catiônicos e não catiônicos são expressos em muitas espécies de vertebrados e invertebrados, e é possível que eles atuem em sinergismo para melhorar a resposta imune contra patógenos. Assim alguns peptídeos antimicrobianos vêm também sendo avaliados como agentes terapêuticos para animais e humanos, à semelhança dos antibióticos em uso. Entretanto, pouco se conhece sobre sua forma de penetração, toxicidade potencial e custo de produção. Esses peptídeos têm atraído o interesse de pequenas companhias farmacêuticas e biotecnológicas no mundo, objetivando a produção de agentes de defesa tópicos e de amplo espectro a serem comercializados.

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana. A candidíase, principal infecção fúngica oportunista do ser humano, é provocada por leveduras do gênero *Candida*, que fazem parte da microbiota normal da cavidade oral e dos tratos gastrointestinal e urogenital de seres humanos. Geralmente não ocasionam processos infecciosos em indivíduos saudáveis, mas podem acometer pacientes imunocomprometidos e/ou sob terapia antimicrobiana por um período prolongado (Suzuki, 2009; Matos et al, 2009). Essa infecção expressa muito bem a variedade de relações que ocorrem entre o hospedeiro e a microbiota autóctone, podendo ir do comensalismo à doença sistêmica fatal (Fisher & Cook, 2001). *Candida albicans* é a principal espécie do gênero associada a candidíase, mas outras também são relatadas, como por exemplo: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefir* e *Candida guilliermondii*.

Uma vez rompido o equilíbrio biológico entre a microbiota e o organismo hospedeiro, as espécies de *Candida* têm a capacidade de provocar infecções

ocasionando quadros agudos, subagudos ou crônicos, superficiais ou profundos (Neufeld, 1999; Eggimann et al, 2003; Menezes e Neufeld, 2006). *C. albicans* é reconhecida por sua maior patogenicidade, secretam proteinases e fosfolipases capazes de degradar, destruir ou transformar constituintes da membrana celular do hospedeiro induzindo a uma disfunção e/ou destruição física. O papel das enzimas proteolíticas pode ser digerir proteínas do hospedeiro promovendo uma fonte de nitrogênio para a célula e contribuir para a adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro (Hube & Naglik, 2001).

Esse fato é devido, em grande parte, ao surgimento de microorganismos multi-resistentes aos antibióticos, tornando-se vital investir na busca de substâncias naturais ou sintéticas que exibam atividades antimicrobianas específicas e, acima de tudo, que as exerçam através de mecanismos de ação alternativos daqueles dos antibióticos disponíveis. Nesse contexto, a pesquisa, a purificação, e a caracterização química, biológica e estrutural provenientes da fauna e da flora brasileira podem ser valiosas, uma vez que a própria evolução tratou de selecionar um vastíssimo espectro de substâncias eficientes que defendem contra infecções, podendo atuar em diferentes compartimentos celulares, sendo então candidatos promissores para o desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais.

II Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

O objetivo foi ampliar o conhecimento das moléculas envolvidas no sistema imunológico de aracnídeos, utilizando a aranha caranguejeira *Acanthoscurria rondoniae* como modelo experimental. Verificar se as aranhas são capazes de apresentar uma resposta imune através da produção de substâncias antimicrobianas, como observada em outros artrópodes, através da purificação e caracterização de moléculas presentes em sua hemolinfa e caracterizá-las para um entendimento mais amplo dos processos envolvidos no sistema imune de aracnídeos e dos artrópodes em geral.

2.2 - Objetivos Específicos

- Isolar moléculas com atividade antimicrobiana presentes na Hemolinfa (Hemócitos e Plasma) da aranha *Acanthoscurria rondoniae*.
- Purificar e caracterizar as moléculas com atividade antimicrobiana.
- Avaliar o espectro de atividade das moléculas encontradas contra fungos e bactérias.
- Comparar com as moléculas encontradas em outras aranhas caranguejeiras da família Theraphosidae.

III - Material e Métodos

1 – Animais e Coleta de Hemolinfa

Para os experimentos, foi utilizada a aranha *Acanthoscurria rondoniae* (Fig. 06), de ambos os sexos, mantida no biotério do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan (São Paulo).



Figura 6 – Aranha caranguejeira *Acanthoscurria rondoniae* (Theraphosidae, Mygalomorphae).

Também foram utilizadas outros terafosídeos como *Vitalius wacketi* (Fig 07), *Nhandu coloratovillosus* (Fig 08), *Lasiadora parahybana* (Fig 09), *Acanthoscurria gomesiana* (Fig 10) e *Grammostola pulchra* (Fig 11) que pertencem à subfamília Theraphosinae e *Avicularia juruensis* (Fig 12) que pertence à subfamília Aviculariinae. Foram utilizadas aranhas de ambos os sexos mantidas no biotério do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan (São Paulo).

Todas as aranhas utilizadas nos experimentos foram coletadas sob Licença Permanente para coleta de material zoológico nº 11024-3 - IBAMA e Autorização Especial de Acesso ao Patrimônio Genético nº 001/2008.



Figura 7 – Aranha caranguejeira *Vitalius wacketi* (Theraphosidae, Mygalomorphae)



Figura 8 – Aranha caranguejeira *Nhandu coloratovilosus* (Theraphosidae, Mygalomorphae)



Figura 9 – Aranha caranguejeira *Lasiodora parahybana* (Theraphosidae, Mygalomorphae)



Figura 10 – Aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana* (Theraphosidae, Mygalomorphae)



Figura 11 – Aranha caranguejeira *Grammostola pulchra* (Theraphosidae, Mygalomorphae)



Figura 12 – Aranha caranguejeira *Avicularia juruensis* (Theraphosidae, Mygalomorphae)

A hemolinfa (aproximadamente 0,5 mL / aranha), de animais de diferentes estágios de desenvolvimento e sexo, foi coletada de animais previamente resfriados, por punção do vaso dorsal (Fig 13) utilizando-se seringa apirogênica. Para evitar a desgranulação dos hemócitos e conseqüente coagulação da hemolinfa, esta foi coletada na presença de tampão citrato de sódio (NaCl 0,45M; glicose 0,1M; citrato trissódico 30mM; ácido cítrico 26 mM; EDTA 10mM), ph 4,6 (2 volumes de hemolinfa:1 volume de tampão) (Söderhäll e Smith, 1983).



Figura 13– Detalhes da região dorsal do abdome da aranha *Acanthoscurria rondoniae*. Punção cardíaca do vaso dorsal com a utilização de seringa apirogênica para remoção de hemolinfa.

Os hemócitos foram separados do plasma por centrifugação a 800 xg durante 15 minutos a 4°C. O plasma foi removido e congelado. Os hemócitos foram lavados com anticoagulante para remoção de resíduos do plasma por nova centrifugação a 800 xg durante 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado.

2 – Extração e Purificação de Peptídeos Antimicrobianos

2.1 – Hemócitos

Após a concentração em centrífuga a vácuo (Savant Instrument Inc), o material originado dos hemócitos foi homogeneizado com Homogenizador de Dounce em 5 mL de ácido acético 2M. O homogeneizado foi mantido em agitação no gelo por 30 minutos. O sobrenadante, obtido por centrifugação a

16.000 xg por 30 minutos a 4° C, foi aplicado em duas colunas SEP-PAK C18 ligadas em série, equilibradas com água acidificada, com o objetivo de pré-purificar os peptídeos antimicrobianos. Três estágios de eluição foram realizados utilizando-se sucessivamente diferentes concentrações de acetonitrila (5%, 40% e 80%) em água acidificada.

As frações obtidas na etapa anterior foram concentradas em uma centrífuga a vácuo, ressuspendidas em água milli-Q e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR). A purificação por CLAE foi realizada a uma temperatura constante, utilizando o sistema UFLC-Shimadzu. A absorbância foi monitorada a 225 nm.

As frações (5%, 40%, e 80% de acetonitrila) foram primeiramente aplicadas em uma coluna de fase reversa semi-preparativa Júpiter C18 e as eluições foram realizadas por gradientes de acetonitrila em água acidificada (TFA 0,05%) de 0 a 20%, 2 a 60% e 20 a 80%, respectivamente, por 120 min, sob um fluxo de 1,5 mL/min.

Como uma segunda etapa de purificação foi utilizada uma coluna de gel filtração Superdex Peptide HR 10/30 (Amershan, Biosciences) e a eluição foi realizada sob condições isocráticas com acetonitrila 30% em água acidificada (TFA 0,05%) por 50 minutos, sob um fluxo de 0,5 mL/min.

As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente, concentradas em uma centrífuga a vácuo, e reconstituídas em água Milli-Q. A presença de atividade antimicrobiana nessas frações foram determinada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido, em cada etapa de purificação dos peptídeos.

2.2 – Plasma

O plasma, após ser coletado e concentrado em uma centrífuga a vácuo (Savant Instrument, Inc) foi ressuspendido em água Milli-Q acidificada (ácido trifluoracético (TFA) 0,05%) (20 vezes o volume da hemolinfa coletada). A solução foi mantida sob agitação constante num banho de gelo por 30 minutos e centrifugado a 16.000 xg, a 4°C, por 10 min, o sobrenadante obtido foi aplicado em duas colunas descartável SEP-PAK C18 ligadas em série,

equilibradas com água acidificada, com o objetivo de pré-purificar os peptídeos antimicrobianos. Três estágios de eluição foram realizados utilizando-se sucessivamente diferentes concentrações de acetonitrila (5%, 40% e 80%) em água acidificada.

As frações obtidas na etapa anterior foram concentradas em uma centrífuga a vácuo, ressuspendidas em água milli-Q e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A purificação por CLAE foi realizada a uma temperatura constante, utilizando o sistema UFLC-Shimadzu. A absorbância foi monitorada a 225 nm. As frações (5%, 40%, e 80% de acetonitrila) foram primeiramente aplicadas em uma coluna de fase reversa semi-preparativa Júpiter C18 e as eluições foram realizadas por gradientes de acetonitrila em água acidificada de 0 a 20%, 2 a 60% e 20 a 80%, respectivamente, por 60 min, sob um fluxo de 1,5 mL/min.

As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente, concentradas em uma centrífuga a vácuo, e reconstituídas em água Milli-Q. A presença de atividade antimicrobiana nessas frações foi determinada por ensaio de inibição em meio líquido, em cada etapa de purificação dos peptídeos.

3- Caracterização Estrutural

3.1 – Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas foi utilizada para avaliar o grau de pureza das moléculas durante as etapas de purificação e determinar a massa das moléculas que apresentaram atividade antimicrobiana.

As análises foram realizadas por:

- LTQ XL Thermo Scientific (“Linear Ion Trap Mass Spectrometer”)
- O equipamento foi previamente calibrado com as seguintes substâncias: cafeína (m/z 192,5), acetato de L-MRFA em água (m/z 524,3) e Ultramark 1621 (m/z 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822 e 1922). Para controle do equipamento foi utilizado ovoalbumina (43 kDa). As amostras foram previamente concentradas em uma centrífuga a vácuo e ressuspendidas em 15

μL em água Milli-Q (AF 0,1%). Para análise foi utilizada uma coluna C18 (Waters) e um gradiente linear de acetonitrila de 0 a 80% em água acidificada (AF 0,1%) em 60 min e fluxo de 400 nL/min. Análises realizadas com o espectrômetro operando em modo positivo. Os espectros foram coletados e analisados no software Xcalibur 2.0 (Thermo Electron, EUA). A deconvolução dos valores de m/z para a obtenção das massas moleculares dos peptídeos foi realizada no software MagTran 1.02 (Zhang & Marshall, 1998) ou MassAnalyzer 1.03 (Amgen, Thousand Oaks, CA, EUA).

- ESI-MS ("Electrospray Ionization - Mass Spectrometry") em um espectrômetro Finnigan LCQ™ Duo (Thermo Finnigan, EUA) acoplado a um sistema de cromatografia líquida em micro-escala Ultimate (Dionex/LC Packings, Sunnyvale, CA, EUA) com coluna capilar de vidro empacotadas com resina C18, seguindo métodos desenvolvidos por Assunção (2005). O equipamento foi previamente calibrado com as seguintes substâncias: cafeína (m/z 192,5), acetato de L-MRFA em água (m/z 524,3) e Ultramark 1621 (m/z 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822 e 1922). Foi utilizado um gradiente linear de acetonitrila de 5 a 80% em água acidificada (AF 0,1%) por 40 min e fluxo de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$. Análises realizadas com o espectrômetro operando em modo positivo. Os espectros foram coletados e analisados no software Xcalibur 2.0 (Thermo Electron, EUA). A deconvolução dos valores de m/z para a obtenção das massas moleculares dos peptídeos foi realizada no software MagTran 1.02 (Zhang & Marshall, 1998) ou MassAnalyzer 1.03 (Amgen, Thousand Oaks, CA, EUA).

- MALDI/TOF ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight"), em um espectrômetro Ettan MALDI-TOF/Pro (Amersham Biosciences, Suécia). Inicialmente, 0,35 μL da amostra em água Milli-Q foi misturado em 0,35 μL de cristais de ácido usando-se o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matrix e depositados sobre a lâmina (slide) e deixado sob a bancada para evaporar. Após estarem secas, as amostras são sublimadas com o uso do laser (337nm) e se ionizam pela aquisição de prótons ou elétrons. Os íons obtidos, em geral são do tipo $(\text{M}+\text{H})^+$, $(\text{M}+\text{H})$, $\text{M}+\text{Na}^+$. Eles são acelerados

através de um campo elétrico, sendo direcionadas para o analisador. O analisador de tempo de voo (TOF) associado a esse sistema de ionização permite determinar a relação massa/carga (m/z) dos íons formados, medindo o tempo que um íon leva para conseguir atingir o detector. A velocidade adquirida por um íon acelerado por uma dada energia dentro de um campo elétrico é inversamente proporcional a sua relação m/z . Os íons são, portanto detectados em ordem crescente. A detecção pode ser efetuada em modo positivo. Os espectros finais foram obtidos após o acúmulo de 200 espectros simples ou após 5 min de análise, iniciando-se com 34% de energia do laser, e posteriormente calibrados. A calibração do equipamento foi realizada com um padrão de peso molecular contendo os peptídeos angiotensina II e P₁₄R (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com massas moleculares monoisotópicas de 1.045,53 e 1.532, 86 Da, respectivamente.

- Quadrupolo LC/MS Surveyor MSQ Plus - 15 μ L das amostras foram analisadas por injeção direta com uma solução 50% de acetonitrila em água acidificada 1:1 (AF 0,1%) sob fluxo de 0,05 mL. As análises foram realizadas com o espectrômetro operando em modo positivo. Os espectros foram coletados e analisados no software Xcalibur 2.0 (Thermo Electron, EUA). A deconvolução dos valores de m/z para a obtenção das massas moleculares dos peptídeos foi realizada no software MagTran 1.02 (Zhang & Marshall, 1998) ou MassAnalyzer 1.03 (Amgen, Thousand Oaks, CA, EUA).

3.2 – Sequenciamento “de novo”

A estrutura primária dos peptídeos presentes nas frações com atividade antimicrobiana foi determinada por meio da técnica de sequenciamento “de novo” (Cantú et al., 2008; Seidler et al., 2010) dos seus espectros de fragmentação obtidos por ESI-Q-ToF/MS (eletrospray ionization-quadrupole-time of flight/mass spectrometry) em um equipamento Q-ToFTM ou Q-ToF Ultima API (Micromass) acoplado a uma fonte de cromatografia líquida em nanoescala nanoACQUITY UltraPerformance LC® (Waters).

Os peptídeos foram ressuspensos em 20 μL em ACN/ H_2O 1:1 com ácido fórmico 0,1% e submetidos a análise por infusão direta sob fluxo de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ em uma seringa de 50 μL (Hamilton, Reno, NV, EUA). A fragmentação dos íons mono ou duplamente carregados foi realizada sob diferentes energias de colisão (E_{col}) contra gás inerte (argônio) para que os melhores espectros de MS/MS pudessem ser utilizados no sequenciamento. Os espectros foram adquiridos a cada 0,5 segundo e a composição final de espectros foi obtida após 1,5 min de aquisição.

Os espectros de dissociação induzida por colisão (DIC) contra moléculas de gás inerte (Ar) foram deconvolvidos com a ferramenta MaxEnt3 (disponível no software MaxLynx 4.1) para que os íons com mais de uma carga fossem convertidos em monocarregados. A interpretação desses espectros processados foi realizada com a ajuda do tutorial disponível em: [Http://www.ionsource.com](http://www.ionsource.com). O assinalamento dos valores de m/z correspondentes as series $-y$ e $-b$ foi feita com o auxílio do aplicativo “Peptide Sequencing” (MassLynx 4.1-Waters).

3.3 – Redução e Alquilação

A presença de pontes de dissulfeto nos peptídeos purificados da hemolinfa pode ser avaliada pela redução e alquilação dos resíduos de Cys presentes nas moléculas usando os procedimentos descritos por Stone & Willians (1996).

Uma alíquota de 10 μL do peptídeo seco foi dissolvida em 20 μL de NH_4HCO_2 0,4 M. A essa solução adicionou-se 5 μL ditionotretol (DTT) 45 mM. A amostra foi mantida a 50 $^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Após resfriada em temperatura ambiente, foi adicionado 5 μL de iodocetamida 100 mM e mantida em temperatura ambiente por 15 min, protegida da luz. Adicionou-se 130 μL de água Milli-Q para diluição da Ureia e 2 μL de tripsina, incubada a 37 $^\circ\text{C}$ por 12 horas. Para interromper a reação acrescentou-se 160 μL de água acidificada (TFA) 0,1%. O produto foi concentrado em centrífuga a vácuo, dessalinizado em colunas Zip Tip ® C18. A amostra foi analisada utilizando uma coluna C18

em um gradiente linear de 5% a 80% de acetonitrila em água acidificada, por 40 minutos sob um fluxo de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.4 – Síntese de Peptídeos

O peptídeo foi sintetizado de acordo com o método clássico Fmoc, como descrito por Atherton e Sheppard (1989). Resumidamente, a síntese foi realizada pelo método da seringa. A cadeia peptídica foi construída empregando histidina ligada a uma resina Wang com 0,56 mmol/g de grau de substituição – Fmoc-His(Trt)-Wang resin (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Os acoplamentos foram feitos com cinco vezes de excesso de aminoácido em relação aos grupos reativos da resina. Para a ativação dos Fmoc-aminoácidos foi utilizado TBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate) / HOBt (*N*-Hydroxybenzotriazole) / NMM (*N*-methylmorpholine) em DMF (dimetilformamida) em concentração de 0,3 M sob agitação por 5 minutos. O éster ativo produzido foi acoplado à cadeia ligado à resina deixando-se reagir por 30 minutos. Ao final de cada acoplamento a resina foi lavada cinco vezes com DMF por 1 minuto cada. A remoção do grupo protetor FMOC foi realizada em três etapas de 7 minutos utilizando 1,2-Ethanedithiol com DMF por 1 minuto. O processo cíclico foi repetido até que a cadeia peptídica estivesse completa. O peptídeo final foi clivado da resina e desprotegido por 8 horas empregando um coquetel de reagentes composto por: 82,5% de TFA (ácido trifluoracético), 5% de fenol, 5% de água, 5% de tioanisol e 2,5 % de EDT (1,2-Ethanedithiol). O coquetel foi evaporado e o produto resultante tratado com éter etílico seco. O precipitado branco resultante foi centrifugado, dissolvido em água e acetonitrila e liofilizado. O material foi caracterizado por CLAE-FR e a identidade da molécula foi verificada por espectrometria de massas MALDI-TOF. O peptídeo bruto foi purificado por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE-RF) utilizando-se coluna de fase-reversa semipreparativa Shim-pak semiprep-ODS(H) Kit (20 mm X 250 mm, Shimadzu Corporation), num gradiente de 5% a 35% de acetonitrila no fluxo de 8 ml/min e as frações contendo o peptídeo desejado foram identificadas por espectrometria de massas. As frações contendo o

peptídeo foram reunidas e liofilizadas resultando em 3 mg de produto final com pureza mínima de 95% em CLAE.

3.5 – Cálculo da Concentração do Peptídeo Sintético

A concentração do peptídeo sintético em solução foi, inicialmente, baseada na massa do material medida em uma balança analítica PX-200 (Denver Instrument, Bohemia, NY, EUA) e, posteriormente corrigida pela lei de Lambert-Beer (Nelson et al., 2000):

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

onde **A** é a Abs em $\lambda = 280\text{nm}$; ε é o coeficiente de extinção molar em $\lambda = 280\text{nm}$; **l** o espaço óptico percorrido pela luz e **c** a concentração da molécula.

A absorbância da amostra foi medida num espectrômetro NanoVue (GE Heltthcare) com espaço óptico de 1mm. O coeficiente de extinção molar do peptídeo foi calculado segundo a formula proposta por Pace et al., (1995):

$$\varepsilon = N(\text{Trp}) \times \text{Ext}(\text{Trp}) + N(\text{Tyr}) \times \text{Ext}(\text{Tyr}) + N(\text{Cistina}) \times \text{Ext}(\text{Cistina})$$

onde ε é o coeficiente de extinção molar em $\lambda = 280\text{nm}$; **N** é o número de resíduos; **Ext** é o coeficiente de extinção molar dos resíduos que possuem absorbância a 280 nm [$\text{Ext}(\text{Trp}) = 5.500$; $\text{Ext}(\text{Tyr}) = 1.490$; $\text{Ext}(\text{Cistina}) = 125$]

4 – Bioensaios

4.1 – Microorganismos

Escherichia coli SBS 363 e *Micrococcus luteus* A270 foram obtidas da coleção do Instituto Pasteur, Paris. *Candida albicans* (MDM8) foi obtida da Coleção do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil. As bactérias Gram negativas *E. coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Strain Boston 41501), e as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228 obtidas junto American Type Culture Collection (ATCC). Isolados clínicos (agentes de candidiase) obtidos através da Dra. Mirian A. F. Hayashi (Depto. Farmacologia/UNIFESP) e depositados na coleção do Instituto Oswaldo Cruz: *Trichosporon* sp IOC 4569, *Candida krusei* IOC 4559, *C. glabrata* IOC 4565, *C. albicans* IOC 4558, *C. parapsilosis* IOC 4564, *C. tropicalis* IOC 4560 and *C. guilliermondii* IOC 4557. *Beauveria bassiana* fungo filamentosos isolado de aranha mumificada coletada em campo.

4.2 – Atividade Antimicrobiana

Para a atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) utilizamos o ensaio de inibição de crescimento em meio líquido (Bulet *et al.*, 1993). A 10 µL ou 20 µL da fração a ser testada ou de água (controle), aplicados em poços de uma microplaca, adiciona-se 90 ou 80 µL de meio de cultura contendo uma suspensão de uma cultura de microorganismo em fase logarítmica. A medida de absorbância das culturas após 18 horas de incubação a 30 °C foi realizada em um leitor de microplaca Victor³ (1420 Multilabel Counter/Victor³ – Perkin Elmer) a 595 nm (Fig 15). A mínima concentração inibitória (MCI) foi expressa como intervalo de concentrações [a]-[b], onde [a] é a máxima concentração do peptídeo testada na qual os microorganismos estão crescendo e [b] é a menor concentração que causa 100% de inibição do crescimento.

Teste de Inibição em Meio Líquido

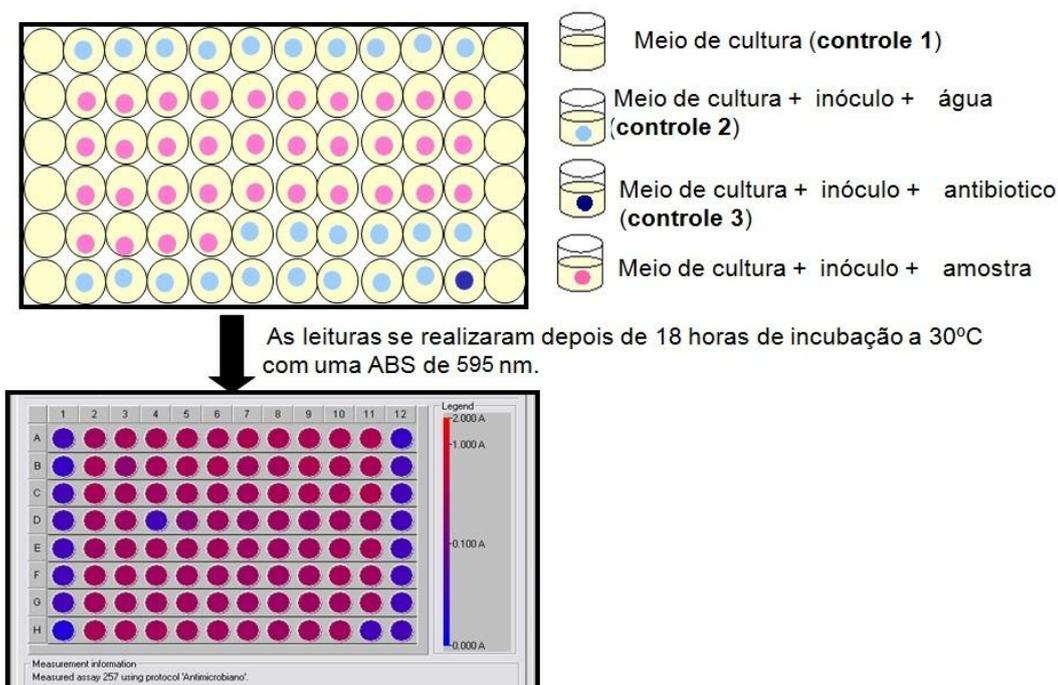


Figura 14– Esquema de ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido em microplaca.

4.3 – Atividade Fungicida

Blastoconídeos de *Candida albicans* MDM8 foram ressuspensos em um meio de crescimento contendo dextrose de batata 1,2% (m:v) (Difco; “half strength”) (PDB) (concentração final: 10^4 células/ml). Alíquotas de 80 μ L dessa suspensão foram distribuídas em poços de uma microplaca contendo 20 μ L de água ou da fração e incubados a 30 °C. Após diferentes tempos de incubação (0, 10 min, 1 h, 3 h, 5 h, 8 h, 10 h, 12 h, 18 h e 24 h), alíquotas dessa suspensão (10 μ L) foram coletadas e os blastoconídeos contados utilizando-se Câmara de Neubauer. Para determinar a viabilidade dos blastoconídeos, alíquotas coletadas (30 μ L) foram semeadas em meio Luria Bertani (LB) com Agar 1,5% e incubados a 37 °C por 18 horas.

4.4 - Ensaio Hemolítico

A atividade hemolítica do peptídeo sintético **P2** foi testada contra eritrócitos humanos em microplaca de 96 poços com fundo em “U” (Fig 15). O sangue de um doador saudável, coletado na presença de um tampão de citrato de sódio (150 mM; pH 7,4) foi centrifugado por 15 min a 700 xg, lavado três vezes e ressuspenso em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4). A solução do peptídeo P2 num volume de 50 µL foi testada em triplicata a concentrações de 67 a 0,1 µM em diluições seriadas adicionando-se mais 50 µL de uma solução 3% (v/v) de eritrócitos em PBS. A microplaca foi centrifugada por 5 min a 700 xg após ter sido incubada por três horas a 37 °C. O sobrenadante foi transferido e usado para a medida de absorbância (λ = 414 nm) em um leitor de microplaca Victor³ (1420 Multilabel Counter/Victor³ – Perkin Elmer). As medidas de absorbância do sobrenadante para 0 e 100% de hemólise foram obtidas com 50 µL da solução 3% de hemácias em 50 µL de PBS e Triton X-100 0,05%, respectivamente. O valor da absorbância a 414 nm das hemácias em PBS e Triton X-100 0,05% foi determinado pela média da triplicata (modificado de Hao et al., 2009). A porcentagem de hemólise do peptídeo foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{hemólise} = \frac{\text{Abs}_{414 \text{ nm}} \text{ da solução com peptídeo} - \text{Abs}_{414 \text{ nm}} \text{ em PBS}}{\text{Abs}_{414 \text{ nm}} \text{ em Triton 0,1\%} - \text{Abs}_{414 \text{ nm}} \text{ em PBS}} \times 100$$

Foi utilizado um comprimento de onda de 414 nm, pois este foi o pico de absorbância da solução após o rompimento dos eritrócitos em Triton 0,1%. Este comprimento de onda é semelhante ao pico de Abs da cadeia α oxigenada da hemoglobina em solução (λ = 413,7 nm), segundo dados de (Sugita, 1975).

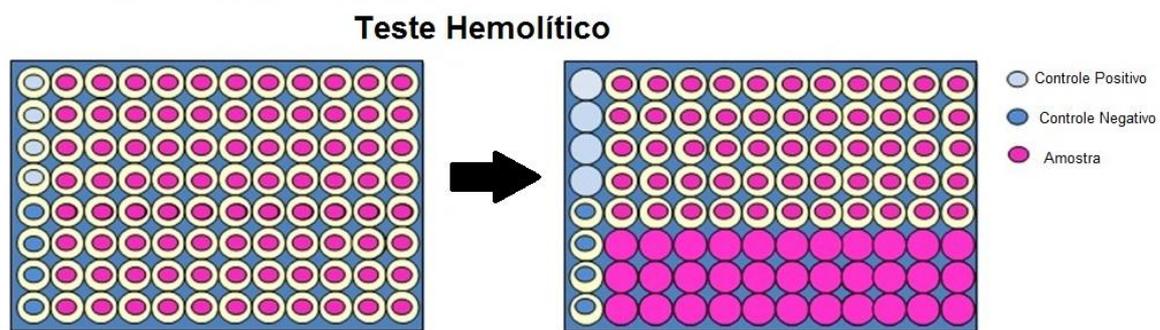


Figura 15– Esquema de ensaio hemolítico em microplaca.

IV – Resultados e Discussão

1 - Hemócitos

Para o isolamento dos peptídeos antimicrobianos, os hemócitos das aranhas, foram homogeneizados em ácido acético 2M e os peptídeos extraídos como descrito anteriormente (Materiais e Métodos, item III-2.1). O sobrenadante, obtido por centrifugação foi aplicado em colunas sep-pak C18 e submetido a três estágios sucessivos de eluição com diferentes concentrações de acetonitrila (5%, 40% e 80%), com o objetivo de pré-purificar os peptídeos antimicrobianos. Somente a fração eluída a 40% submetida à cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) resultou em frações com atividade antimicrobiana (Fig 16). Todas as frações obtidas foram analisadas quanto à atividade antimicrobiana através de ensaios de inibição em meio líquido utilizando-se *M. luteus*, *E. coli* e *C. albicans*. Apenas três frações obtidas na cromatografia do material eluído apresentaram fatores com atividade antimicrobiana denominados A, B e C (Tabela 01).

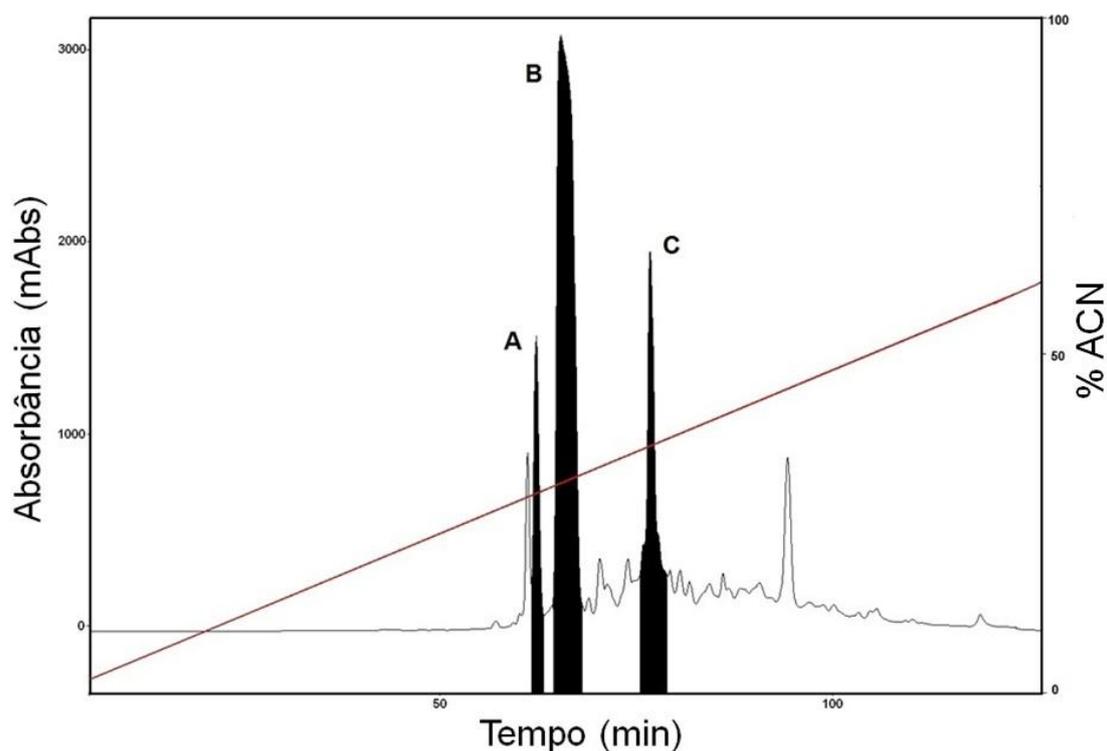


Figura 16 – Fracionamento de fatores antimicrobianos dos hemócitos de *A. rondoniae*. Frações antimicrobianas obtidas dos hemócitos eluídas com ACN 40% analisadas numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 2 a 60% em água acidificada por 120 min, num fluxo de 1,5 mL/min.

Tabela 1 – Atividade Antimicrobiana dos hemócitos – Atividade Antimicrobiana obtida das frações dos hemócitos de *A. rondoniae* por fase reversa CLAE.

Etapas da Purificação		Microorganismos		
Sep Pak	CLAE-FR	<i>M. Luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
40%	A	+	+	+
	B	-	+	-
	C	-	+	+

(+) com atividade; (-) sem atividade

A fração contendo o fator A (Fig 16) apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram negativa *E. coli*, Gram positiva *M. luteus* e a levedura *C. albicans*. Esta fração foi submetida a uma segunda etapa de purificação utilizando se uma coluna de gel filtração Superdex Peptide HR 10/30 e resultou em duas diferentes frações, A1 e A2 (Fig 17). Essas frações foram submetidas

a ensaio de inibição de crescimento microbiano e somente a fração A1 apresentou atividade antimicrobiana, confirmando a atividade anterior identificada.

Quando submetida à análise por espectrometria de massas do tipo ESI-MS revelou uma molécula com massa igual a 2.270,3 Da (Fig 18) semelhante a da gomesina (2.270,4 Da), encontrada em *A. gomesiana* por Silva Jr, *et al.* (2000). A fração A foi reduzida e alquilada mostrando a presença de duas pontes dissulfeto, quando analisada por ESI-MS o que é semelhante ao encontrado em gomesina (resultado não mostrado).

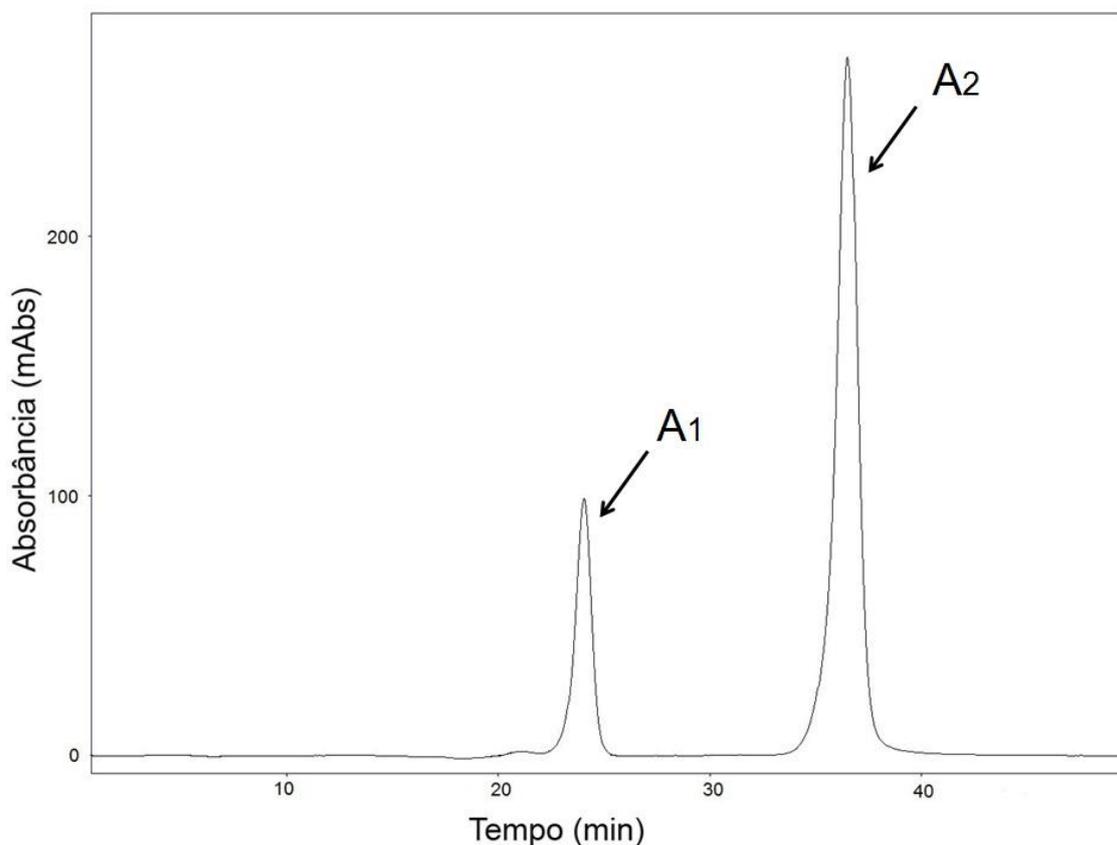


Figura 17 - Purificação da Fração A – Segunda etapa de purificação do fator A. Análise realizada utilizando uma coluna de gel filtração Superdex Peptide HR 10/30 sob condições isocráticas de acetonitrila de 30% em água acidificada por 50 min e fluxo de 0,5 mL/min.

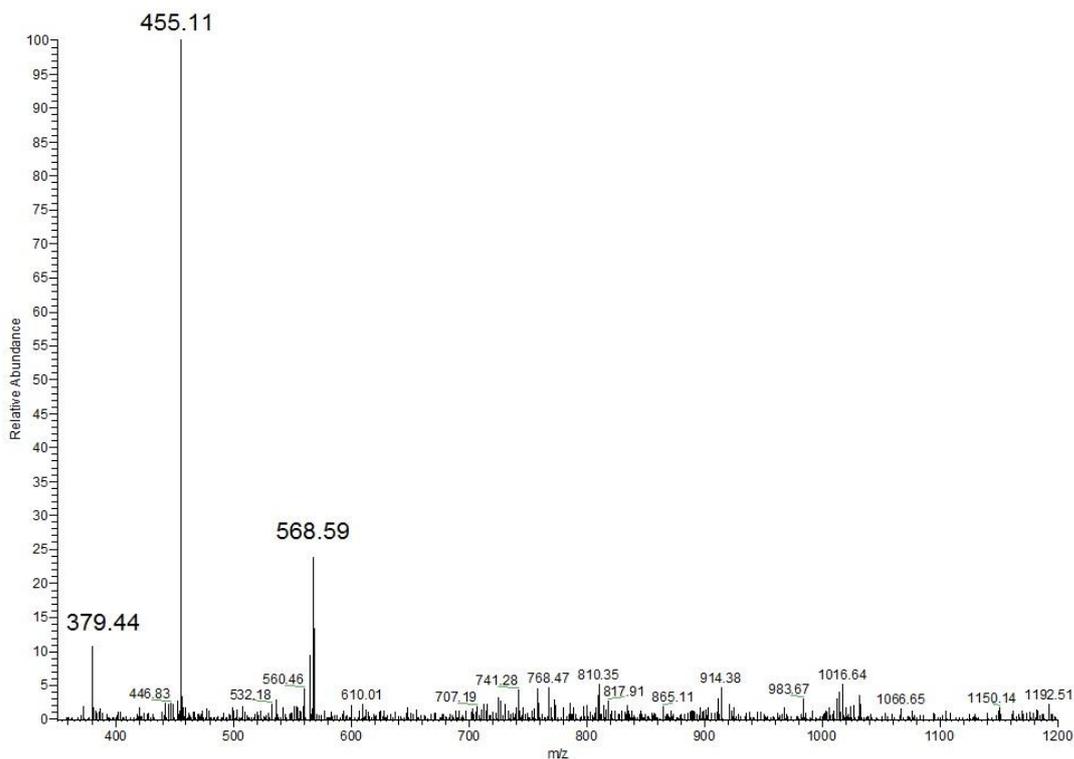


Figura 18 – Espectro de Massas (ESI-MS) da fração A1.

A fração B (Fig 16) apresentou atividade antimicrobiana somente contra a bactéria Gram negativa *E. coli* e teve sua atividade inibida por catalase, quando submetida à análise por espectrometria de massas do tipo LC-MS (Quadrupolo) (Fig 19) revelou uma molécula principal de m/z igual a 418.2 correspondente exatamente a da Mygalina, uma bis-acilpoliamina purificada e caracterizada a partir de hemócitos de *A. gomesiana* por Pereira, *et al.* (2007) e também encontrada em outros aracnídeos. A identidade da massa, análises de co-eluição, atividade contra *E. coli* e inibição da atividade por catalase, sugerindo que sua atividade antibacteriana está relacionada à produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), indicam que esta molécula é a mesma encontrada em *A. gomesiana*.

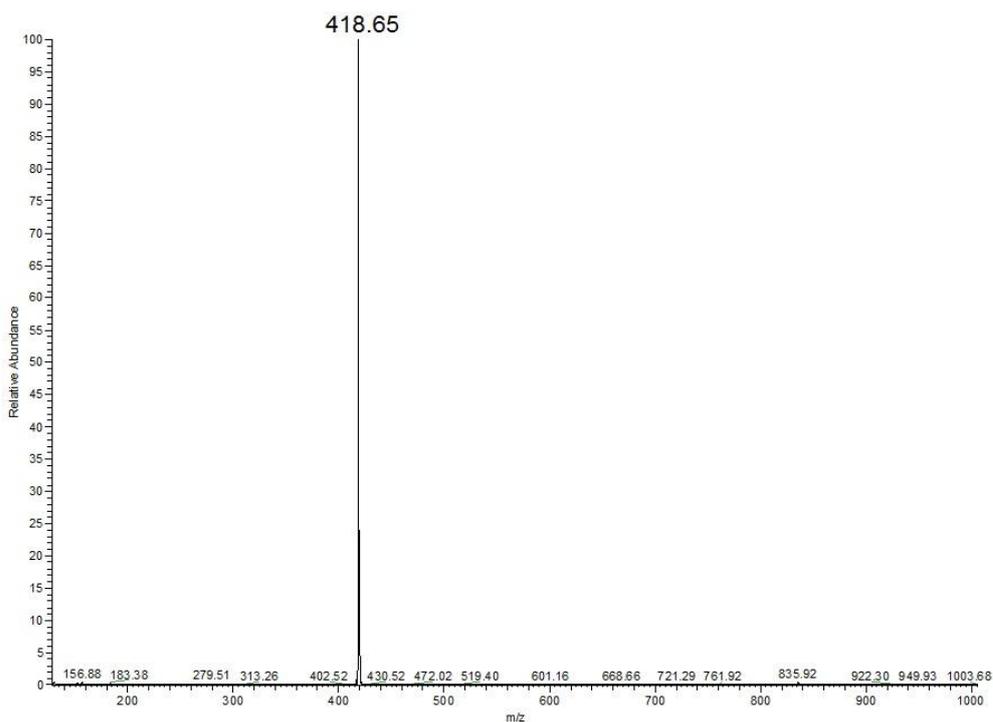
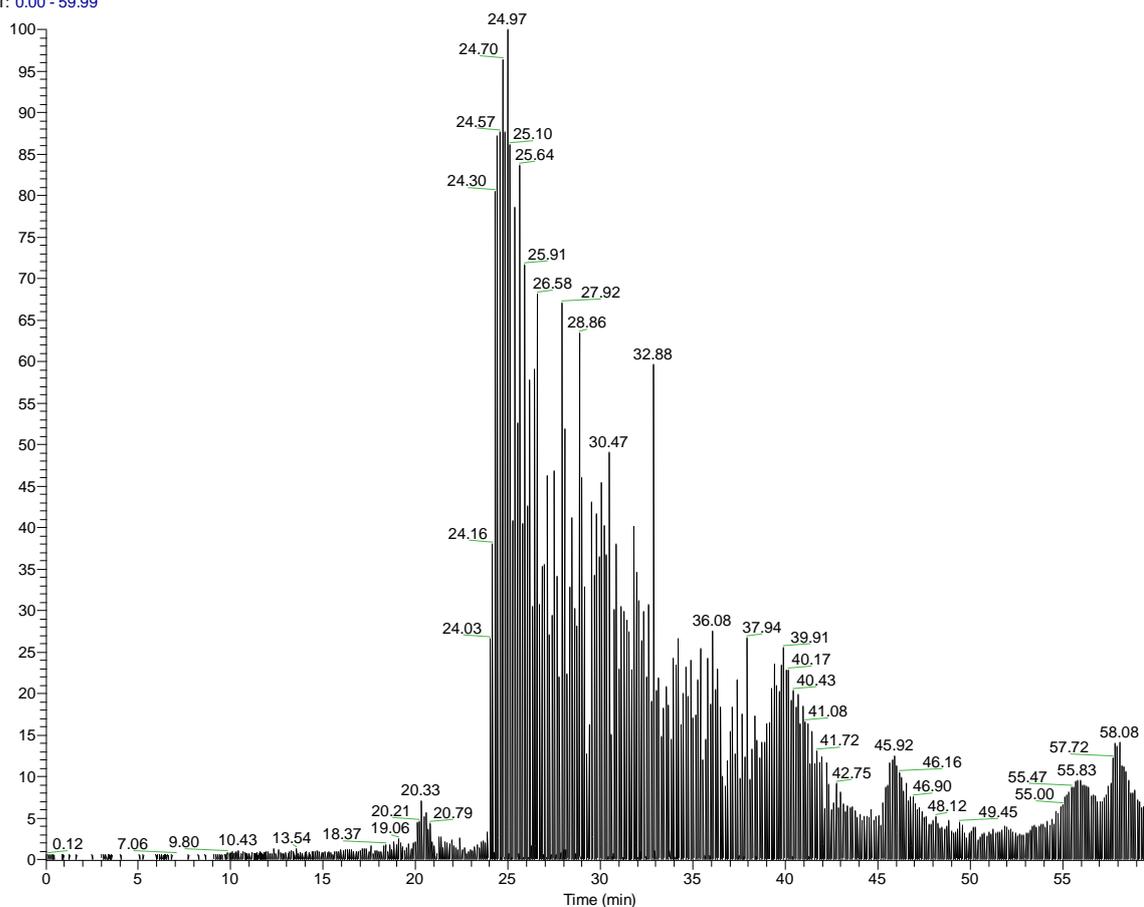


Figura 19 - Espectro de Massa (LC-MS) da fração B. A análise por LC-MS da fração B mostrou a presença de uma molécula de valor de m/z de 418,65.

A fração contendo o fator C (Fig 16) apresentou atividade antibacteriana contra a bactéria Gram negativa *E. coli* e contra a levedura *C. albicans*. Quando submetida à análise por espectrometria de massas do tipo LTQ-MS revelou uma única molécula de massa igual a 10.111 Da (Fig 20 e Fig 21), o que pode indicar que seja uma isoforma de Acanthoscurrina que foi identificada por Lorenzini *et al.* (2003) com massas iguais a 10.111 Da e 10.225 Da.

RT: 0.00 - 59.99



NL:
5.49E7
TIC MS
IT_2011080
5_06

Figura 20 – Perfil Cromatográfico da Fração C- A análise por LC-MS da fração C mostrou a presença de uma única molécula de massa igual a 10.111 Da. Análise realizada utilizando uma coluna C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 5 a 80% em água acidificada por 60 min e fluxo de 250 μ L/min.

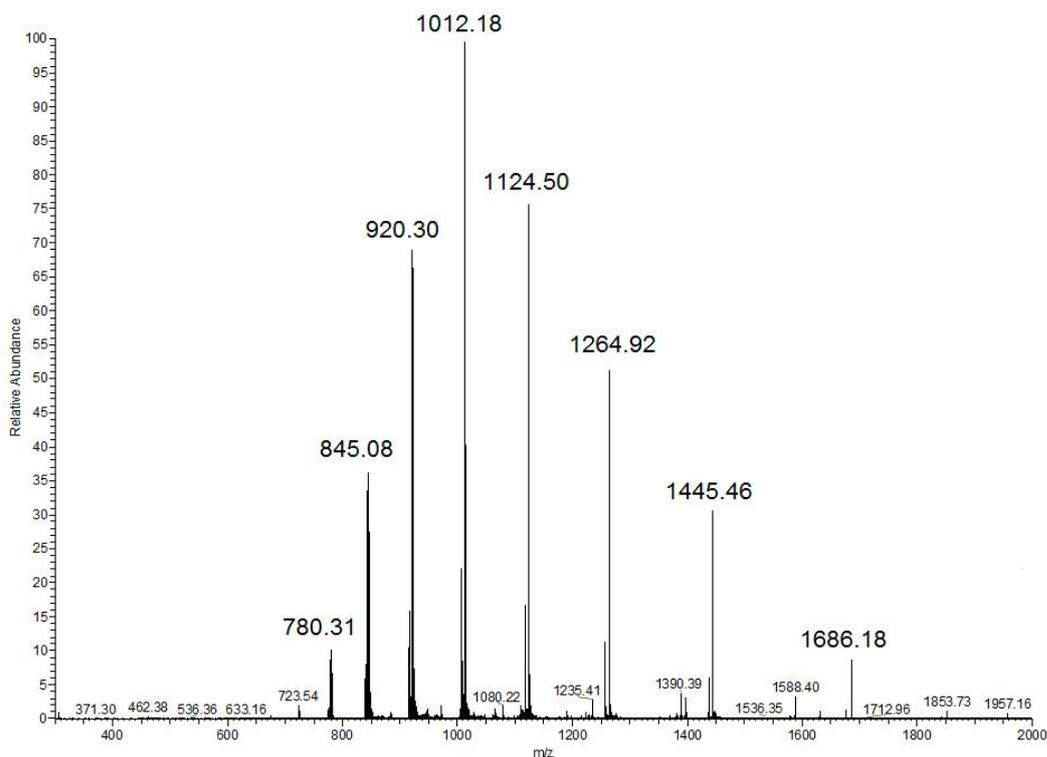


Figura 21 – Espectro de Massas (LC-MS) da fração C.

Quando comparado no banco de dados SwissProt pelo programa Mascot Daemon version 2.2.2 (<http://www.matrixscience.com>), mostrou semelhança com a spidroína, uma fibroína da teia de *Nephila clavipes*, que também é rica em glicina, e com o precursor da acanthoscurrina 2, o que nos confirma a hipótese dessa molécula ser semelhante a acanthoscurrina encontrada em *A. gomesiana* (Fig 22).

Mascot Search Results

User : katie
Email :
Search title : Conversion of IT_20110805_06.mzXML to mascot generic
MS data file : E:\2011\LTQ_2011\IT_20110805_06.mgf
Database : SwissProt 51.6 (257964 sequences; 93947433 residues)
Taxonomy : Arachnida (897 sequences)
Timestamp : 29 Aug 2011 at 17:50:47 GMT
Enzyme : None
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 1.5 Da
Fragment Mass Tolerance : ± 0.8 Da
Max Missed Cleavages : 0
Instrument type : ESI-TRAP
Number of queries : 3599
Protein hits : [SPD1_NEPCL](#) Spidroin-1 (Dragline silk fibroin 1) (Fragment) - Nephila clavipes (Orb spider)
[ACN2_ACAGO](#) Acanthoscurrin-2 precursor (Fragment) - Acanthoscurria gomesiana (Spider)

Select Summary Report

Format As	Select Summary (protein hits) <input type="text"/>	Help		
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits AUTO		
Standard scoring <input type="radio"/>	MudPIT scoring <input checked="" type="radio"/>	Ions score or expect cut-off 0	Show sub-sets 0	
Show pop-ups <input checked="" type="radio"/>	Suppress pop-ups <input type="radio"/>	Sort unassigned	Decreasing Score <input type="text"/>	Require bold red <input type="checkbox"/>

Figura 22 – Análise do perfil MS/MS do fator C. Análise do perfil MS/MS do fator C comparado no bando de dados SwisProt pelo programa Mascot Daemon.

2 – Plasma

O plasma, após ser coletado e concentrado em uma centrífuga a vácuo (Savant Instrument, Inc) foi ressuspenso em água Milli-Q acidificada e seu peptídeo extraído como descrito anteriormente (Materiais e Métodos, item III-2.1). O sobrenadante, obtido por centrifugação foi aplicado em colunas sep-pak C18 e submetido a três estágios sucessivos de eluição com diferentes concentrações de acetonitrila (5%, 40% e 80%), com o objetivo de pré-purificar os peptídeos antimicrobianos. Somente a fração eluída a 40% submetida à cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) resultou em frações com atividade antimicrobiana (Fig 23). Todas as frações obtidas foram analisadas quanto à atividade antimicrobiana através de ensaios de inibição em meio líquido utilizando-se *M. luteus*, *E. coli* e *C. albicans*. Apenas seis frações obtidas na cromatografia do material eluído apresentaram frações com atividade antimicrobiana denominadas P2, P3, P7, P11, P12 e P13 (Tabela 02).

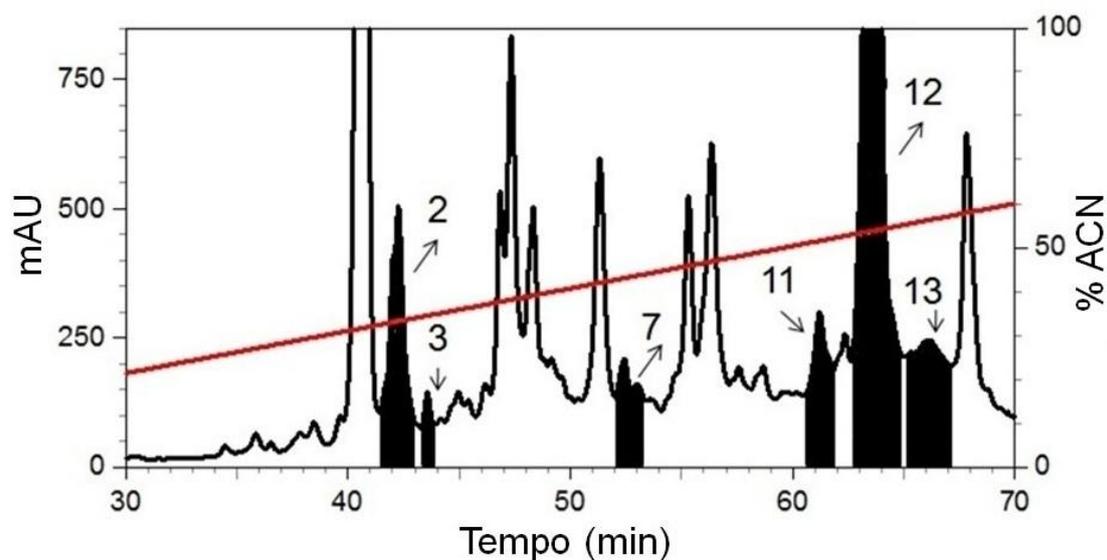


Figura 23 - Fracionamento de fatores antimicrobianos do plasma de *A. rondoniae*. Frações antimicrobianas obtidas do plasma eluídas com ACN 40% analisadas numa coluna semipreparativa Jupiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 2 a 60% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min.

Tabela 2- Atividade Antimicrobiana do Plasma- Atividade Antimicrobiana obtida das frações do plasma de *A. rondoniae* por fase reversa CLAE

Etapas da Purificação		Microorganismos		
Sep Pak	CLAE-FR	<i>M. Luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
40%	P2	-	-	+
	P3	-	-	+
	P7	-	-	+
	P11	-	-	+
	P12	-	-	+
	P13	-	-	+

(+) com atividade; (-) sem atividade

A fração P2 apresentou atividade antibacteriana contra a levedura *C. albicans*. Quando submetida à análise por espectrometria de massas do tipo Maldi-TOF revelou uma molécula com massa igual a 1236,776 Da (Fig 24).

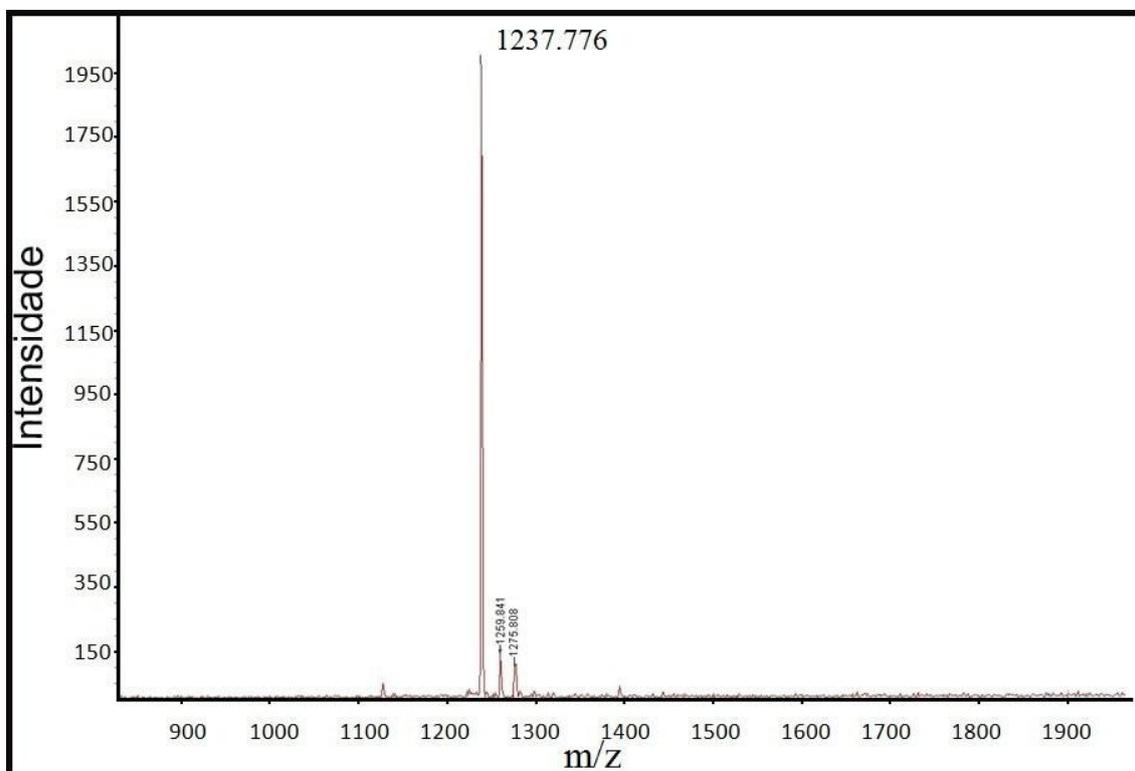


Figura 24– Espectro de massa (Maldi-TOF) fração P2.A análise da fração P2 mostrou a presença de uma molécula de valor de m/z de 1.237,776.

A fração P3 apresentou atividade antifúngica contra a levedura *C. albicans*. Quando submetida à análise por espectrometria de massas do tipo Maldi-TOF revelou duas moléculas, uma com maior intensidade de massa igual a 1385,727 Da e outra com uma intensidade menor de 898,39 Da (Fig 25), indicando que essa fração não está pura e necessita de mais uma etapa de purificação para verificar qual das duas moléculas apresenta atividade antimicrobiana.

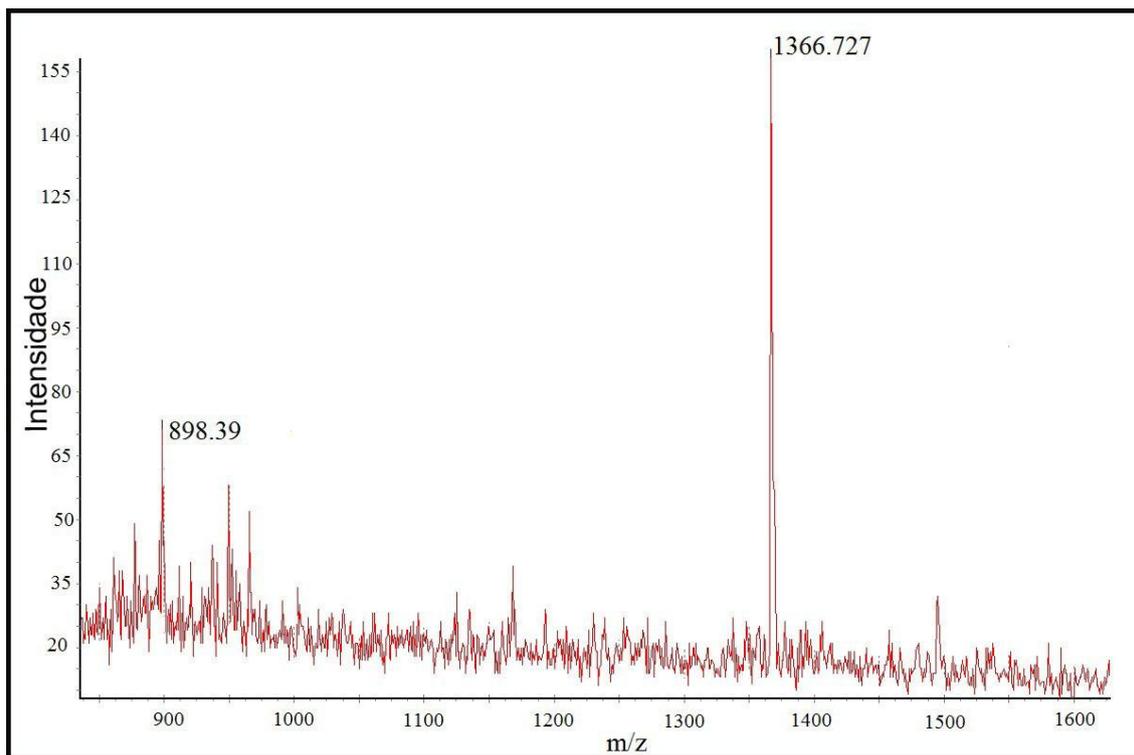


Figura 25 – Espectro de massa (Maldi-TOF) fração P3. A análise da fração P3 mostrou a presença de duas moléculas, uma com maior intensidade de valor de m/z de 1.336,727 e outra de 898,39.

A fração P7 apresentou atividade antifúngica contra a levedura *C. albicans*. Quando submetida à análise por espectrometria de massas do tipo Maldi-TOF revelou cinco moléculas, uma com maior intensidade de massa igual a 911,328 Da e outras quatro com uma intensidade menor de 744,21 Da, 861,212 Da, 990,233 Da e 1.103,308 Da respectivamente (Fig 26), indicando que essa fração não está pura e necessita de mais uma etapa de purificação para verificar qual das cinco moléculas apresenta atividade antimicrobiana.

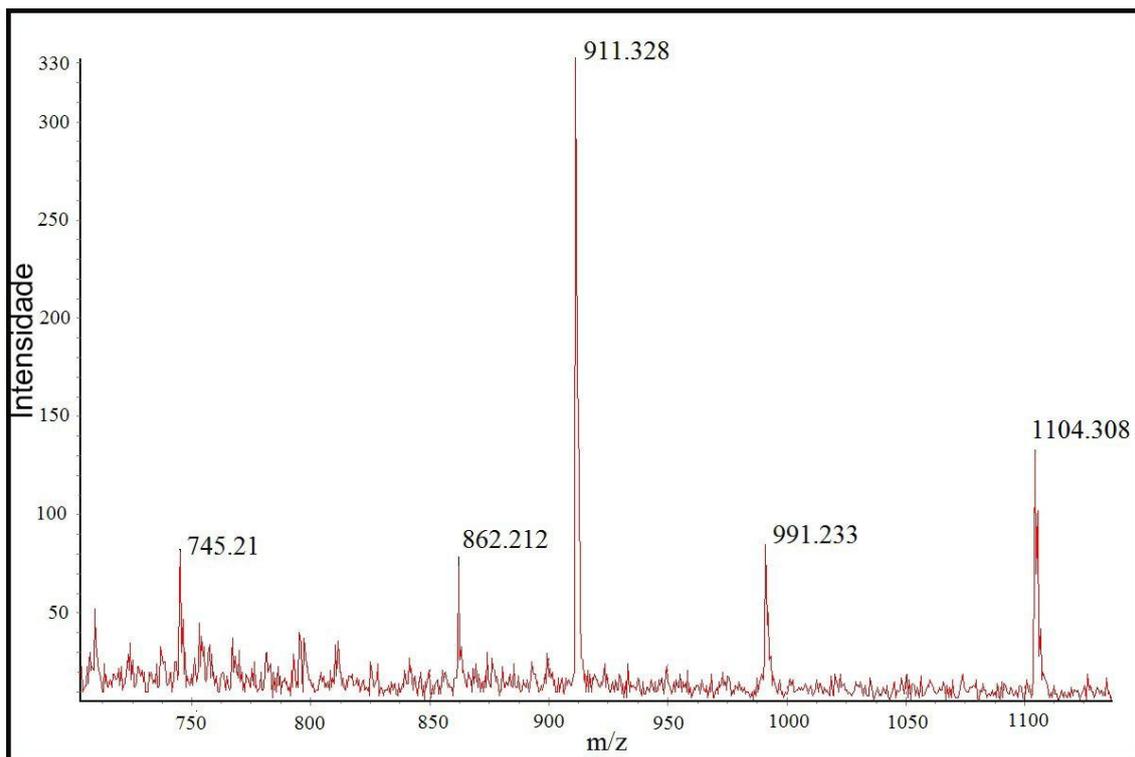


Figura 26 – Espectro de massa (Maldi-TOF) fração P7. A análise da fração P7 mostrou a presença de cinco moléculas, uma com maior intensidade de valor de m/z de 911,328 e outras quatro com uma intensidade menor de 745,21, 862,212, 991,233 e 1.104,308.

A fração P11 apresentou atividade antifúngica contra a levedura *C. albicans*. Quando submetida à análise por espectrometria de massas do tipo Maldi-TOF revelou um pool de moléculas e uma com maior intensidade de massa igual a 1.437,764 Da (Fig 27), indicando que essa fração não está pura e necessita de mais uma etapa de purificação para verificar qual molécula é a responsável pela atividade antimicrobiana nesta fração.

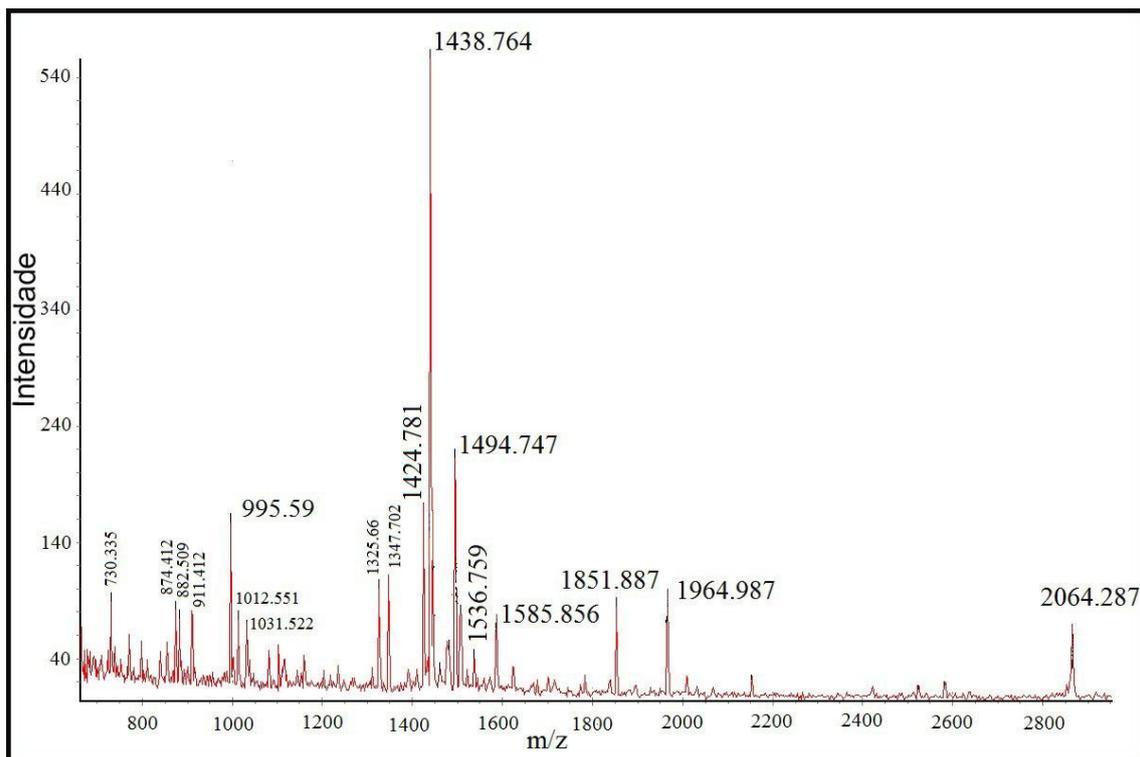


Figura 27 – Espectro de massa (Maldi-TOF) fração P11. A análise da fração P11 revelou um pool de moléculas sendo uma com maior intensidade de m/z igual a 1.438,764.

As frações P12 e P13 apresentaram atividade antifúngica contra a levedura *C. albicans*. Quando submetidas à análise por espectrometria de massas do tipo Maldi-TOF não apresentaram resultados conclusivos, necessitando assim de novas análises.

Neste trabalho, escolhemos caracterizar somente a fração P2, sendo assim foi realizado o sequenciamento “de novo” (Fig 28) dessa molécula que nos revelou uma seqüência de 10 aminoácidos IIIQYEGHKH mostrando identidade com o fragmento C-terminal da subunidade “d” da hemocianina da tarântula *Eurypelma californicum* (Fig 29, 30) (Theraphosidae) (Voit, R. et al, 2000) e com um fragmento da subunidade “d” e 90% de similaridade com um fragmento da subunidade “f” de *A. gomesiana*, diferenciando uma isoleucina por leucina ILIQYEGHKH (Fig 31) (<http://www.compsysbio.org/partigene/>).

Lee e colaboradores (2002) encontraram no plasma do lagostim *Pacifastacus leniusculus* um fragmento processado de hemocianina por uma proteinase cisteína-like, denominado astacidina 1 que consiste em numa seqüência de 16 aminoácidos (FKVQNQHGVVVKIFHH-COOH) que apresenta

uma massa molecular de 1.945,2 Da e seu COOH terminal carboxilado que também apresenta atividade antimicrobiana.

Destoumieux e colaboradores (2001) mostraram que no plasma dos camarões contém uma classe original de (poli) peptídeo antifúngico com massas moleculares variando de 2.752,2 Da do peptídeo originado do *Penaeus vannamei*, que consiste numa sequência de 23 resíduos de aminoácidos FEDLPNFGHIQVKVFNHGEHIIH; 7982.4 Da para um resíduo N-terminal com sequência VTDGDADSAVPSNLHENTENHYGSHGVYDPK e resíduo parcial de 32 aminoácidos, com massa molecular de 8.362,8 Da, com uma sequência NH₂-terminal LVVAVTDGDADSAVPSNLHENTENHYGSHGVY que revelou uma perfeita homologia com a região C-terminal da hemocianina de *Penaeus*, essas duas moléculas foram encontradas em *Penaeus stylirostris*. Neste caso, especula-se que camarões podem usar a hemocianina, abundante e prontamente disponível em seu plasma, para produzir nas primeiras horas de uma infecção, fragmentos C-terminal com ampla atividade antifúngica. Isto dá a hemocianina uma função potencial à imunidade dos crustáceos, servindo como substrato para a geração de (poli) peptídeos antifúngicos que possam contribuir para a eliminação de microorganismos no plasma. Isto pode ser estabelecido se o mecanismo que leva a clivagem parcial da hemocianina fizer parte do sistema imune do camarão e na medida em que esse processo pode estar envolvido em uma resposta antimicrobiana imediata e sistêmica no camarão. Nossos resultados nos levam a sugerir que a clivagem da hemocianina e produção de fragmentos peptídicos com atividade antimicrobiana também ocorram em aranhas como primeiro passo de sua defesa contra uma infecção, como o observado em crustáceos.

No caso do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, foi purificado um peptídeo do trato digestório com massa de 3.205,7 Da que mostrou similaridade com um fragmento da α -hemoglobina bovina (Fogaça et al, 1999). Embora hemoglobina não apresente atividade antimicrobiana, fragmentos de hemoglobina são encontrados em todos os tecidos animais, mesmo em lesões infeccionadas, tais fragmentos com atividade antimicrobiana foram documentados em humanos (Cornelia et al, 2003). Outros exemplos de peptídeos derivados de hemoglobina com atividade antimicrobiana têm sido reportados em sangue menstrual humano (Mak et al, 2004) e no sangue bovino (Hu et al, 2010).

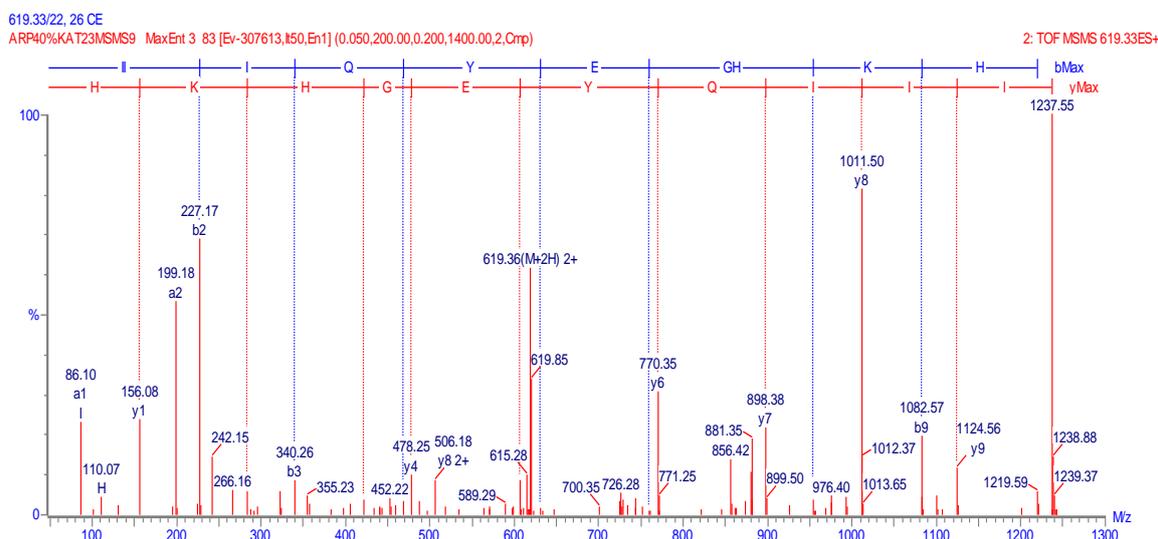
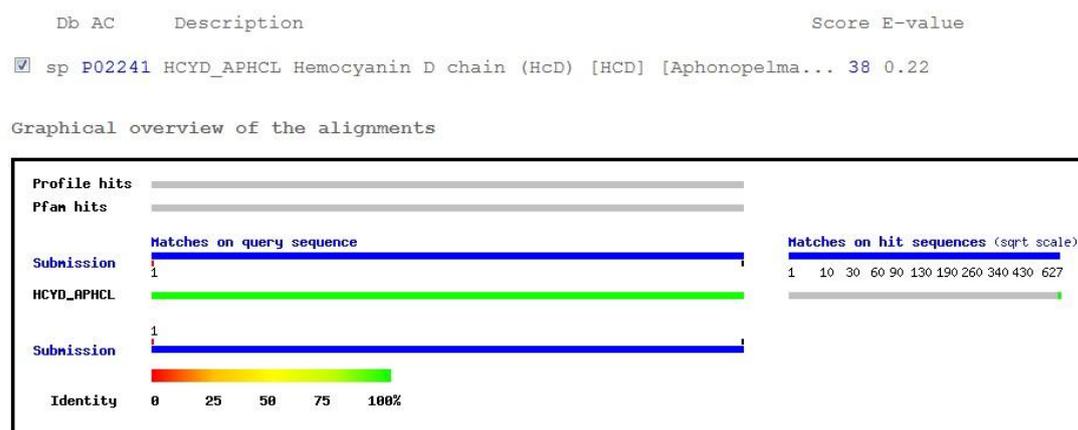


Figura 28 – Sequenciamento “De Novo” da fração P2 do plasma de *A. rondoniae* no Q-TOF Micro™ (Micromass). Os fragmentos mostraram correspondência com as series b e y. A sequência do peptídeo usando código de uma letra seguindo a orientação da serie b e y é mostrado no topo do gráfico. Espectrometria de Massa para sequenciamento “De Novo” para peptídeo foi realizada através de ionização positiva no Q-TOF Micro™ e fonte de íon electrospray.

a	MGYPFDRKITADTHEEFLTGNMNISHVTVRFQD	631
b	MGFPFDRDIKADSIPEWLHPNMHFSEVTITHHQ	627
c	MGFPFDRPIPEGHASNLHQPNVSFSQIKIQHH	629
d	MGYPFDRPIQVRTPSQFKTPNMAFQEI IIIQYEGHKKH	627
e	MGFPFDRVIEGLTLEEFLTPSMSCTDVRIKYTDIK	624
f	MGFPFDRVIKARTVADFRTTNMSFTDVKIQFKDQV	629
g	MGFPFDRPTKIHTAEEILTPNMSLTDVVIOYVGHE	628

Figura 29 – Subunidades da hemocianina (a,b,c,d,e,f,g) de *Eurypelma californicum* (Theraphosidae). O peptídeo mostrou identidade (em vermelho) com o fragmento C-terminal da subunidade “d” (Voit et al, 2000).



Alignments

sp P02241 Hemocyanin D chain (HcD) [HCD] [Aphonopelma californicum (American 627 AA
 HCYD_APHCL tarantula) (Eurypelma californicum)]

Score = 37.5 bits (81), Expect = 0.22
 Identities = 10/10 (100%), Positives = 10/10 (100%)

Figura 30 – Alinhamento da seqüência de Rondonina com o banco de dados disponível pelo Blast (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>). Resultado mostra identidade com a subunidade “d” da hemocianina de *Eurypelma californicum*.

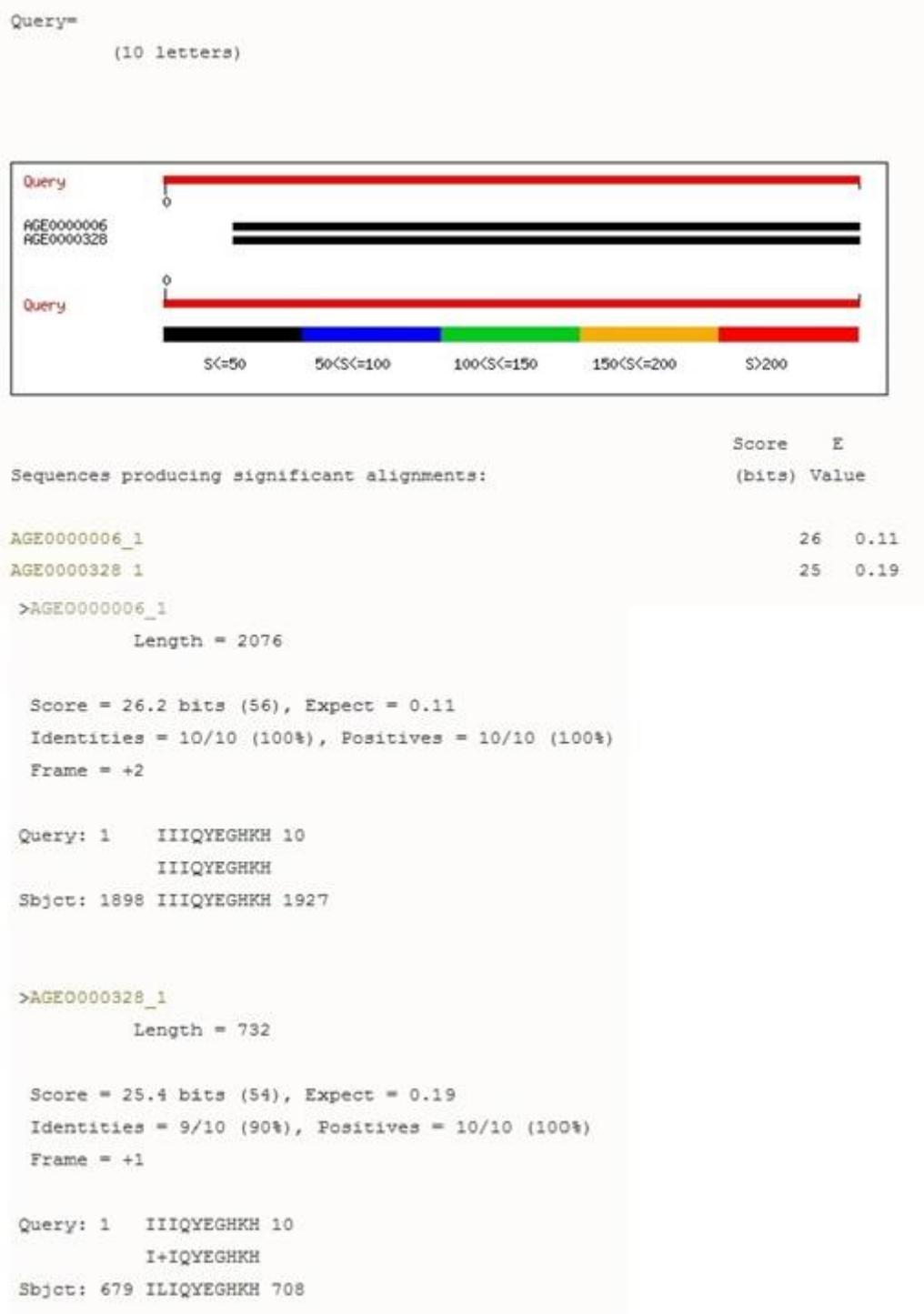


Figura 31 – Alinhamento da seqüência da Rondonina com o banco de dados de hemócitos de *A. gomesiana*. Os alinhamentos AGE0000006-1 e AGE0000328-1 correspondem a subunidade “d” e “f” da hemocianina de *A. gomesiana*.

A hemocianina dos artrópodes são compostas por subunidades heterogêneas na faixa de 75 kDa que combinam tanto em um único hexâmero regular cúbico (1 x 6) ou múltiplos hexâmeros (2-8 x 6), dependendo da espécie ou das condições fisiológicas. Até agora, a estrutura primária de muitas subunidades da hemocianina de Chelicerada e Crustacea foram determinadas. Modelos estruturais detalhados da subunidade da hemocianina do quelicerado *Limulus polyphemus* (Fig 32) e do crustáceo *Panulirus interruptus* (Fig 33) foram estabelecidas baseadas em estudos de difração de raio-X. Estas figuras nos mostram que a região C-terminal de qualquer subunidade fica totalmente exposta facilitando a sua clivagem, apenas confirmando a nossa hipótese da rondonina ser um provável fragmento C-terminal da hemocianina.

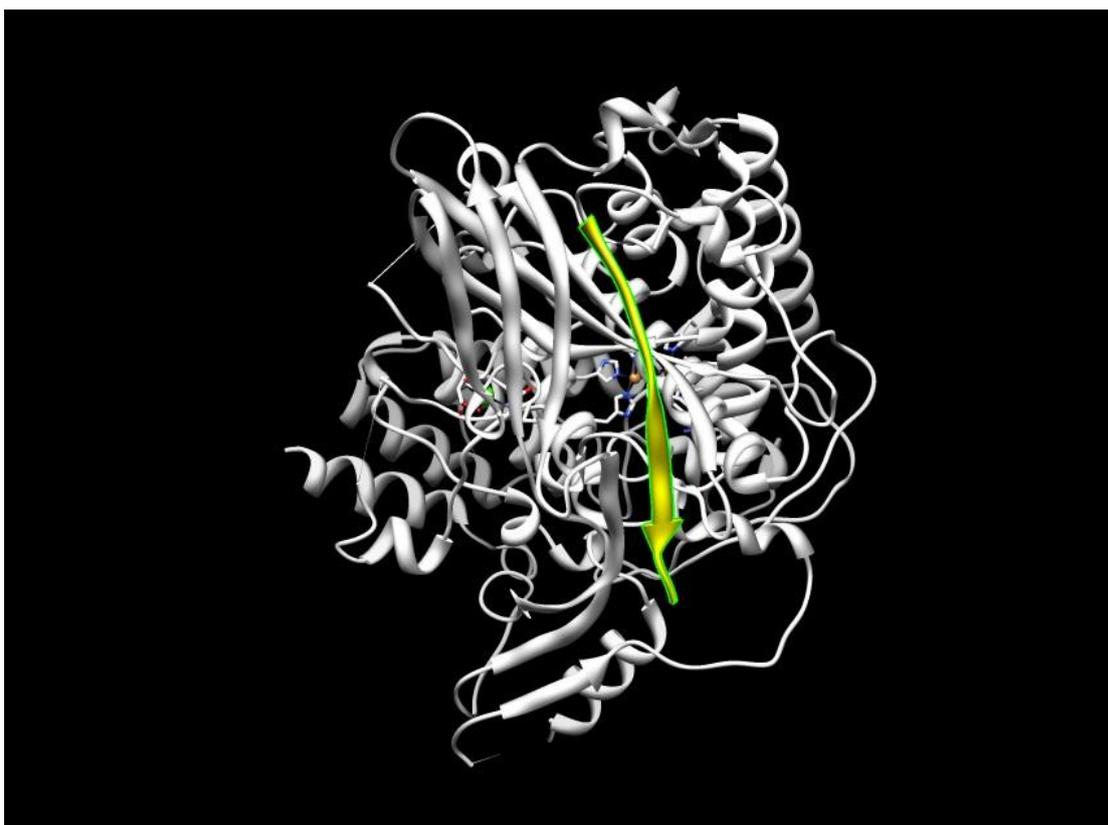


Figura 32 – Estrutura Tridimensional da subunidade II do artrópode *Limulus polyphemus*. A região em destaque corresponde a porção C-terminal da subunidade (Hazes, et al, 1993)

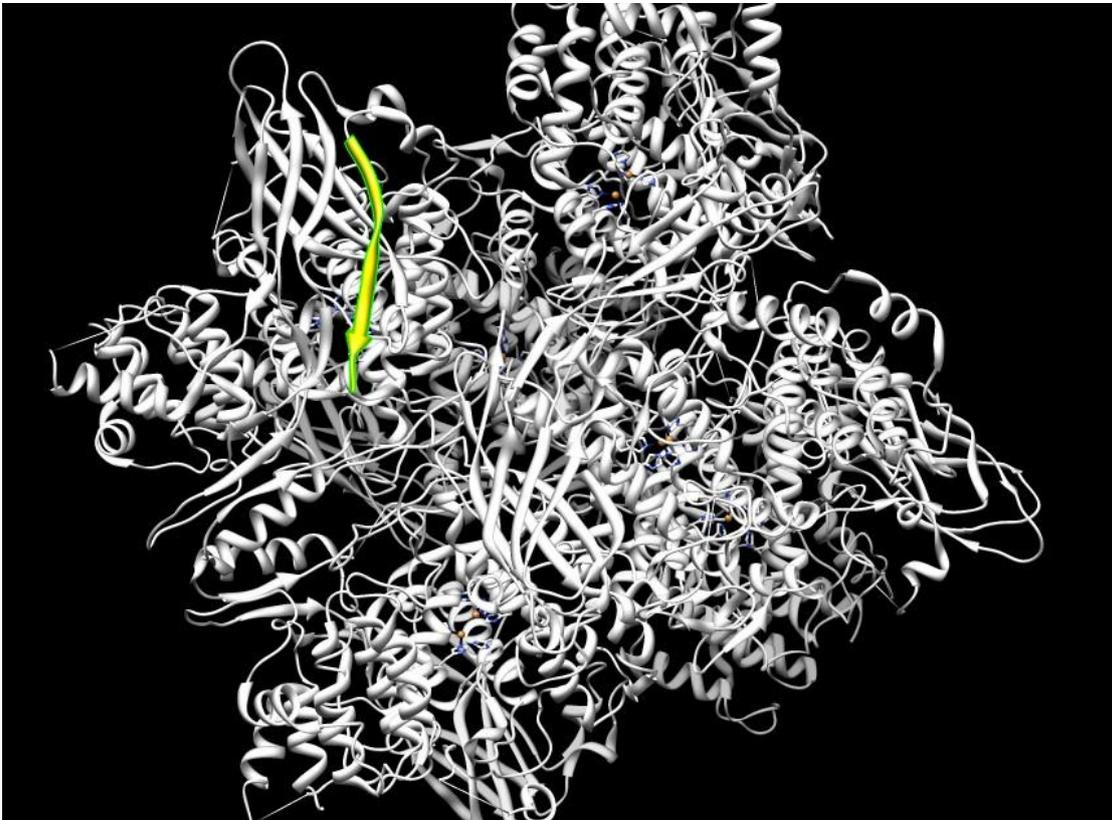


Figura 33 – Estrutura Tridimensional do hexâmero do crustáceo *Panulirus interruptus*. A região em destaque corresponde a porção C-terminal da subunidade “d” (Volbeda e Hol, 1989).

Após a obtenção da seqüência, este peptídeo pode ser sintetizado e sua atividade mais amplamente avaliada. A concentração mínima inibitória foi definida através de um teste de inibição de crescimento em meio líquido como já dito anteriormente (Materiais e Métodos – item III – 3.3.2) e variou de acordo com o microorganismo testado como mostra a tabela 3 abaixo.

Tabela 3– Espectro de Atividade Antimicrobiana do sintético rondonina comparado a gomesina. A concentração inibitória mínima (CIM) do peptide sintético foi determinado pelo teste de inibição de crescimento em meio líquido. A menor concentração que causa 100% da inibição do crescimento foi anotada. A maior concentração testada foi 67 μM . ND, atividade não detectada na faixa de concentração testada, NA, atividade não avaliada.

Microorganismos	Concentração Mínima Inibitória	
	Rondonina (μM)	Gomesina(μM)
Bactéria Gram positiva		
<i>Micrococcus luteus</i> A270	ND	0.4 - 0.8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	ND	0.2 - 0.9
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	ND	NA
Bactéria Gram negativa		
<i>Escherichia coli</i> SBS363	ND	0.4 - 0.8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ND	0.2 - 0.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (Strain Boston 41501)	ND	NA
Fungos Filamentosos		
<i>Beauveria bassiana</i>	ND	NA
<i>Trichosporon</i> sp IOC 4569	1.1 - 2.1	0.6 - 1.2
Leveduras		
<i>Candida albicans</i> MDM8	16.75 - 33.5	0.15 - 0.3
<i>Candida krusei</i> IOC 4559	16.75 - 33.5	5.0 - 10.0
<i>Candida glabrata</i> IOC 4565	8.37 - 16.5	>10,0
<i>Candida albicans</i> IOC 4558	8.37 - 16.5	5.0 - 10.0
<i>Candida parapsilosis</i> IOC 4564	16.75 - 33.5	2.5 - 5.0
<i>Candida tropicalis</i> IOC 4560	8.75 - 16.5	0.6 - 0.3
<i>Candida guilliermondii</i> IOC 4557	16.75 - 33.5	5.0 - 2.5

Para testar sua atividade hemolítica, eritrócitos humanos foram incubados em solução salina fosfato-tamponada (PBS) na presença de diferentes concentrações de rondonina sintética, variando de 0,1 μM – 67 μM . Nestas concentrações testadas o peptídeo não apresentou atividade hemolítica quando comparada ao 0,05% Triton X100 (Fig 34).

Outro peptídeo derivado de proteínas carregadoras de oxigênio, gerado por proteólise da cadeia α da hemoglobina bovina, referente ao fragmento α 1-23, testado nas concentrações de 0,671 – 3,355 mM, onde o maior valor corresponde a 5x MCI, apresentou hemólise em concentrações acima de 2

mM que corresponde a 3x o valor da MCI, porém este valor é muito alto para concentrações de peptídeos (Froidevaux et al 2001).

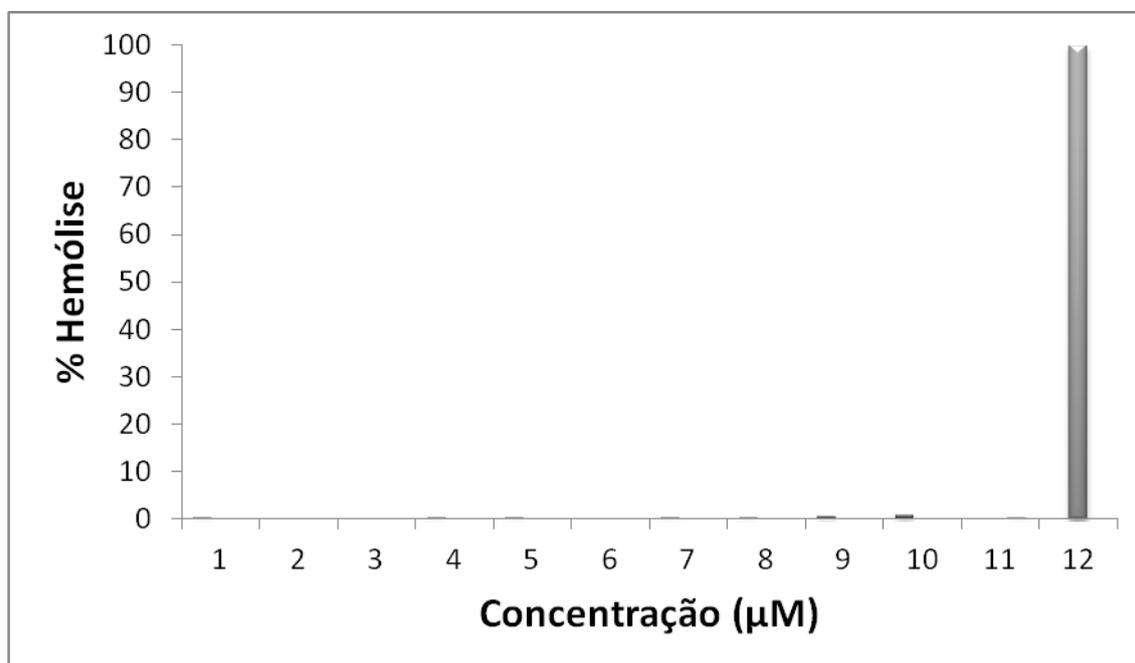


Figura 34 – Atividade da Rondonina sobre eritrócitos humanos. Rondonina foi incubada com eritrócitos humanos (1-10: em concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,1; 4,2; 8,4; 16,8; 33,5 e 67µM por 3 horas a 37 °C. O percentual de hemólise foi expresso em relação a um controle de 0% de hemólise com PBS (11) e 100% de lise (12: eritrócitos incubados com 0,05% Triton X-100).

Para avaliar a atividade antifúngica do peptídeo P2, uma solução de rondonina sintética foi adicionada a uma solução em fase exponencial de blastoconídeos da levedura *C. albicans* e alíquotas de 10 µL foram coletadas em diferentes tempos de incubação, contadas em câmara de Neubauer e 30µL plaqueadas em placas de Petri contendo LB Ágar (1,5%) por 18 horas a 30 °C. Como mostra o gráfico construído a partir do número de blastoconídeos presentes na cultura (Fig 35) após 10 minutos estes ainda estavam presentes na cultura, porém na mesma concentração inicial. A solução de rondonina sintética (67 µM, linha roxa) quando comparado ao controle (linha rosa) mostrou-se linear e avaliando as placas de petri, nenhuma UFC (unidade formadora de colônia) foi detectada após 10 minutos. Estudos com antifúngicos convencionais, como fluconazol, anfotericina B e LY303366, testados por Klepser et al (1998), nos mostra que a rondonina pode ser um novo agente antifúngico.

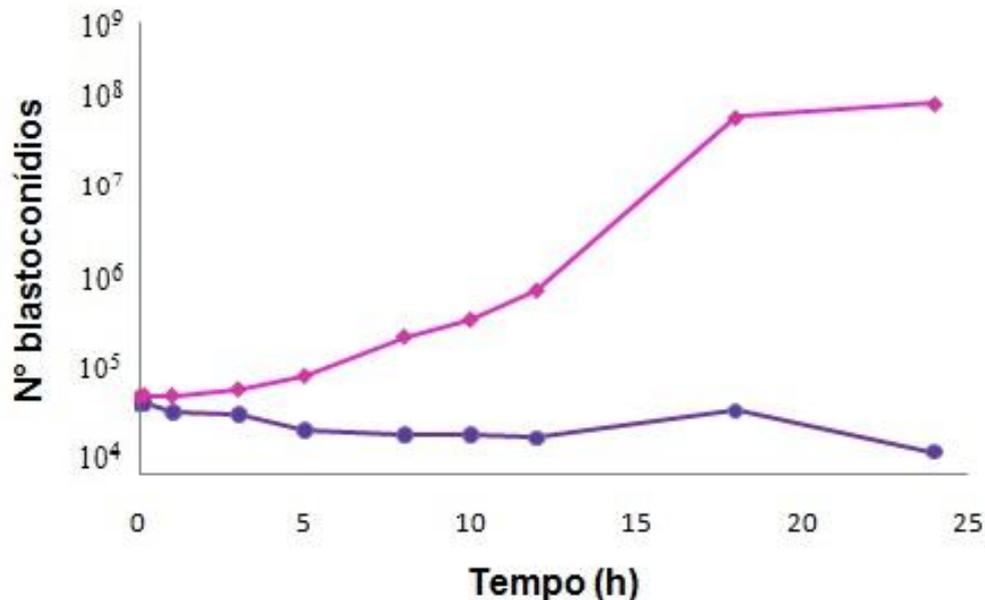


Figura 35 – Inibição de crescimento de *Candida albicans* MDM8 por rondonina. Rondonina sintética 2x MCI (linha roxa), água como controle (linha rosa).

Portanto, considerando os estudos sobre o sistema imune dos invertebrados, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune dos aracnídeos é fragmentário. A expectativa de vida de muitos invertebrados é tão longa quanto à dos vertebrados, a despeito do contínuo desafio de patógenos. Todos os animais pluricelulares estão sujeitos ao freqüente desafio microbiano e ao ataque de endo ou ectoparasitas. Ao lado das defesas contra predadores, a sobrevivência depende, além de outros fatores, da presença de um sistema de defesa imune eficiente, onde o organismo patogênico deve ser rapidamente eliminado ou inativado. O estudo do sistema imune das aranhas caranguejeiras é particularmente interessante, pois são invertebrados que além de apresentarem uma expectativa de vida que pode atingir mais de 20 anos (Foelix, 1996), são animais muito antigos filogeneticamente, existindo registros fósseis que datam do período Devoniano (400 milhões de anos atrás) (Shear *et al.*, 1989; Selden *et al.*, 1991).

Os nossos resultados apontaram para um provável processamento da hemocianina com a produção de um peptídeo antimicrobiano, semelhante ao observado em carrapatos que geram fragmentos de hemoglobina com atividade antimicrobiana a partir do sangue obtido no repasto sanguíneo

(Fogaça et al, 1999; Nakajima et al, 2003) e fragmentos de hemocianina em crustáceos com atividade antimicrobiana (Destoumiex et al, 2001; Lee et al, 2002). Devido aos resultados achamos interessante verificar se a Rondonina, ou o processamento da hemocianina, ocorria em outros Theraphosidae. Para avaliar a presença de rondonina em outros grupos de aranhas, a hemolinfa de *V. wacketi*, *N. coloratovillosus*, *A. gomesiana*, *L. parahybana*, *Grammostola pulchra* e *A. juruensis* foi coletada e o plasma separado e concentrado em uma centrífuga a vácuo (Savant Instrument, Inc) e ressuspenso em água Milli-Q acidificada como descrito anteriormente (Materiais e Métodos, item III-1 e III-2). O sobrenadante, obtido por centrifugação foi aplicado em colunas sep-pak C18 e submetido a três estágios sucessivos de eluição com diferentes concentrações de acetonitrila (5%, 40% e 80%), com o objetivo de pré-purificar o plasma. Somente a fração eluída a 40% foi submetida à cromatografia líquida de alta resolução de fase reversa (CLAE-FR) e avaliada para identificação da rondonina. Todas as frações obtidas foram analisadas quanto à atividade antimicrobiana através de ensaios de inibição em meio líquido utilizando-se *M. luteus*, *E. coli* e *C. albicans* para identificar a fração correspondente e confirmar sua atividade antifúngica.

No plasma de *V. wacketi* (Fig 36) encontramos uma molécula com atividade antimicrobiana contra *C. albicans* que apresentou massa molecular de 1.236,654 Da, e quando submetida à análise por Q-TOF revelou o mesmo padrão de fragmentação de íons da rondonina, podendo ser deduzida sua sequência primária pelo sequenciamento “de novo” da molécula (Fig 37).

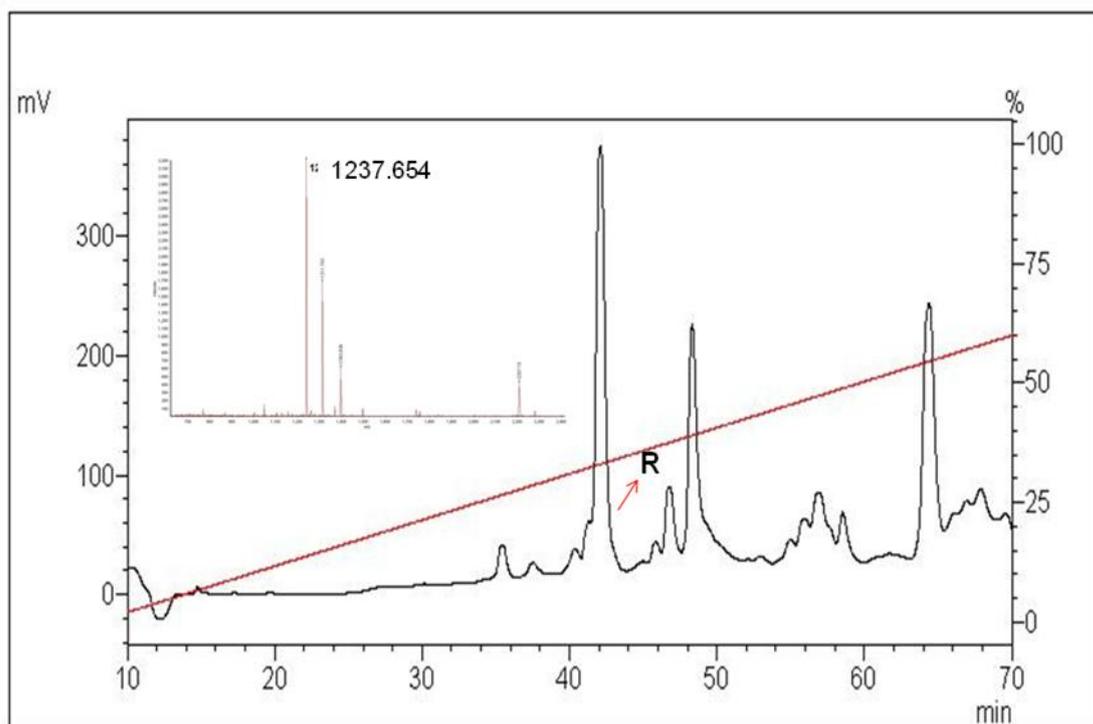


Figura 36 –Fracionamento do plasma de *V. wacketi*. Rondonina purificada do plasma eluída com ACN 40% analisadas numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 2 a 60% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min. Massa molecular de R obtida pela análise em espectrometria de massas MALDI-TOF (“inset”)

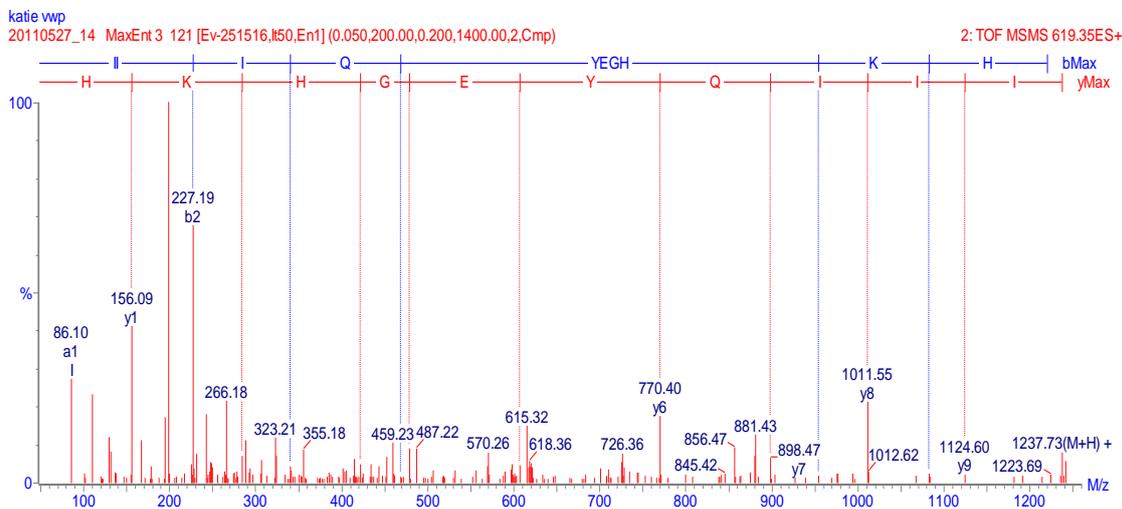


Figura 37 – Sequenciamento “De Novo” da fração R do plasma de *V. wacketi* no Q-TOF Micro™ (Micromass). Os fragmentos mostraram correspondência com as séries b e y. A sequência do peptídeo usando código de uma letra seguindo a orientação da série b e y é mostrado no topo do gráfico. Espectrometria de Massa para sequenciamento “De Novo” para peptídeo foi realizada através de ionização positiva no Q-TOF Micro™ e fonte de íon electrospray.

No plasma de *N. coloratovillosus* (Fig 38) encontramos uma molécula com atividade antimicrobiana contra *C. albicans* que apresentou massa molecular de 1.236,569 Da, e quando submetida à análise por Q-TOF revelou o mesmo padrão de fragmentação de íons da rondonina, podendo ser deduzida sua sequência primária pelo sequenciamento “de novo” da molécula Fig 39).

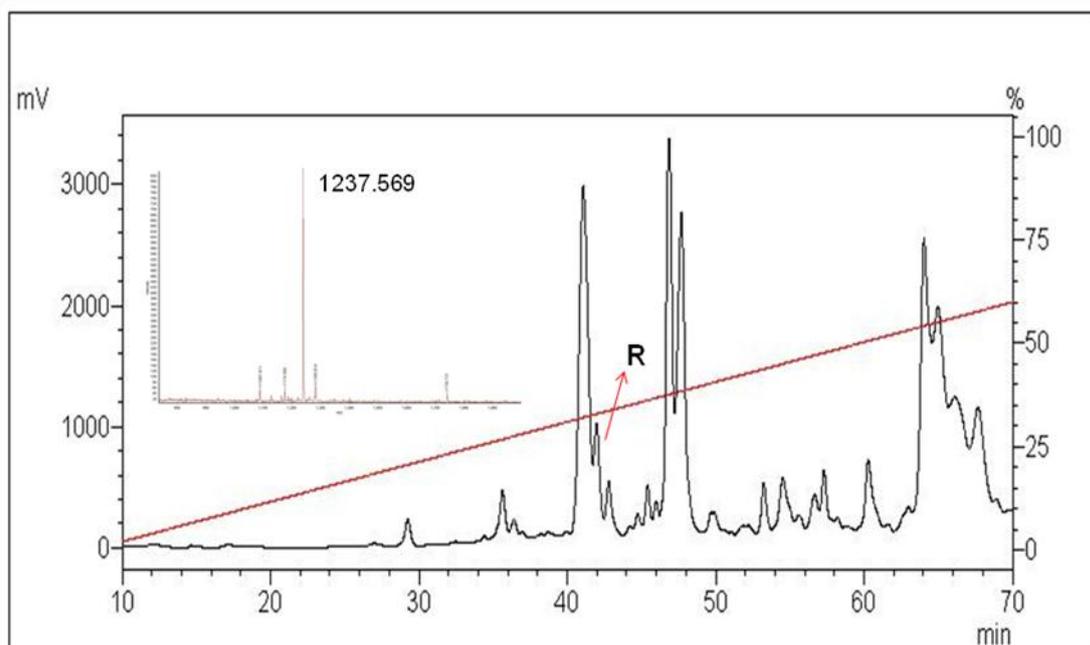


Figura 38 – Fracionamento do plasma de *N. coloratovillosus*. Rondonina purificada do plasma eluída com ACN 40% analisadas numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 2 a 60% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min. Massa molecular de R obtida pela análise em espectrometria de massas MALDI-TOF (“inset”)

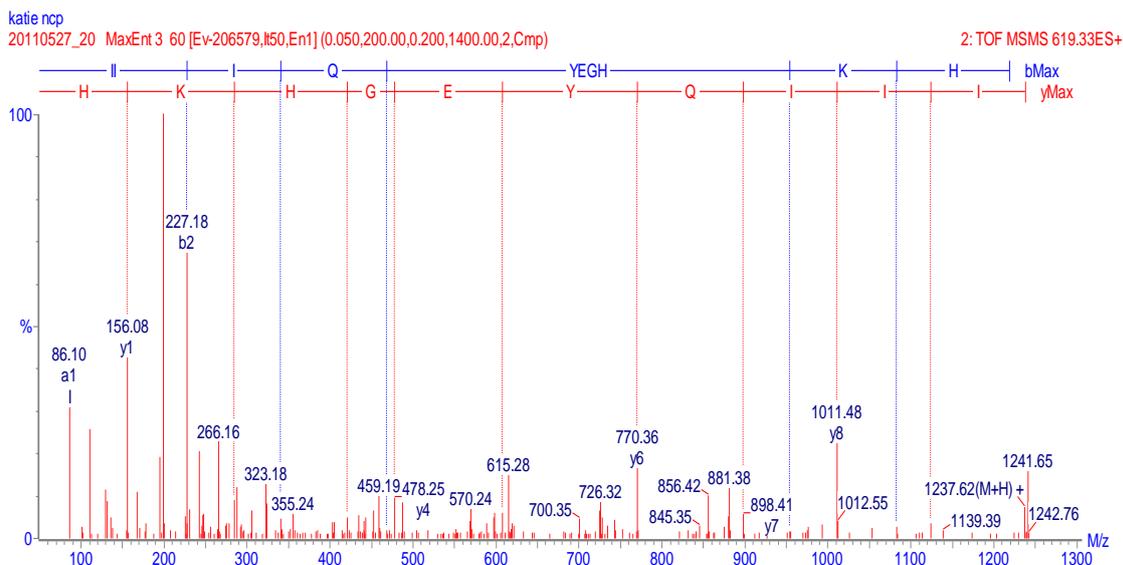


Figura 39 – Sequenciamento “De Novo” da fração R do plasma de *N. coloratovillosus* no Q-TOF Micro™ (Micromass). Os fragmentos mostraram correspondência com as séries b e y. A sequência do peptídeo usando código de uma letra seguindo a orientação da série b e y é mostrado no topo do gráfico. Espectrometria de Massa para sequenciamento “De Novo” para peptídeo foi realizada através de ionização positiva no Q-TOF Micro™ e fonte de íon electrospray.

No plasma de *A. gomesiana* (Fig 40) encontramos uma molécula com atividade antimicrobiana contra *C. albicans* que apresentou massa molecular de 1.236,569 Da, e quando submetida à análise por Q-TOF revelou o mesmo padrão de fragmentação de íons, podendo ser deduzida sua sequência primária pelo sequenciamento “de novo” da molécula (Fig 41).

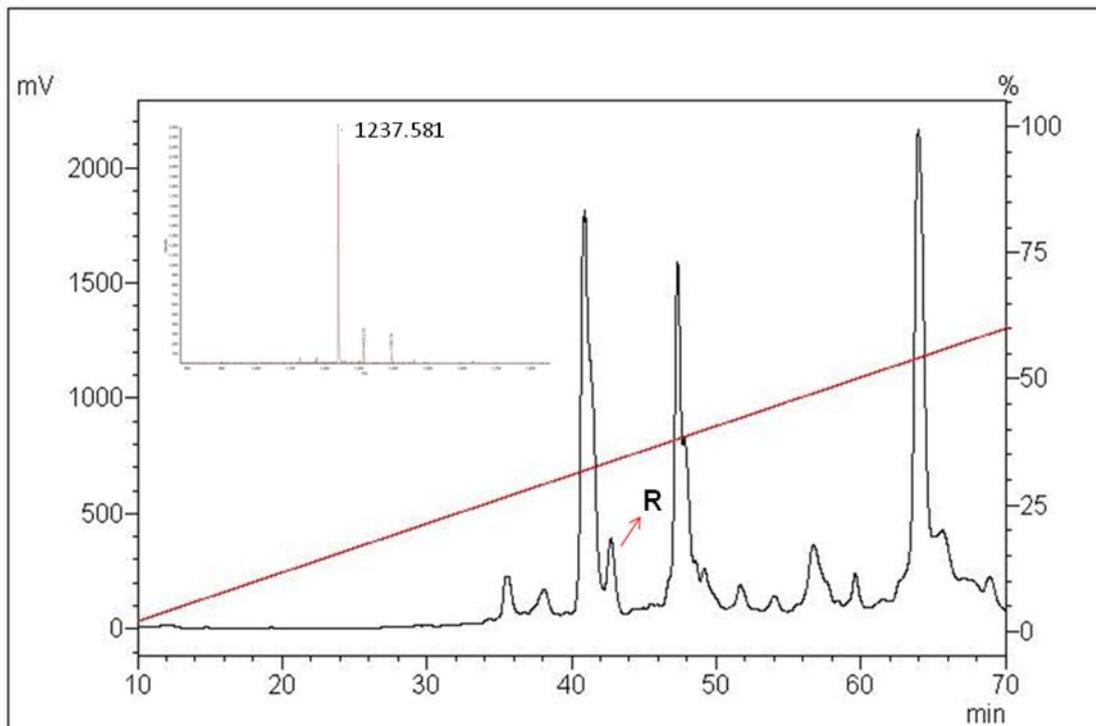


Figura 40 – Fracionamento do plasma de *A. gomesiana*. Rondonina purificada do plasma eluída com ACN 40% analisadas numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 2 a 60% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min. Massa molecular de R obtida pela análise em espectrometria de massas MALDI-TOF (“inset”)

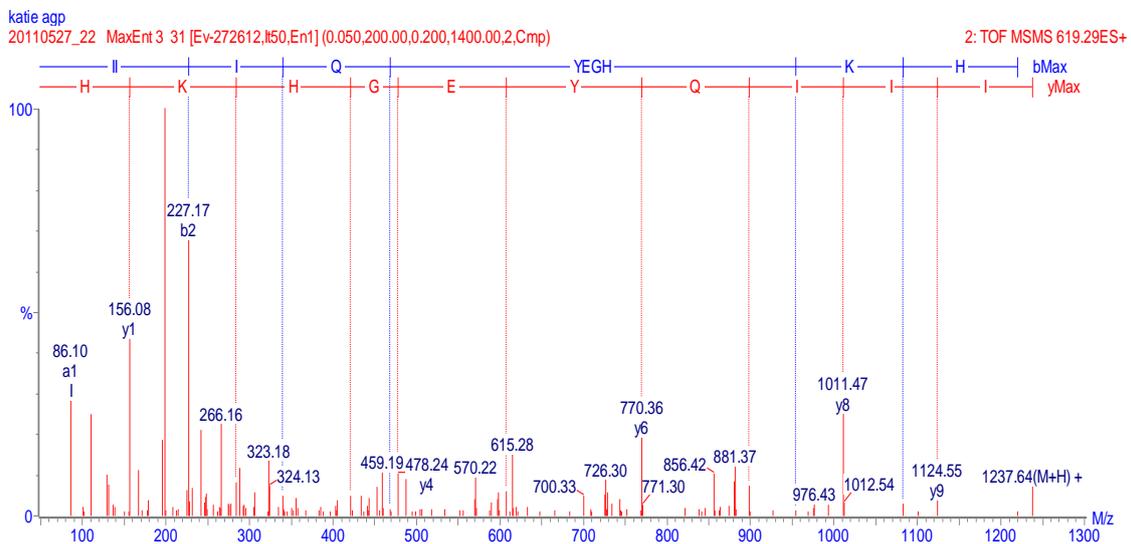


Figura 41 – Sequenciamento “De Novo” da fração R do plasma de *A. gomesiana* no Q-TOF Micro™ (Micromass). Os fragmentos mostraram correspondência com as séries b e y. A sequência do peptídeo usando código de uma letra seguindo a orientação da série b e y é mostrado no topo do gráfico. Espectrometria de Massa para sequenciamento “De Novo” para peptídeo foi realizada através de ionização positiva no Q-TOF Micro™ e fonte de íon electrospray.

No plasma de *L. parahybana* (Fig 42) encontramos uma molécula com atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, que apresentou massa molecular de 1.236,581 Da, e quando submetida à análise por Q-TOF revelou o mesmo padrão de fragmentação de íons da rondonina, podendo ser deduzida sua sequência primária pelo sequenciamento “de novo” da molécula (Fig 43).

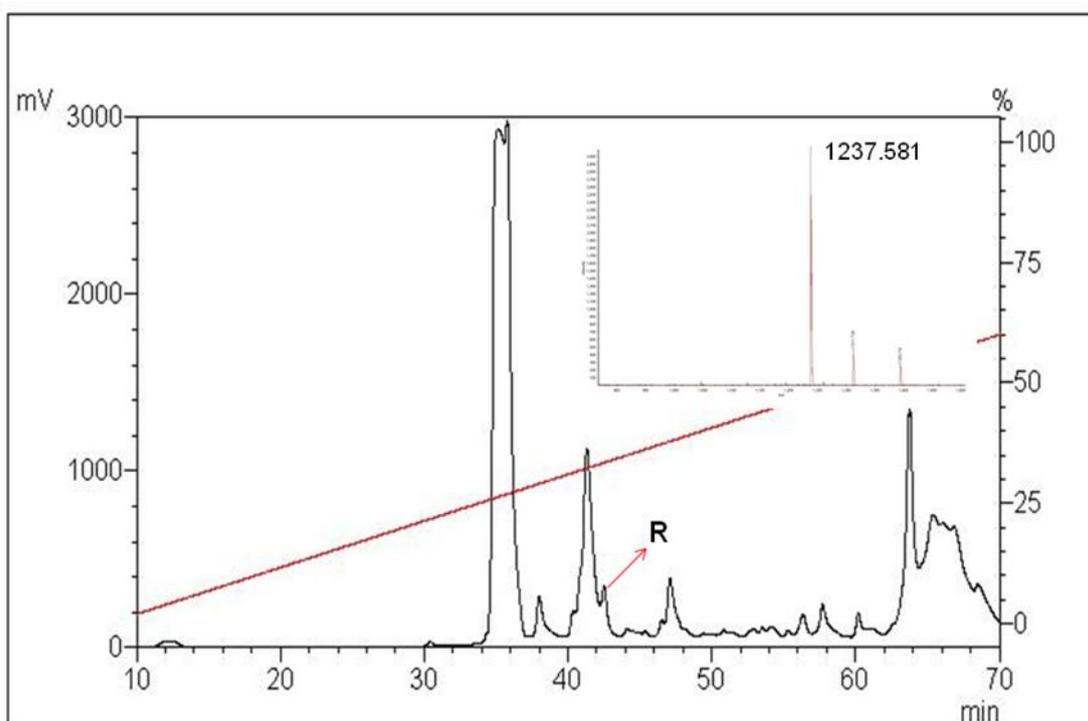


Figura 42 – Fracionamento do plasma de *L. parahybana*. Rondonina purificada do plasma eluída com ACN 40% analisadas numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 2 a 60% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min. Massa molecular de R obtida pela análise em espectrometria de massas MALDI-TOF (“inset”)

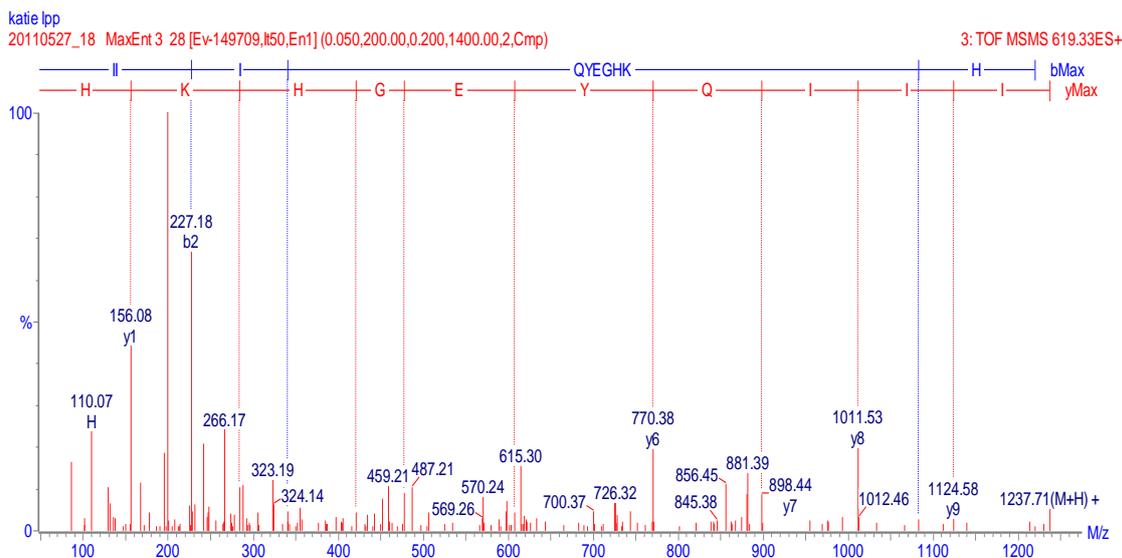


Figura 43– Sequenciamento “De Novo” da fração R do plasma de *L. parahybana* no Q-TOF Micro™ (Micromass). Os fragmentos mostraram correspondência com as séries b e y. A sequência do peptídeo usando código de uma letra seguindo a orientação da série b e y é mostrado no topo do gráfico. Espectrometria de Massa para sequenciamento “De Novo” para peptídeo foi realizada através de ionização positiva no Q-TOF Micro™ e fonte de íon electrospray.

Isso nos mostra que a hemocianina nesses grupos pode ter sido conservada ao longo da evolução, uma vez que a hemocianina nos artrópodes são muito conservadas. Já no plasma de *G. pulchra* (Fig 44) e *A. juruensis* (Fig 45) não foi encontrado o peptídeo buscado, o que pode ser explicado pelo fato de *A. juruensis* pertencer à subfamília Aviculariinae (West et al, 2008) (Fig 46) e *G. pulchra* apesar de pertencer à subfamília Theraphosinae, está localizada numa posição mais basal na árvore filogenética (Pérez-Miles, 1996) (Fig 47), mais não podemos descartar a hipótese de outros fragmentos de hemocianina que não foram identificados estarem presente nesses grupos participando da resposta imune inata.

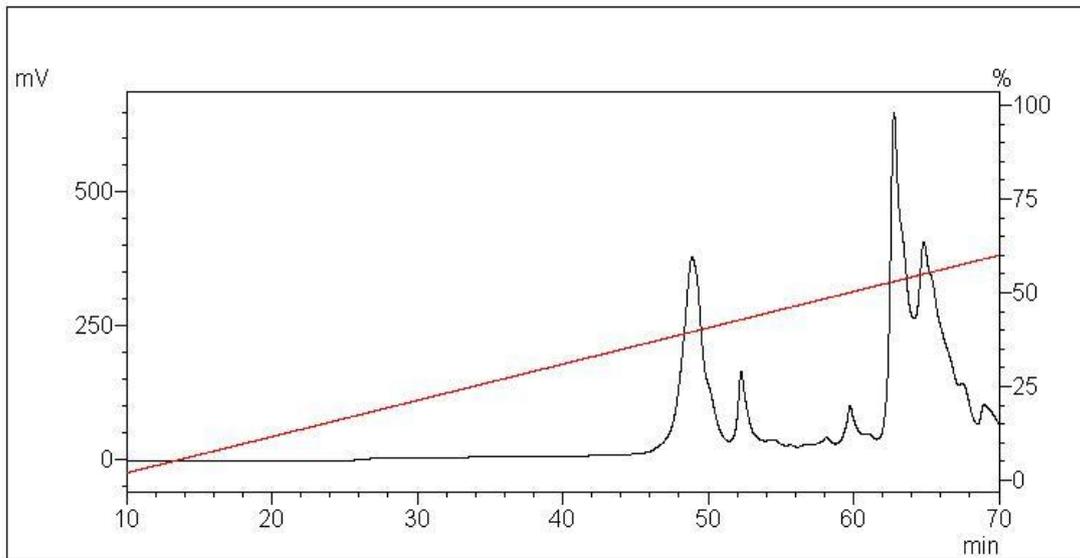


Figura 44 – Fracionamento do plasma de *G. pulchra*. Perfil cromatográfico do plasma eluído com ACN 40% analisado numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 2 a 60% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min.

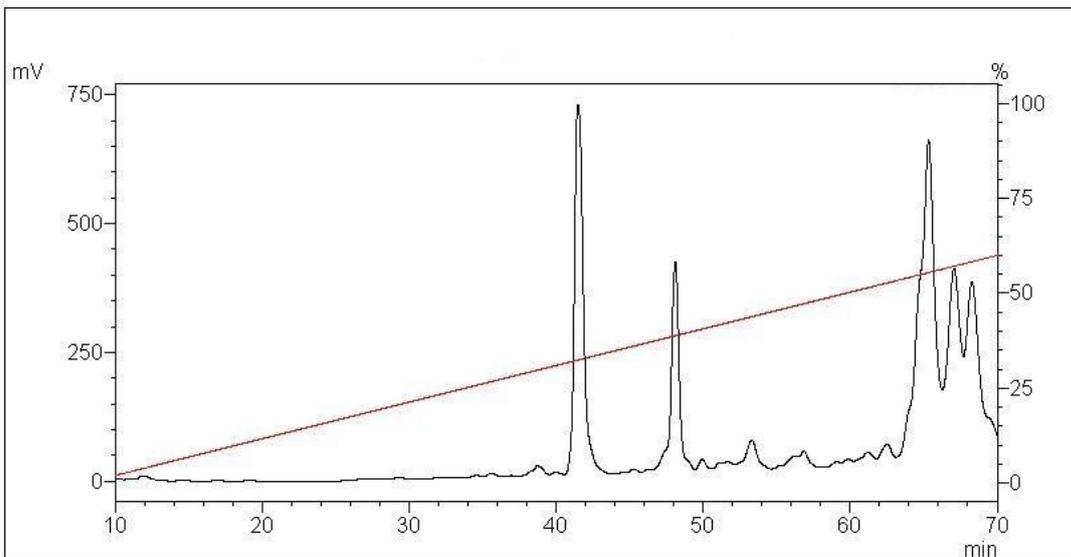


Figura 45 – Fracionamento do plasma de *A. juruensis*. Perfil cromatográfico do plasma eluído com ACN 40% analisado numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 2 a 60% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min.

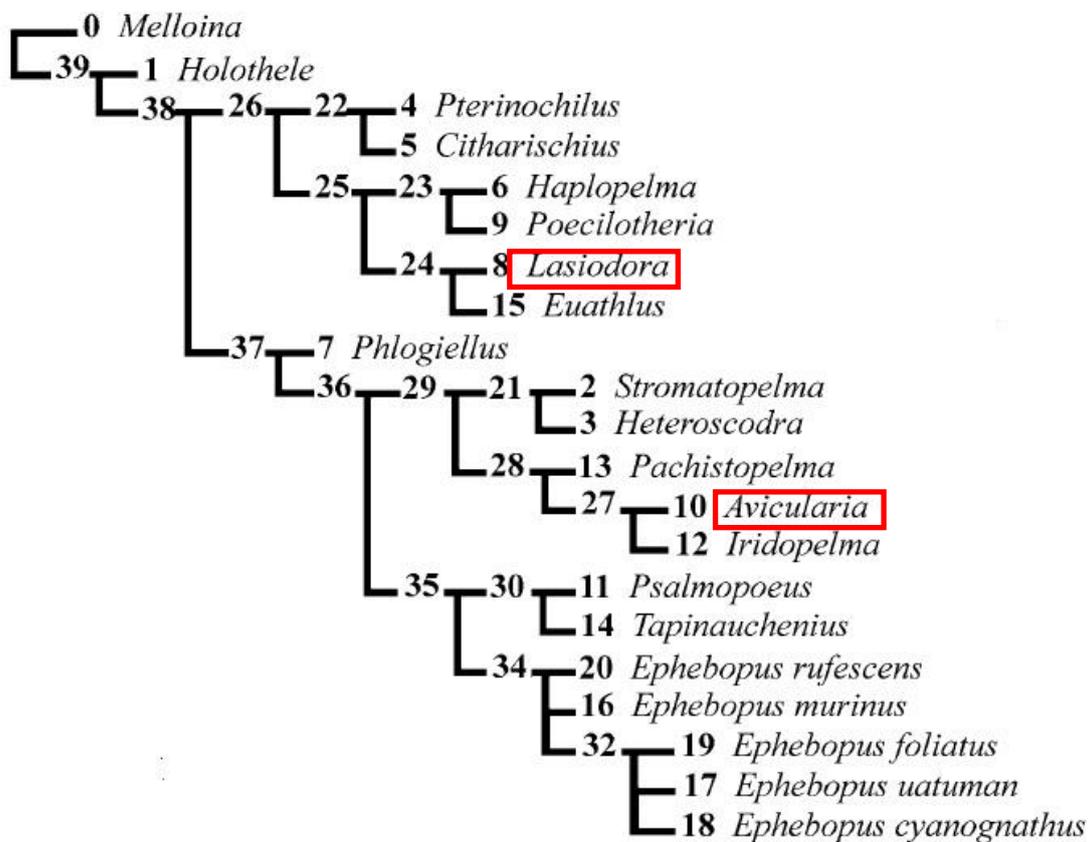


Figura 46 - Árvore simples de Theraphosidae obtida com X-Pee-Wee, “fit 3284.0, 117 passos (West et al, 2008).



Figura 47- Árvore filogenética dos gêneros de Theraphosinae (Pérez-Miles, 1996).

Baseado nos cladogramas já existentes (Pérez-Miles, 1996; West et al, 2008), uma vez que não existe um proposto para todos os táxons envolvidos no estudo, foi elaborado um modelo para mostrar a posição que a rondonina se encaixa nesses grupos (Fig 48). Deste modo podemos supor que a rondonina é um provável carácter da subfamília Theraphosinae somente existindo nos grupos mais derivados.

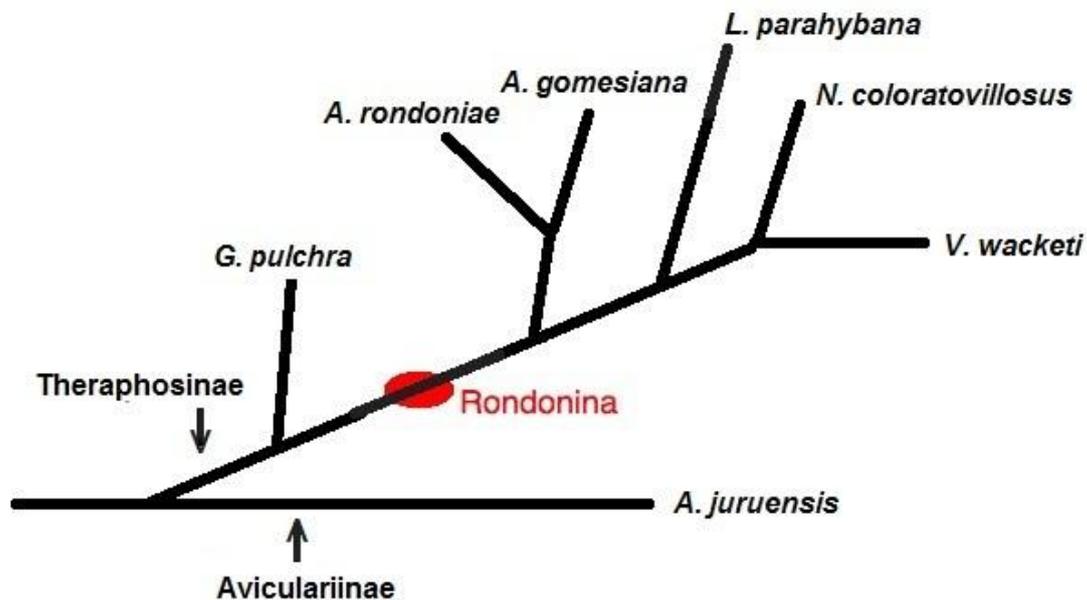


Figura 48 – Rondonina como provável carácter em um grupo de aranhas da subfamília Theraphosinae (adaptado de Pérez-Miles, 1996, West et al, 2008).

V – Conclusão

Neste trabalho mostramos pela primeira vez em aracnídeos, um peptídeo antimicrobiano (Rondonina) que provavelmente é processado a partir da hemocianina, como observado em *Pacifastacus leniusculus* (crustáceo) por Lee e colaboradores (2002). Astacidina 1, o peptídeo encontrado no plasma do crustáceo é processado por uma proteinase cisteína-like, originando um fragmento que consiste em numa sequência de 16 resíduos de aminoácidos (FKVQNQHGVVVKIFHH) com massa molecular de 1.945,2 Da e seu C-terminal carboxilado.

Rondonina é um peptídeo produzido constitutivamente, apresenta massa molecular de 1236 Da e teve sua sequência primária determinada em IIIQYEGHKH. Este pequeno peptídeo não apresenta atividade hemolítica e é especificamente ativo contra fungos.

Esta atividade específica contra fungos pode estar relacionada ao período de muda desses animais. Na ecdise o animal fica vulnerável e pode

ser atacado por microorganismos. Um dos microorganismos que mais atacam nesse período são os fungos mumificantes, como *Beauveria bassiana*. O processamento da hemocianina e a liberação desse peptídeo pode ser importante para proteger o animal nessa fase.

Quando comparamos a sequência de aminoácidos da rondonina em bancos de dados de proteínas, o peptídeo mostrou identidade com a porção C-terminal da subunidade “d” da hemocianina da aranha *Eurypelma californicum* e da aranha *A. gomesiana* e 90% de similaridade com a subunidade “f” da hemocianina da aranha *A. gomesiana* diferenciando somente na Leucina encontrada na porção N-terminal do peptídeo ILIQYEGHKKH.

Rondonina também foi encontrada em outros grupos de aranhas da subfamília Theraphosinae: *V. wacketi*, *N. coloratovilosus*, *A. gomesiana* e *L. parahybana*. Em *G. pulchra*, também um Theraphosinae, não encontramos a rondonina provavelmente um caracter que surgiu nos grupos mais derivados. Em *A. juruensis*, subfamília Aviculariinae, também não encontramos o peptídeo. Provavelmente nesses grupos de aranhas outras moléculas com atividade antimicrobiana devem estar presentes e não fomos capazes de detectá-las no plasma.

Para poder avaliar o espectro de atividade desse peptídeo, bem como sua toxicidade procedemos a síntese química da molécula. A atividade do peptídeo foi avaliada contra bactérias e fungos. O peptídeo sintético não apresentou atividade contra bactérias até a concentração de 67 μM . Contra fungos apresentou atividade antimicrobiana numa faixa de 2,1 μM a 33,5 μM . Uma característica interessante foi sua atividade contra isolados clínicos de leveduras promotores de candidíase humana. O peptídeo sintético também não apresentou atividade hemolítica.

Este peptídeo em função do seu tamanho pequeno, podendo ser eficientemente sintetizado de modo rápido e flexível, além de não apresentar toxicidade às hemácias humanas e seu tempo de ação ser rápido comparado aos antifúngicos do mercado pode representar uma nova estratégia no desenvolvimento biotecnológico neutralizando ou inibindo patógenos sem induzir resistência.

Nos hemócitos de *Acanthoscurria rondoniae* encontramos três moléculas com atividade antimicrobiana. A primeira com atividade contra bactérias *E. coli* e *M. luteus* (Gram negativa e Gram positiva respectivamente) e a levedura *C. albicans*, com massa molecular de 2270,3 Da que foi obtida a partir da deconvolução do seu espectro de íons que é muito semelhante ao da gomesina, um peptídeo de massa molecular 2270,4 Da isolado dos hemócitos de *A. gomesina*, foi por isso denominada gomesina-like. A segunda molécula, com atividade contra a bactéria Gram negativa *E. coli* e a levedura *C. albicans*, quando analisada por ESI-MS mostrou uma massa molecular de 10.111,8 Da e apresentou em seu espectro os íons semelhantes ao encontrando para uma das Acanthoscurrinas (10.111 Da) o que pode ser indicativo de uma isoforma, e foi nomeada acanthoscurrina-like. A terceira molécula, com massa molecular de 417 Da, não é um peptídeo, mas sim uma poliamina com atividade somente contra bactérias Gram negativas e com atividade inibida por catalase. Sua massa foi determinada por LC-MS, sendo exatamente como a da migalina, uma acilpoliamina encontrada nos hemócitos da aranha *A. gomesiana*, também com atividade somente contra bactérias Gram negativas. A atividade antibacteriana da migalina é também inibida por catalase. Os peptídeos antimicrobianos gomesina-like e acanthoscurrina-like precisam ainda ter suas sequências primárias totalmente desvendadas para confirmarmos as semelhanças e diferenças com os peptídeos antimicrobianos de *Acanthoscurria gomesiana*.

Estes resultados, presença de moléculas antimicrobianas muito semelhantes, podem nos mostrar que ao longo da evolução, as aranhas não sofreram muitas mudanças no seu sistema imunológico, o que pode indicar o seu sucesso em habitar qualquer tipo de ambiente terrestre.

VI – Referências Bibliográficas

Andersson, K. e Steiner, H. Structure and properties of protein P4, the major bacteria-inducible protein in pupae of *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem.* 19987; 17: 133-140.

Andreu, D. e Rivas, L. Animal Antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, 1998; 47(6): 415-433.

Assunção, N.A. Desenvolvimento de instrumentação e ferramentas bioanalíticas aplicadas a análises proteômicas. 2005. [tese] Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Atherton e Sheppard. *Solid Phase Peptide Synthesis – a practical approach*. Oxford: IRL Press; 1989.

Autelitano, D.J; Rajic, A.; Smith, A.I.; Berndt, M.C, Ilag, L.L., Vadas, M. The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivity. *Drug. Discov. Today*, 2006; 11:306-314.

Baumann, T.; Kämpfer, U.; Schürch, S.; Schaller, J.; Largiadèr, C.; Nentwig, W. and Kuhn-Nentwig, L. Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 2010, 67(16):2787-98.

Barraviera, B. *Venenos animais - uma visão integrada*. Rio de Janeiro: EPUC, 1994.

Bachère, E. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 2000; 191: 3-11.

Bachère, E.; Gueguen, Y.; Gonzalez, M.; de Lorgeril, J.; Garnier, J.; Romestand, B. (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine

invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunological Reviews, 2004; 198:149-170.

Bertani, R. Revision, cladistic analysis, and zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*, with notes on other theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae). Arquivos de Zoologia, 2001; 36: 265-356.

Boman, H.G. Peptides antibiotics and their role in innate immunity. Annu. Rev. Immunol. 1995; 13:61-92.

Boman, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. Journal of Internal Medicine, 2003; 254:197-215.

Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore former or metabolic inhibitors in bacteria? Nat. Rev. Microbiol. 2005; 3(3):238-250.

Brokaert, W.F.; Terras, F.R.G; Cammue, B.P.A e Osborn, R.W. Plant defensin: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiology, 1995; 108: 1353-1358.

Brown, K. L., Hancock, R. E. W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. Current Opinion in Immunology, 2006; 18:24-30.

Bulet, P; Hetru, C. Dinarcq, J e Hoffmann, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Developmental Comparative Immunology. 1999; 23(4-5): 329-344.

Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunological Reviews, 2004; 198:169-184.

Bulet, P., Stocklin, R. Insect antimicrobial peptide: structures, properties and gene regulation. Protein Pept. Lett. 2005; 12 (1): 3-11.

Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 2004. 198: 116-126

Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 2008. 29: 263-271.

Cociancich, S.; Goyffon, M.; Bontems, F.; Bulet, P.; Bouet, F.; Menez, A. and Hoffmann, J.A. Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;194: 17–22.

Coddigton, J.A., and Levi, H.W. .Systematic and evolution of spiders (Araneae).*Ann.Rev.Ecol.Syst.* 1991. 22:565-592

Conde, R.; Zamudio, F.Z.; Rodriguez, M.H. and Possani, L.D. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett* 2000; 471:165–8.

Cornelia L, Susann B, Cornelia H. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *J Chromatogr B*, 2003; 791:345–356

Corzo, G.; Villegas, m E.; Gomez-Lagunas, F.; Possani, L.D.; Belokoneva, O.S. and Nakajima, T. Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *J Biol Chem.* 2002; 277:23627–37.

Cuff, M.E., Miller, K.I., van Holde, K.E. & Hendrickson, W.A. Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. 1998. *J.Mol. Biol.* 278: 855-870.

Daffre, S. e Faye, Y . Lipopolysaccharide interaction with hemolin, an insect member of the Ig – Superfamily. FEBS Lett., 1997; 408: 127 -130.

Decker, H, & Rimke, T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. J. Biol. Chem. 1998. 273: 25889-25892

Decker, H., Jaenicke, E. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. 2004. Dev. Comp. Immunol. 28:673-687.

Destoumieux D, Bulet P, Loew D, Van Dorsselaer A, Rodriguez J, Bache`re E. Penaeidins: A new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). J Biol Chem 1997; 272: 28398–28406.

Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, Bache`re E. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C -terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. J Biol Chem. 2001; 276:47070–47077.

Eggimann, P.; Garbino, J.; Pittet, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically non-immunosupressed patients. The Lance Infections Diseases. 2003; 3:685-702.

Ehret-Sabatier L, et al. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. J Biol Chem, 1996; 271:29537–29544.

Faye, I e Hultmark, D. The insect immune proteins regulation of their genes. In: Beckage NE, Thompson SN, Federici BA (eds) Parasites and pathogens of insects, , 1993, vol.2, Pathogens. Academic Press, San Diego, pp25-53.

Finlay, B.B.; Hancock, R.E. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? Nat. Rev. Microbiol. 2004; 2, 497-504.

Fisher, F & Cook, N.B. Leveduras e organismos leveduriformes. In: Fisher,F; Cook, N.B. Micologia: fundamentos e diagnostico. Rio de Janeiro. Revinter. 2000; 193-226.

Foelix, R. F. Biology of Spiders. Harvard University Press, Cambridge, Massachussetts/London, 1996; 305pp.

Fogaça, A.C.; Silva Jr, P.I.; Miranda, M.T.M.; Bianchi, A.G.; Miranda, A.; Ribolla, P.E.M.; Daffre, S. Antimicrobial Activity of a Bovine Hemoglobin Fragment in the Tick *Boophilus microplus*. The Journal of Biological Chemistry, 1999; 274 (36):25330-25334.

Fogaça, A.C; Lorenzini, D.M. Kaku, L.M.; Esteves, E. Bulet, P; Daffre, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization, and tissue expression profile. Developmental and Comparative Immunology. 2004; 28:190-200.

Fogaça, A.C.; Almeida, I.C, Eberlin, M.N; Tanaka, A.S.; Bulet, P; Daffre, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. Peptides, 2006; 27(4): 667-674

Franco, O. L., Murad, A. M., Leite, J. R., Mendes, P. A., Prates, M. V., Bloch, C.Jr. Identification of a cowpea -thionin with bactericidal activity. FEBS Journal, 2006; 273, 3489-3497.

Froidevaux, R, Krier, F., Nedjar-Arroume, N. Vercaigne-Marko, D, Kosciarz, E. Ruckebusch C. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. FEBS Letters. 2001; 491:159-163.

Freceer, V., Ho, B., Ding, J. L. *De novo* design of potent antimicrobial peptides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004; 48:3349-3357.

Ganz, T & Lehrer, R.I. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol. Med. Today*, 1999; 5:292-297.

Garcia-olmedo, F.; Molina, A; Alamillo,J.M; Rodríguez-Palenzuela, P. Plant defense peptides. *Biopolymers*, 1998; 47: 479-491.

Garcia-Olmedo, F.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Molina, A; Alamillo J.M.; López-Solanilla, E. Berrocal-Lobo, M. e Poza-Carrión. C. Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett*, 2001; 498: 219-222.

Hammill, P.; Brown, K.; Jenssen, H.; Hancock, R.E. Novel anti-infectives: is host defence the answer? *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2008; 19:628-636.

Hancock, R. E., Brown, K. L., Mookherjee, N. Host defence peptides from invertebrates: emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology*, 2006; 211:315-322.

Hao, G.; Shi, Y. H.; Tang, Y. L.; Le, G. W. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. *Peptides* 2009; 30(8): 1421-1427.

Harris, F.; Dennison, S.R.; Phoenix, D.A. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 2009; 10:585-606.

Hazec, B.; Magnus, K.A.; Bonaventura, C.; Bonaventura, J.; Dauter, Z. Kalk, K.H.; Hol, W.G. Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Sci.* 1993; 2(4): 597-619.

Hoffmann, J.A.; Kafatos, F.C.; Janeway, JR, C.A.; Ezekowitz, R.A.B. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999; 284: 1313-1318.

Hu, J.; Xu, M; Hang,B.;Wang, L.; Wang, Q. Chen, J; Song, T; Fu, D.; Wang, Z.; Wang, S. Liu, X. Isolation and characterization of an antimicrobial peptide from bovine hemoglobin α -subunit. World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. DOI 10.1007/s11274-010-0514-4

Huang, W.S.; Wang, K.J.; Yang, M.Cai, J.J.Li, S.J. and Wang, G.Z. Purification and part characterization of a novel antibacterial protein Scygonadin, isolated from the seminal plasma of mud crab, *Scylla serrata* (Forskål, 1775). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2006, 339(1):37-42

Hube, B. & Naglik, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology. 2001; 147(8): 1997-2005.

Iwanaga S, Kawabata SI. Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. Front Biosci 1998; 3:D973–D984

Johns, R.; Soneshine, D.E.; Hynes, W.L. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick *Dermacentor variabilis*. Biochem Mol Biol. 2001. 31: 857-865.

Kawabata, S; Iwanaga, S. Role of lectins in innate immunity of horseshoe crab. Developmental & Comparative Immunology, 1999; 23: 91-400.

Kopáček, P.; Vogt, R. Jindrák, L; Weise, C; Safarík, I. Purification and characterization of the lysozyme from de gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. Insect Biochem Mol Biol. 1999; 29: 989-997

Khoo L, Robinette DW, Noga EJ. Callinectin, an antibacterial peptide from Blue Crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. Mar Biotechnol 1999; 1:44–51.

Kuhn-Nentwig, L.; Muller, J.; Schaller, J.; Walz, A.; Dathe, M. and Nentwig, W. Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *J Biol Chem.* 2002; 277:11208–16.

Lai, R.; Takeuchi, H.; Lomas, L.O.; Jonczyk, J.; Rigden, D.J.; Rees, H. H.; Turner, P.C. A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. *Faseb J.* 2004; 18(12): 1447-1449.

Lamberty M, et al. Insect immunity. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *J Biol Chem.* 2001; 276:4085–4092.

Lee, S.Y; Lee, B.L. e Söderhäll, K. Processing of an Antibacterial Peptide from Hemocyanin of the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003; 278(10): 7927-7933.

Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11:23–27.

Lorenzini, D.M.; Silva Jr, P.I.; Fogaça, A; Bulet, P. & Daffre, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Developmental and Comparative Immunology.* 2003; 27: 781-791.

Magnus, K.A, Hazes, B, Ton-That, H, Bonaventura, C., Bonaventura, J. & Hol, W.G. Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropoda hemocyanin shows unusual differences. 1994. *Proteins*, 19(4): 302-309.

Mak, P.; Wójcik, K.; Wicherek, L.; Suder, P.; Dubin, A. Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides* 2004; 25:1839–1847

Marques, M.R.F & Barraco, M.A. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*. 2000; 191: 23-44.

Markl J, Markl A, Schartau W, Linzen B.. Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: I (Chelicerata). *J Comp Physiol B* 1979; 130: 283-292

Markl J, Savel A, Decker H, Linzen B.. Hemocyanins in spiders, IX. Homogeneity, subunit composition and the basic oligomeric structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*. 1980; 36: 649-660

Markl J, Decker H, Stöcker W, Savel A, Linzen B, Schutter WG, van Bruggen EFJ.. On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1981; 362: 185-188

Markl, J.. Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol Bull*,1986; 171: 90-115

Marshall, S. H e Arenas G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Journal of Biotechnology*. [periódico online] 2003; 6(2); 271-284. [acesso em 19 de junho 2009]. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue3/full/1>

Matos, B.M.; Komiyama, E.Y; Balducci, I.; Koga-Ito, C. Y. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita*. *Revista de Odontologia da Unesp*. 2009, 38(4): 244-248

Matsuzaki, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999; 1462:1-10.

Melo, M.N; Ferre, R. ;Castanho, M. A. R. B. Antimicrobial peptides linking oartition, activity and high membrane-bound concentration. Nature Reviews Microbiology. 2009; 7:245:250.

Mendonza, H.L; Faye, I. Physiological aspects of immunoglobulin superfamily in invertebrates. Developmental & Comparative Immunology,1999; 23: 359-374.

Menezes, C.H.P. & Neufeld, P.M. Bacteriologia e Micologia: Para o Laboratorio Clinico. Revinter. Rio de Janeiro 2006, 387pp.

Miyata, T.; Tokunaga, F.; Yoneya, T.; Yoshikawa, K.; Iwanaga, S.; Niwa, M.; Takao, T. and Shimonishi, Y. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. J Biochem. 1989;106:663–8.

Mulenga, A.; Khumthong, R; Blandon, M.A. Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma amaericanum* tick Lospins. J.Exp.Biol. 2007; 210(18): 3188-3198.

Nagai, T. & Kawabata, S. A link between blood coagulation and prophenoloxidase activation in arthropod host defense. J. Biol. Chem. 2000. 275: 29264-29267

Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, Tokunaga F, Muta T, Iwanaga S, Niwa M, Takao T, Shimonishi Y. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). J Biol Chem. 1988; 263:16709–13.

Nakajima, Y; A van der Goes van Naters-Yasui, K; Taylor, D.; Yamakawa,M. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). Insect Biochem Mol Biol. 2001; 31:747-751.

Nakajima, Y; A van der Goes van Naters-Yasui, K; Taylor, D.; Yamakawa, M. Antibacterial peptide defensins is involved in midgut immunity of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Mol Biol.* 2002; 11:611-618

Nakajima, Y; Ogihara, K; Taylor, D.; Yamakawa, M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *J. Med. Entomol.* 2003; 40:78-81.

Nelson, D.; Lehninger, A.L.; Cox, M.M. Absorption of light by molecules: The Lambert-Beer Law. In: __. *Principles of Biochemistry.* 3rd. New York, NY: Freeman, W.H, 2000 cap 03:75-115.

Neufeld, P.M. *Manual de Micologia Médica: Técnicas de Básicas de Diagnóstico.* Programa Nacional de Qualidade, 1999; Rio de Janeiro, 1.214pp

Ng, J.H, Ilag, L.L. Cryptic protein fragments as an emerging source of peptide drug. *IDrugs*, 2006; 9:343-6.

Obayashi, T.; Tamura, H.; Tanaka, S.; Ohki, M.; Takahashi, S.; Arai, M; Masuda, M.; Kawai, T. A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombinated *Limulus* coagulation enzymes and its clinical-applications. *Clinica Chimica Acta.* 1985; 149(1): 55-65.

Oerke, E. C. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 2006; 144: 31-43.

Orivel, J.; Redeker, V.; Le Caer, J.P.; Krier, F.; Revol-Junelles, A.M.; Longeon, A.; Chaffotte, A.; Dejean, A. and Rossier, J. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *J Biol Chem.* 2001;276:17823–9.

Pace, C.N; Vadjos, F.; Fee, L.; Grimsley, G. Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*. 1995; 4(11): 2411-2423.

Pelegri, P. B., Franco, O. L. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2005; 37:2239-2253.

Pereira, I.S; Silva Jr, P.I.; Miranda, M.T.M; Almeida, I.C; Naoki, H.; Konno, K. e Daffre, S. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 3(52) : 953 – 959.

Pérez-Miles, F.; Lucas, S.M.; Silva Jr, P.I & Bertani, R. Systematic revision and cladistic analysis of theraphosinae (Araneae: Theraphosidae). *Mygalomorph*. 1996; 1:33-68.

Platinick, N.I & Gertsch, W.J. The Suborders of Spiders: A Cladistic Analysis (Arachnida, Araneae). *American Museum Novitates*. 1976; 10:1-15.

Platnick, N.I. The world spider catalog, version 11.5. American Museum of Natural History, disponível em <http://research.amnh.org/iz> (acessado em agosto de 2011).

Ratcliffe, N.A.; Whitten, M.M.A. Vector Immunity. In: Gillespie, S.H.; L. et al (Ed.). *Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases*. Cambridge: Cambridge University Press. 2005; 240-71.

Raven, R.J. The spider infraorder Mygalomorphae (Araneae): Cladistics and systematics. *Bulletin of American Museum of Natural History*. 1985; 182: 1-180.

Rommens, C.M. e Kishore, G.M. Exploiting the full potencial of disease resistance genes for agricultural use. *Current Opinion Biotechnology*. 2000; 11: 120-125.

Sharon, N. & Lis, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*. 1989; 246:532-539.

Schnapp D, Kemp GD, Smith VJ. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur J Biochem*. 1996; 240:532–539.

Schneider H-J, Markl J, Schartau W, Linzen B.. Subunit heterogeneity of *Eurypelma* (Dugesiella) hemocyanin, and separation of polypeptide chains. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*. 1977; 358: 1133-1141

Selden, P; Shear, W.A. e Bonamo, P.M. A spider and other arachnids from Devonian of New York, and reinterpretations of Devonian Aeneae. *Paleontology*, 1991; 34:241.

Shear, W.A; Palmer, J.M: Coddington, J.A. e Bonamo, P.M. A Devonian spinneret: early evidences of spiders and silk use. *Science*, 1989; 246:479.

Silva, F.D. Mecanismo de ação da microplusina, um peptídeo quelante de cobre com atividade antimicrobiana. [tese] São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 2008.

Silva Jr, P.I. Sistema Imune de Aracnídeos: Estrutura química e atividade de peptídeos antimicrobianos da Hemolinfa de *Acanthoscurria gomesiana*. [tese] São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 2000.

Silva Jr, P.I.; Daffre, S. e Bulet, P. Isolation and Characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich Defense Peptide from the spider *Acanthoscurria*

gomesiana Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family. The Journal of Biological Chemistry. 2000; 275(45): 33464-33470.

Smith, A.M. Baboon Spiders. Tarantulas of Africa and the Middle East. Fitzgerald Publishing. 1990. London. 1: 142pp.

Smith, A.M. Tarantula Spiders: Tarantulas of the U.S.A. and Mexico. Fitzgerald Publishing. 1995. London, 196 pp.

Söderhäll, K. e Smith, V. J. Separation of the hemocyte population of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunol. 1983; 7(2):229-39.

Stone, K.L. e Willians, K.R. Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrylamide gel. In: Walker, J.M.(ed). The protein protocol handbook. Humana Press Inc, Totowa, N.J. 1996; 415 – 421.

Stradling, D. Distribution and Behavioral Ecology of an Arboreal “Tarantula” Spider in Trinidad. Biotropica, 1994; 26(1): 84-97.

Su, X.-D., Gastinel, N. G., Vaughn, D. E., Faye, I., Poon, P. and Björkman, P. J. Crystal structure of hemolin; A horseshoe shape with implication for homophilic adhesion. Science, 1998; 281: 991-995.

Sugita, Y. Differences in spectra of alpha and beta chains of hemoglobin between isolated state and in tetramer. Journal of Biological Chemistry, 1975; 250(4) : 1251-1256.

Sun, S.C; Lindström, I.; Boman, H.G.; Faye, I. & Schmidt, O. Hemolin: An insect – immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. Science, 1990; 250: 1729 -1732.

Suzuki, L.C. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo de terapia fotodinâmica. [tese]. São Paulo. Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares. 2009.

Ratcliffe, N.A.; Whitten, M.M.A. Vector Immunity. In: Gillespie, S.H.; L. et al (Ed.). Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases. Cambridge: Cambridge University Press. 2004; 240-71.

Thomma, B. P. H. J., Penninckx, I. A. M. A., Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. Current Opinion in Immunology, 2001; 13:63-68.

Thorell, T. On European spiders. Nov. Act. reg. Soc. sci. Upsaline. 1870; (3) 7: 109-242.

Torres-Larios, A.; Gurrola, G.B.; Zamudio, F.Z. and Possani, L.D. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. Eur J Biochem. 2000; 267:5023–31.

Tzou, P, et al. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. Immunity. 2000; 13:737–748.

van Holde, K.E. & Miller, K.I. Hemocyanins. Adv. Protein. Chem. 1995; 47: 1-81.

van Holde, K.E, Miller, K.I & Decker, H. Hemocyanins and Invertebrate Evolution. J Biol Chem, 2001; 15563-15566.

Voit, R.; Feldmaier-Fuchs, G.; Schweikardt, T.; Decker, H. e Burmester, T. Complete Sequence of the 24-mer Hemocyanin of the Tarantula *Eurypelma californicum*. The Journal of Biological Chemistry. 2000; 275 (50): 39339-39344.

Volbeda, A & Hol, W.G. Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *J.Mol. Biol.* 1989; 2009(2): 249-279.

Wang, Y., Willott, E. and Kanost, M. R. Organization and expression of the *hemolin* gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta*. *Insect Molecular Biology* 1995; 4: 113-123.

West, R.C.; Marshall, S.D.; Fukushima, C.S.; Bertani, R. review and cladistic analysis of the Neotropical tarantula genus *Euphebopus* Simon 1892 (Araneae: Theraphosidae) with notes on the Aviculariinae. *Zootaxa*. 2008; 1849:35-58.

Wilson, R.; Chen, C. & Ratcliffe, N.A. Innate Immunity in Insects: The role of Multiple, Endogenous Serum Lectins in the Recognition of Foreign Invaders in the Cockroach, *Blaberus discoidales*. *The Journal of Immunology*, 1990; 162: 1590 -1956.

Yan, L. & Adams, M. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis wolf*. *J Biol Chem*. 1998; 273:2059–66.

Zaio, M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J.Mol. Med.*, 2007; 85: 317-329.

Zhang, Z.; Marshall, A.G. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1998; 9(3):225-233.

Zhao, L. and Kanost, M. R. In search of a function for hemolin, a hemolymph protein from the immunoglobulin superfamily. *J. Insect Physiol.* 1996; 42: 73-79.

VII – ANEXOS

Anexo 1 - Comissão de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

São Paulo, 12 de Novembro de 2008.

Dr. Pedro Ismael da Silva Junior
Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada
Instituto Butantan

Referente Projeto: "Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acanthoscurria rondoniae* (Mygalomorphae, Theraphosidae)".

Prezado Pesquisador,

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido, CEUAIB 546/08, é isento de análise por parte desta Comissão, uma vez que faz uso, em sua execução, de animal não vertebrado.

Cordialmente,


Dra. Denise V. Tambourgi
Laboratório de Imunoquímica
Presidente da CEUAIB

Anexo 2 - Manuscrito aceito na revista Results in Immunology

De: Results in Immunology <rinim@elsevier.com>

Data: 22 de março de 2012 15:13

Assunto: Manuscript RINIM-D-12-00003R2: Accepted for publication in Results in Immunology

Para: pisir@usp.br

Manuscript No.: RINIM-D-12-00003R2

Title: RONDONIN AN ANTIFUNGAL PEPTIDE FROM SPIDER (ACANTHOSCURRIA RONDONIAE)
HAEMOLYMPH

Results in Immunology

Dear Dr. da Silva Junior:

I am pleased to inform you that your paper "RONDONIN AN ANTIFUNGAL PEPTIDE FROM SPIDER (ACANTHOSCURRIA RONDONIAE) HAEMOLYMPH" has been accepted for publication in Results in Immunology .

As you know, Results in Immunology is an author-pays, open access journal. Your manuscript will be published online after we receive your publication fee of \$1500 USD. We aim to publish your paper in about 10-15 days. To accomplish this, we will initiate the production process immediately.

Please go to <https://submissionstart.elsevier.com/?journal=RINIM&mns=RINIM-D-12-00003R2> to start the payment process.

If you require special consideration regarding payment, please feel free to contact me directly.

You will receive your proofs in approximately 5 days. Upon return of your proofs and once we have received confirmation that payment has been made, your paper will be published online.

Thank you for your contribution and support for Results in Immunology .

Yours sincerely,
Shanelle Ko, Ph.D.
Managing Editor
Results in Immunology
rinim@elsevier.com

Manuscript Number: RINIM-D-12-00003R2

Title: RONDONIN AN ANTIFUNGAL PEPTIDE FROM SPIDER (ACANTHOSCURRIA RONDONIAE)
HAEMOLYMPH

Article Type: Full Length Article

Keywords: antimicrobial peptide; haemocyanin fragment; rondonin; Acanthoscurria rondoniae; spider

Corresponding Author: Dr. Pedro Ismael da Silva Junior, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Butantan Institute

First Author: Katie Cristina T Riciluca

Order of Authors: Katie Cristina T Riciluca; Raphael Santa Rosa Sayegh; Robson L Melo; Pedro Ismael da Silva Junior, Ph.D.

Abstract: Antimicrobial activities were detected in the haemolymph of the spider *Acanthoscurria rondoniae*. A novel antifungal peptide, rondonin, was purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Rondonin has an amino acid sequence of IIIQYEGHKH and a molecular mass of 1,236.32 Da. This peptide has identity to a C-terminal fragment of the "d" subunit of haemocyanin from the spiders *Eurypelma californicum* and *Acanthoscurria gomesiana*. A synthetic peptide mimicking rondonin had identical characteristics to those of the isolated material, confirming its sequence. The synthetic peptide was active only against fungi. These data led us to conclude that the antifungal activity detected in the plasma of these spiders is the result of enzymatic processing of a protein that delivers oxygen in the haemolymph of many chelicerate. Several studies have suggested that haemocyanins are involved in the arthropod immune system, and the activity of this haemocyanin fragment reinforces this idea.

RONDONIN AN ANTIFUNGAL PEPTIDE FROM SPIDER (*ACANTHOSCURRIA RONDONIAE*) HAEMOLYMPH

Riciluca KCT^{1,2}, Sayegh, RSR¹, Melo, RL¹, Silva Jr PI^{1*}
Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada¹,
Instituto Butantan, 05503-900, São Paulo – SP, Brasil.
Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD - São Paulo, Brazil²

Antimicrobial activities were detected in the haemolymph of the spider *Acanthoscurria rondoniae*. A novel antifungal peptide, rondonin, was purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Rondonin has an amino acid sequence of IIIQYEGHKH and a molecular mass of 1,236.776 Da. This peptide has identity to a C-terminal fragment of the “d” subunit of haemocyanin from the spiders *Eurypelma californicum* and *Acanthoscurria gomesiana*. A synthetic peptide mimicking rondonin had identical characteristics to those of the isolated material, confirming its sequence. The synthetic peptide was active only against fungus. These data led us to conclude that the antifungal activity detected in the plasma of these spiders is the result of enzymatic processing of a protein that delivers oxygen in the haemolymph of many chelicerate. Several studies have suggested that haemocyanins are involved in the arthropod immune system, and the activity of this haemocyanin fragment reinforces this idea.

Keywords: antimicrobial peptide, haemocyanin fragment, rondonin, *Acanthoscurria rondoniae*, spider

1. INTRODUCTION

Invertebrate animals can be found in almost every habitat in the world. Because many invertebrates live in environments in which microorganisms thrive, their widespread distribution and survival are primarily due to successful defences that efficiently recognise and combat potentially harmful microorganisms (Söderhäll and Cerenius, 1998). Invertebrates only possess innate immunity, which is considered to be an ancient defence mechanism (Hoffman *et al.*, 1999).

One characteristic of innate immunity is the production of antimicrobial substances, which are often peptides or polypeptides (Hancock and Diamond, 2000). Several of these antimicrobial peptides (AMPs) have

been recognised as important components of the nonspecific host defence or innate immune system in a variety of organisms and have been isolated and characterised from plants and animals, including insects, molluscs, crustaceans, amphibians, birds, fish, mammals, and humans (Boman, 1991; Hoffman and Hertu, 1992; Boman, 1995; Haeberli *et al.*, 2000). Several antimicrobial peptides were isolated from the venom and haemolymph of venomous arthropods such as scorpions and spiders (Kuhn-Nentwig, 2003). The haemolymph of invertebrates are the main source of antimicrobial peptides (Hetru and Bulet, 1997). The first biochemical study of an antimicrobial peptide in arachnids demonstrated the presence of an antibacterial peptide in the haemolymph of the scorpion species *Leiurus quinquestriatus* (Cociancich *et al* 1993) and *Androctonus australis* (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996). Gomesin was the first antimicrobial peptide isolated from spider blood cells (Silva Jr *et al*, 2000). Other antimicrobial peptides were found in the plasma of shrimp (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001), freshwater crayfish (Lee *et al.*, 2002), the plasma of the tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*, named theraphosinin (Silva Jr, 2000), and crude haemolymph of *Agelena labyrinthica* (Yigit and Benli, 2008). These peptides are typically relatively short, positively charged (cationic), and amphiphilic (Jenssen *et al.*, 2006; Strominger, 2009) and generally interact with the outer membranes of microorganisms due their negative charge (Kamysz *et al.*, 2003). Compared to cationic AMPs, much less is known about how anionic AMPs work (Steffen *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2009; Harris *et al.*, 2009).

While most AMPs are derived from a biologically inactive proprotein that is processed into an active state, some AMPs are derived from larger, functional proteins, such as haemoglobin (Fogaça *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 2004; Mak *et al.*, 2004; Ullal *et al.*, 2008) and haemocyanin (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002). Arthropod haemocyanins are composed of heterogeneous subunits in the 75-kDa range that combine to form either a regular cubic single hexamer (1 x 6) or multiple hexamers (2-8 x 6) depending upon the species and physiological conditions (Markl, 1986). The haemocyanin of the North American tarantula *Eurypelma californicum* is a native 24-mer protein complex consisting of two identical dodecamers with an estimated total molecular mass of approximately 1,800 kDa (Shneider *et al.*, 1977; Markl *et al.*, 1979; Markl *et al.*, 1980; Markl, 1986). Formation of the 24-mer complex requires the aggregation of seven different subunits in a

constant stoichiometric amount with four copies each of the subunits *a*, *d*, *e*, *f*, and *g* and two copies of subunits *b* and *c* (Markl *et al.*, 1981; Markl, 1986). Since antimicrobial peptides have been characterized in haemocytes of *A. gomesiana* and *Acanthoscurria rondoniae* belongs to same genera, we choose this species to look for the presence of these peptides. So, in the present study, we report the first isolation and characterisation of an antifungal fragment of haemocyanin from arachnids.

2 - EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Microorganisms

Fungal and bacterial strains were obtained from various sources. *Escherichia coli* SBS 363 and *Micrococcus luteus* A270 were from the Pasteur Institut, Paris; *Candida albicans* (MDM8) was from the Department of Microbiology from the University of São Paulo, Brazil; and *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Strain Boston 41501), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *S. epidermidis* ATCC 12228 were from the American Type Culture Collection (ATCC). The following human clinical yeast isolates, which can be agents of candidiasis disease, obtained from the Oswaldo Cruz Institute, Brazil, were also used: *Trichosporon* sp IOC 4569, *Candida krusei* IOC 4559, *C. glabrata* IOC 4565, *C. albicans* IOC 4558, *C. parapsilosis* IOC 4564, *C. tropicalis* IOC 4560 and *C. guilliermondii* IOC 4557. The filamentous fungus *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp and *Penicillium expansum* and *Beauveria bassiana*, an entomopathogenic fungus, was isolated from a mummified spider.

2.2 Spider Blood

The spiders (*Acanthoscurria rondoniae*, a tarantula of the Theraphosidae family) were kept alive in the biotherium of the Special Laboratory of Toxinology Applied of the Institute Butantan (São Paulo, Brazil) (Fig. 01). These animals were collected under License Permanent Zoological Material n^o. 11024-3-IBAMA and Special Authorisation for Access to Genetic Patrimony n^o. 001/2008. The haemolymph (approximately 10 mL) from animals of either sex at different stages of development was collected by cardiac puncture with an apyrogenic syringe. To avoid haemocyte degranulation and coagulation, the haemolymph was collected in the

presence of sodium citrate buffer (0.14 M NaCl, 0.1 M glucose, 30 mM trisodium citrate, 26 mM citric acid, 10mM EDTA, pH 4.6 (2:1, v/v) (Söderhall and Smith, 1983). The plasma was separated, and blood cells were removed by centrifugation at 800 x g for 10 min at 4°C.

2.3 Antimicrobial activity assays

During the purification procedure, the antimicrobial activities of samples were monitored by a liquid growth inhibition assay using the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* SBS363, Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* A270 that were cultured in poor broth nutrient medium (PB: 1.0 g peptone in 100 ml of water containing 86 mM NaCl at pH 7.4; 217 mOsM), whereas yeast strain *Candida albicans* MDM8 was cultured in poor dextrose broth (1/2 PDB: 1.2 g potato dextrose in 100 ml of H₂O at pH 5.0; 79 mOsM). Determination of antimicrobial peptide was performed using 5-fold microtiter broth dilution assay in 96-well sterile plates at a final volume of 100µL. Mid-log phase culture were diluted to a final concentration of 1 x10⁵ colony forming units/mL. Dried fractions were dissolved in 200µL of water ultrapure and 20µL applied into each well and added to 80µL of the bacterium/yeast dilution. The fractions were tested in triplicate. The microtiter plates were incubated for 18h at 30°C; growth inhibition was determined by measuring absorbance at 595 nm.

2.4 – Purification of rondonin from plasma

For purification of antimicrobial peptides, the plasma was homogenized and then trifluoroacetic acid was added to a final concentration of 0.05%. The sample was agitated on ice for 30 min and centrifuged at 16,000 xG at 4°C. The acidic supernatant was loaded onto classic Sep-Pak C18 cartridges equilibrated in acidified water (TFA 0.05%). After washing with acidified water, three stepwise elutions were successively performed with 5%, 40% and 80% acetonitrile (ACN/TFA 0.05%). The 40% Sep-Pak fraction was concentrated in a vacuum centrifuge and reconstituted in Milli-Q water (Millipore™) and directly subjected to C18 reverse-phase on a semi-preparative Jupiter C18 column equilibrated at room temperature with 0.05% trifluoroacetic acid in water. The sample was purified using acetonitrile/water/0.05% trifluoroacetic acid gradients of 2-60% acetonitrile in 60 min at a flow rate 1.5 mL/min. Ultraviolet absorbance was monitored at 225nm. The eluted

peaks fractions were collected by hand and were vacuum dried (Speed-Vac Savant) and used for assay of antimicrobial activity and determination of amino acid sequence.

2.5 Rondonin mass analysis by MALDI-TOF and LC/MS

Briefly, 0.35 μL of sample in Milli-Q water was mixed with 0.35 μL of saturated matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid solution deposited onto the sample slide and dried on the bench. The analysis was performed with the spectrometer operating in positive mode, which detects positively charged ions. To determine the amino acid sequence of rondonin, the doubly charged ions were subjected to “de novo” sequencing in a Q-TOF Ultima API (Micromass) spectrometer operating in positive ionisation mode. The spectrum was analysed, and the “y” and “b” fragments were used to elucidate the primary structure of the molecule.

2.6. Peptide Synthesis of Rondonin

Synthetic rondonin was synthesised by solid phase peptide synthesis using the Fmoc procedure (Atherton and Sheppard, 1989). The peptide was purified by reverse phase (Shim-pack Prep-ODS, 5 μm , 20 mm \times 250 mm Shimadzu Co.) semi-preparative HPLC, and the purity and identity of the peptide were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry and analytical HPLC using the conditions described above.

2.7 Minimal inhibitory concentration (MIC) of rondonin

The minimal inhibitory concentration was determined using the synthetic peptide against the Gram-negative bacterial strains, the Gram-positive bacterial strains, the fungal strains and yeast strains, as described above (*experimental procedures 2.1 and 2.3*). The peptide was dissolved in sterile Milli-Q water at a final concentration of 670 μM . Determination of minimal inhibitory concentrations (MICs) for rondonin was performed using a 5-fold microtiter broth dilution assay of stock solution (670 μM) and serial dilution in 96-well sterile plates at a final volume of 100 μL where 20 μL of stock solution was applied into each well at serial dilution 2-fold microtiter broth dilution and added to 80 μL of the bacterium/yeast dilution, Microbial growth was measured by monitoring the increase in OD at 595 nm after incubation at 30°C for 18 h (modified Ehret-

Sabatier *et al.*, 1996). The rondonin was tested in duplicate. The MIC is defined as the minimal concentration of peptide that caused 100% growth inhibitions (Zhu *et al.*, 2007).

2.8. Antifungal assay of rondonin

The antifungal assay was performed using a 5-fold microtiter broth dilution assay and serial dilution in 96-well sterile plates at a final volume of 100 μ L where 20 μ L of stock solution (670 μ M) was applied into each well at serial dilution 2-fold microtiter broth dilution and added to 80 μ L of the yeast dilution. The inhibition growth curve of rondonin was determined by incubating twice the concentration of the MIC (67 μ M) of rondonin with *C. albicans* MDM8 at 30°C for various amounts of time (0, 10 min, 1 h, 3 h, 5 h, 8 h, 10 h, 12 h, 18 h, 24 h) and counting the number of conidia present; the viability of the yeast was verified by incubating the colonies on a nutrient agar plate (1.5%). The rondonin was tested in triplicate.

2.9. Haemolytic assay to determine rondonin toxicity

Human erythrocytes from a healthy donor were collected in 0.15 M citrate buffer, pH 7.4, and washed three times by centrifugation (700 x g, 10 minutes, 4° C) with 0.15 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. After the final centrifugation, the erythrocytes were suspended in PBS, pH 7.4. Aliquots of 50 μ L containing rondonin at concentrations ranging from 0.2 – 134 μ M were added to 50 μ L of a 3% suspension of erythrocytes in the wells of U-shaped bottom plates and incubated for 3 h at 37°C. The supernatant was first collected and haemolysis was determined by measuring the absorbance at 414 nm of each well in a Victor³ (1420 Multilabel Counter/Victor³, Perkin Elmer). The haemolysis percentage was expressed in relation to a 100% lysis control (erythrocytes incubated with 0.1% triton X-100); PBS was used as a negative control. The rondonin was tested in triplicate.

3. RESULTS

3.1. Antimicrobial activity of rondonin measured by liquid growth inhibition

Antimicrobial activity of synthetic rondonin was screened using 3 species of Gram-positive bacteria, 3 species of Gram-negative bacteria, 7 species of yeast and 2 species of fungi. Rondonin was tested against these organisms at concentrations ranging from 0.1 to 67 μM and demonstrated antimicrobial activity against all 7 species of yeast and one species of filamentous fungus (Table 1).

3.2 Purification of rondonin from plasma

The plasma of the spider *A. rondoniae* from the Theraphosidae family was collected (10 mL) and dissolved in acidified Milli-Q water as previously described. The supernatant obtained by centrifugation was applied to a Sep-Pak C18 column and subjected to three successive extractions of increasing concentrations of acetonitrile (5%, 40% and 80% ACN) to pre-purify antimicrobial peptides. The material eluted at 40% ACN was subjected to fractionation by RP-HPLC, which resulted in fractions with antimicrobial activity (Fig. 02). All fractions were analysed in the liquid growth inhibition assay using *M. luteus*, *E. coli*, and *C. albicans*. We found six fractions that showed antimicrobial activity only against *C. albicans*: 2, 3, 7, 11, 12, and 13. Only the fraction 2, named rondonin, was purified to homogeneity.

3.3 Minimal inhibitory concentration

The MIC of synthetic rondonin was tested against Gram-negative bacterial strains, Gram-positive bacterial strains, fungal strains and yeast strains. Synthetic rondonin showed activity against all yeasts tested and one fungus. However, no activity could be detected against Gram-positive and Gram-negative bacteria and the fungus *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp, *Penicillium expansum* and *B. bassiana* strains tested in the range of concentration investigated (above 67 μM). MICs are expressed as the (a)-(b) interval of concentrations where (a) is the highest concentration tested at which the microorganisms are growing and (b) is the lowest concentration that causes 100% growth inhibition. We compare our results with the synthetic gomesin performed by Silva Jr *et al*, 2000 and Yamane, 2010. As shown in Table 1, rondonin could be a specific antifungal activity against yeasts.

3.4 MALDI-TOF and LC/MS analysis

Analysis by mass spectrometry MALDI-TOF revealed a single molecule with a mass of 1,236.776 Da (Fig. 03). Following the methodology of Budnik *et al.*, (2004), “de novo” sequencing (Fig. 04) of this molecule revealed a sequence of 10 amino acids, IIIQYEGHKH (Fig. 05), that showed identity to the C-terminus fragment of the subunit “d” of haemocyanin from the tarantula *Eurypelma californicum* (Theraphosidae) (Voit *et al.*, 2000). Furthermore, when compared to a database of partial genomes, rondonin showed identity with the C-terminus fragment of subunit “d” and 90% similarity to a fragment (L Q E K) of subunit “f” of haemocyanin from the spider *A. gomesiana* (<http://www.compsysbio.org/partigene/>). Therefore, in the present study, we report the first isolation and characterisation of a fragment of haemocyanin with antifungal activity from arachnids.

3.5 Microbicidal activity of rondonin

The microbicidal properties of rondonin were determined by the Neubauer chamber and plate count method. When synthetic rondonin was incubated with *C. albicans* at a concentration two times higher than the respective MIC, no living yeast were detected after 10 minutes (data not shown). Figure 06 shows that rondonin inhibits the growth of *Candida albicans* MDM8 compared to the control.

3.6 Toxicity to human red blood cells

Haemolytic assays were used to assess the toxicity of peptides towards HRBCs *in vitro*. Incubating HRBCs (w/v) with various concentrations of rondonin for 3 hours at 37°C did not affect the OD at 414 nm. Triton X-100 was used as a positive control and taken as the 100% haemolysis value. PBS was used as a negative control and taken as the 0% haemolysis value. These results demonstrate that rondonin is not haemolytic (Fig 07).

4. DISCUSSION

Considering the studies of the immune system of invertebrates, the knowledge of the mechanisms involved in the immune response of arachnids is less studied than *Limulus polyphemus* (Iwanaga *et al* 1998). The life expectancy of many invertebrates is as long as the lifespan of vertebrates, despite the continuous challenge of pathogens. All multicellular animals are subject to frequent microbial challenges and the attack of

endo- and ectoparasites. In addition to defences against predators, survival depends on the presence of an efficient immune system that can quickly remove or inactivate pathogenic organisms. The immune system of the tarantula spider is particularly interesting because, in addition to having a life expectancy of more than 20 years (Foelix, 1996), tarantula spiders are also phylogenetically very old with fossil records dating from the Devonian period (400 million years ago) (Shear *et al.*, 1989; Selden *et al.*, 1991).

In this work, we purified six molecules with antimicrobial activity that have never before been described from the plasma of the tarantula spider *A. rondoniae*. Only one molecule, rondonin, which was named in honour of the studied species, was isolated and characterised. Rondonin, a peptide characterised with antifungal activity that inhibits the growth of *C. albicans* MDM8 in ten minutes and exhibited fungicidal activity, like a study previous with some antifungal agents like amphotericin B, fluconazole and LY303366 showed that fluconazole and LY303366 are fungistatic and amphotericin B exhibited fungicidal activity with a reduction in $\geq 3 \log_{10}$ compared to the starting inoculum. (Klepser *et al.*, 1998). Furthermore, rondonin showed no haemolytic activity, had identity with the C-terminal fragment of subunit “d” of haemocyanin from the tarantula *Eurypelma californicum* and *A. gomesiana* and showed 90% similarity with a fragment of subunit “f” of *A. gomesiana*, differing in only the second amino acid: ILIQYEGHKK. Lee *et al.* (2002) also found a fragment of haemocyanin, named astacidin 1, in the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, which consists of 16 amino acids with the sequence FKVQNQHGVVVKIFHH-COOH, has a molecular mass of 1,945.2 Da, and possesses antimicrobial activity.

Destoumieux-Garzon *et al.* (2001) showed that the plasma of shrimp contains an original class of strictly antifungal (poly)peptides with molecular masses ranging from 2,753.2 Da for a peptide from *Penaeus vannamei*, which consists of 23 amino acids with the sequence FEDLPNFGHIQVKVFNHGEHIIH, 7,982.4 Da for a peptide of 31 amino acids from *P. stylirostris* (VTDGDADSAVPLHHENTEYNYHGSYGVYPDK) and 8,362.8 Da for a 32 amino acid peptide, also from *P. stylirostris* (LVVAVTDGDADSAVPLHHENTEYNYHGSYGVY). The two peptides from *P. stylirostris* revealed perfect homology with the C-terminus of the haemocyanin of *Penaeus*.

In this case, the authors speculated that penaeid shrimp can use haemocyanin, which is abundant and readily available in the plasma, to produce C-terminal fragments that possess broad antifungal activities within the first hours of an infection. Therefore, haemocyanin has a potential function in crustacean immunity by serving as a substrate for the generation of antifungal (poly)peptides that could contribute to microorganism elimination in plasma. It remains to be established whether the mechanism leading to the partial cleavage of haemocyanin is part of the shrimp immune reaction and how involved this process can be in an immediate and systemic antimicrobial response in shrimp.

This result suggests that, as observed in crustaceans, the cleavage of haemocyanin and the production of peptide fragments with antimicrobial activity also occur in spiders as a first line of defence against infection. Several studies suggest that haemocyanins are involved in the arthropod immune system. The activity of the haemocyanin fragment discovered in this study reinforces that idea.

The identification and characterisation of new substances can lead to the development of new drugs that kill resistant pathogenic microorganisms. This peptide has activity against clinical isolates that cause candidiasis, one of the opportunistic pathogens responsible for nosocomial infections that colonise human mucosal surfaces (Odds *et al.*, 2001). Yeasts of the genus *Candida* are significant due to the high frequency at which they colonise and infect a human host. *Candida* species are found in the gastrointestinal tract in 20% to 80% of the healthy adult population. In addition, approximately 20% to 30% of women have *Candida* colonies in their vaginas (Dignani *et al.*, 2003). The increase in the prevalence of yeast infections is likely due to the AIDS epidemic, cancer chemotherapy, organ and bone-marrow transplants and invasive hospital procedures (White *et al.*, 1998; Yang and Lo, 2001) because of the overuse of antifungal agents, such as fluconazole (Yang and Lo, 2001). Due to its small size, rondonin can be synthesised quickly and can kill yeast in ten minutes. Furthermore, no toxicity towards human erythrocytes was observed in this study. Therefore, rondonin may represent a new strategy for developing drugs that neutralise or inhibit pathogens.

FOOTNOTES

* Corresponding author. Mailing address: Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, CAT/CEPID, Instituto Butantan, Av: Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo - São Paulo, Brazil. Phone/Fax: 55-11-3726-1024, email: pisjr@butantan.gov.br

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Mirian A. F. Hayashi (Dept. Farmacology/UNIFESP) for providing the clinical strains. We also appreciate the financial support of Fapesp (CAT/Cepid Project 98-14307-9), Capes and Cnpq.

REFERENCES:

- Atherton and Sheppard, 1989. Solid phase peptide synthesis—a practical approach, IRL Press, Oxford.
- Boman H.G., 1991. Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. *Cell*, 65, 205-207.
- Boman, H. G., 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 61–92
- Budnik, B.A; Olsen, J.V; Egorov, T.A.; Anisimova, V.E; Galkina, T.G.; Musolyamov, A.K; Grishin E.V. and Zubarev R.A., 2004. De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. *J. Mass Spectrom*, 39, 193-201.
- Cociancich, S., Goyffon, M., Bontems, F., Bulet, P., Bouet, F., Menez, A., and Hoffmann, J. A., 1993 Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 17–22
- Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, and Bache`re E., 2001. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C -terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge *J Biol Chem* 276, 47070–47077
- Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E., 2003. Candida. *In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA (eds) Medical Mycology. 1ª Edição, Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239*
- Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Goyffon, M., Fehlbaum, P., Hoffmann, J. A., Van Dorsselaer, A., and Bulet, P., 1996. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J. Biol. Chem.* 271, 29537–29544
- Foelix, R. F., 1996. *Biology of Spiders*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts/London.
- Fogaça, A.C., Silva Jr, P.I., Miranda, M.T, Bianchi. A.G., Miranda A., Ribolla, P.E. and Daffre, S., 1999. Antimicrobial Activity of a Bovine Hemoglobin Fragment in the Tick *Boophilus microplus* *J. Biol. Chem.* 274, 25330-25334.
- Haerberli S., Kuhn-Nentwig L., Schaller J.,and Nentwig W., 2000. Characterization of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Aranae: Ctenidae). *Toxicon*, 38, 373-380.
- Hancock REW, and Diamond G., 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol* 8,402-410.
- Harris, F., Dennison, S.R., and Phenix, D.A., (2009). Anionic antimicrobial peptide from eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci.* 10, 585-606.
- Hetru, C and Bulet, P., 1997. Strategies for the isolation and characterization of Antimicrobial peptides of invertebrates. *Methods in Molecular Biology.* 78(1) 35-48.
- Hetru, C., Hoffman, D., and Bulet, P., 1998. Antimicrobial peptides from insects. *in Molecula mechanisms of Immune Response in Insects*, Ed. P.T. Brey, D. Hultmark, Chapman and Hal, New York, pp 40-66.

- Hoffman IA, Kafatos FC, Janeway CA, and Ezekowitz RAB., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 284, 1313-1318.
- Hoffman, J. A., and Hertu, C., 1992. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunol. Today* 13, 411–415
- Iwanaga, S., Kawabata, S., and Muta, T., 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J. Biochem. (Tokyo)* 123, 1–15
- Jenssen, H. Hamill, P., and Hancock R.E.W., 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol.* 19(3), 491-511.
- Kamysz, W., Okrój, M. and Lukasiak, J., 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim. Pol.* 50, 461–469
- Klepser, M.E, Ernest, E.J, Lewis, R.S, Ernest, M.E, and Pfaller, M.A., 1998. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob. Agents Chemother* 42(5), 1207-1212
- Kuhn-Nentwig, L. 2003. Antimicrobial and cytotoxic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60, 2651-2668.
- Lai, R., Lomas, L.O., Jonczy, J., Turner, P.C., and Rees, H.H., 2004. Two novel noncationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *J. Biochem.* 379, 681-685.
- Lee, S.Y; Lee, B.L. and Söderhäll, K., 2002. Processing of an Antibacterial Peptide from Hemocyanin of the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus* *J. Biol. Chem.* 278(10), 7927-7933.
- Mak P, Wo'jcik K, Wicherek Ł, Suder P, and Dubin, A., 2004. Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides* 25, 1839–47.
- Markl J, Markl A, Schartau W, Linzen B. 1979. Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: I (Chelicerata). *J Comp Physiol B* 130, 283-292
- Markl J, Savel A, Decker H, Linzen B. 1980. Hemocyanins in spiders, IX. Homogeneity, subunit composition and the basic oligomeric structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 36, 649-660
- Markl J, Decker H, Stöcker W, Savel A, Linzen B, Schutter WG, van Bruggen EFJ. 1981. On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 362, 185-188
- Markl, J. 1986. Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol Bull* 171, 90-115
- Odds, F.C; Gow, N.A and Brown, A.J., 2001. Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol.* 2, 1009.1-1009.4
- Selden, P; Shea, W.A. and Bonamo, P.M., 1991. A spider and other arachnids from Devonian of New York, and reinterpretations of Devonian Aeneae. *Paleontology*, 34, 241.
- Shear, W.A; Palmer, J.M; Coddington, J.A. and Bonamo, P.M, 1989. A Devonian spinneret: early evidences of spiders and silk use. *Science*, 246, 479.
- Schneider H-J, Markl J, Schartau W, Linzen B. 1977. Subunit heterogeneity of *Eurypelma* (*Dugesia*) hemocyanin, and separation of polypeptide chains. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 358, 1133-1141
- Silva Jr, P.I., 2000. Sistema Imune de Aracnídeos: Estrutura química e atividade de peptídeos antimicrobianos da Hemolinfa de *Acanthoscurria gomesiana* Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP para obtenção do título de doutor em Ciências

- Silva Jr, P.I.; Daffre, S. and 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(45), 33464-33470.
- Silva, F. D., Rezende, C. A., Rossi, D. C. P., Esteves, E., Dyszy, F. H., Schreier, S., Gueiros-Filho, F., Campos, C. B., Pires, J. R., and Daffre, S., 2009. Structure and Mode of Action of Microplusin, a Copper II-chelating Antimicrobial Peptide from the Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* *J. Biol. Chem.* 284, 34735-34746
- Söderhäll K, and Cerenius L., 1998. Role to the prophenoloxidase- activating system in invertebrate immunity. *Cur Opin Immunol* 10,23-28
- Söderhall, K., and Smith, V. J., 1983 Separation of the haemocyte of *Carcinus maenas* and other decapod crustaceans and phenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 229–239
- Steffen, H., Rieg, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H. G., Peschel, A., Götz, F., Garbe, C., and Schitteck, B., 2006. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2608–2620.
- Strominger., 2009. Animal Antimicrobial Peptides: Ancient Players in Innate Immunity *J. Immunol.* 182, 6633-6634.
- Ullal, A.J., Litaker, R.W. and Noga, E.J., 2008. Antimicrobial peptides derived from haemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque). *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1301-1312.
- Voit, R.; Feldmaier-Fuchs, G.; Schweikardt, T.; Decker, H. and Burmester, T. (2000). Complete Sequence of the 24-mer Hemocyanin of the Tarantula *Eurypelma californicum*. *J. Biol. Chem.* 275 (50), 39339-39344.
- White, T.C.; Man, K.A. Bowden, R.A. Clinical., 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiol Rev.* 11: 382-402.
- Yamane, E.S. 2010. Estudo da atividade antimicrobiana da crotamina native e sintética, do seu análogo recombinante e fragmentos peptídicos. Dissertação apresentada a Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de mestre em Ciências
- Yang, Y.L.; Lo, H-J., 2001. Mechanisms of antifungal agent resistance. *J. Microbiol. Immunol Infect.* 34: 79-86.
- Yigit, N. and Benli, M., 2008. The antibacterial activity of hemolymph of spider, *Agelena labyrinthica* (Araneae: Agelenidae). *J. For. Fac.* 8,120–124
- Zhu, W.L, Song, Y.M., Park, Y., Park, K.H., Yang, S.T., Kim, J.I., et al., 2007. Substitution of the leucine zipper sequence in melittin with peptoid residues affects self-association, cell selectivity, and mode of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:(6), 1506-1517.

FIGURE LEGENDS

Table 1 – Antimicrobial activity spectrum of synthetic rondonin compared to gomesin. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of the synthetic peptides were determined by liquid growth inhibition. MICs are expressed as the (a)-(b) interval of concentrations where (a) is the highest concentration tested at which the microorganisms are growing and (b) is the lowest concentration that causes 100% growth inhibition. The highest concentration tested was 67 µM. ND: activity not detected in the range of the concentration tested; NA: activity not available, (*) Silva Jr *et al*, 2000, (#) Yamane, 2010.

Fig. 01 - Specimen of the spider *Acanthoscurria rondoniae* (Theraphosidae, Mygalomorphae).

Fig. 02 - Purification of rondonin from spider plasma by reverse phase HPLC. An acidic extract obtained from *A. rondoniae* plasma was submitted to solid phase extraction on Sep-Pak C18 cartridges. The fraction that eluted at 40% acetonitrile was analysed on a semi-preparative Jupiter C18 column with a linear gradient from 2 to 60% acetonitrile in acidified water over 60 min (dotted line) at a flow rate of 1.5 mL/min.

Fig. 03 - MALDI-TOF spectrum of fraction 2 (rondonin). Analysis of fraction 2 by mass spectrometry showed a single molecule with an m/z of 1,237.776.

Fig. 04 - Representative “de novo” sequencing of fraction 2 from *A. rondoniae* plasma in a Q-TOF Micro TM (Micromass). The fragments shown correspond to the b and y series. The peptide sequence following the b and y series orientation is shown on the top of the graph. Mass spectrometric “de novo” peptide sequencing was performed in positive ionisation mode on a Q-TOF MicroTM fitted with an electrospray ion source.

Fig. 05 - *Eurypelma californicum* (Theraphosidae) haemocyanin subunits (a, b, c, d, e, f, and g). The peptide showed identity with the C-terminal fragment from subunit “d” (Voit *et al.*, 2000).

Fig. 06 - Growth inhibition of *Candida albicans* MDM8 by rondonin. Synthetic rondonin (67 µM, solid line) or water (control, dotted line) was added to an exponential phase culture of *C. albicans*. Aliquots were removed at various times, and the number of blastoconidia were counted in a Neubauer chamber. To test the viability of blastoconidia, 20 µL aliquots for each time point were incubated on Luria Bertani agar plates for 48 h at 30°C.

Fig. 07 – Toxicity of rondonin with HRBCs. Synthetic rondonin was incubated with human erythrocytes ranging from 0.2 - 134 µM for 3h at 37°C. The haemolysis percentage was expressed in relation to 0% haemolysis with PBS and 100% lysis control (0.1% triton X-100).

Microorganisms	Minimal Inhibitory Concentration (μM)					
	Rondonin			Gomesin		
Gram-positive bacteria						
<i>Micrococcus luteus</i> A270	ND	0.4	-	0.8*		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	ND	1.2	-	2.5 [#]		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	ND			NA		
Gram-negative bacteria						
<i>Escherichia coli</i> SBS363	ND	0.4	-	0.8*		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ND	0.2	-	0.9 [#]		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (Strain Boston 41501)	ND			NA		
Fungi						
<i>Beauveria bassiana</i>	ND			NA		
<i>Trichosporon</i> sp IOC 4569	1.1	-	2.1	0.6	-	1.2 [#]
Yeasts						
<i>Candida albicans</i> MDM8	16.75	-	33.5	0.15	-	0.3*
<i>Candida krusei</i> IOC 4559	16.75	-	33.5	5.0	-	10.0 [#]
<i>Candida glabrata</i> IOC 4565	8.37	-	16.5	12.5	-	25
<i>Candida albicans</i> IOC 4558	8.37	-	16.5	5.0	-	10.0 [#]
<i>Candida parapsilosis</i> IOC 4564	16.75	-	33.5	2.5	-	5.0 [#]
<i>Candida tropicalis</i> IOC 4560	8.75	-	16.5	0.3	-	0.6 [#]
<i>Candida guilliermondii</i> IOC 4557	16.75	-	33.5	2.5	-	5.0 [#]

The highest concentration tested was 67 μM . ND, activity not detected in the range of concentration tested; NA, activity not available.

Figure 01
[Click here to download high resolution image](#)



Figure 02
[Click here to download high resolution image](#)

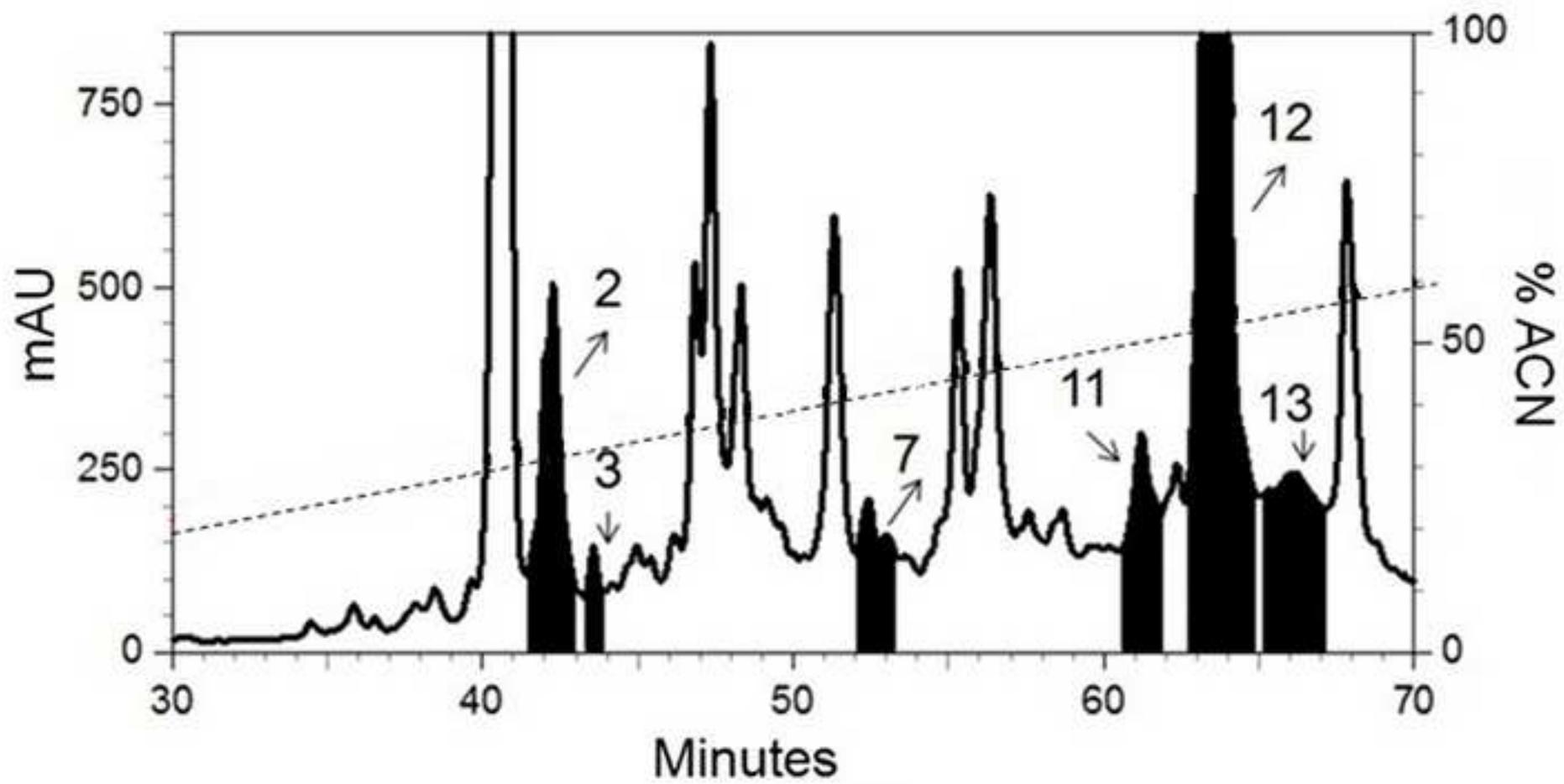


Figure 03
[Click here to download high resolution image](#)

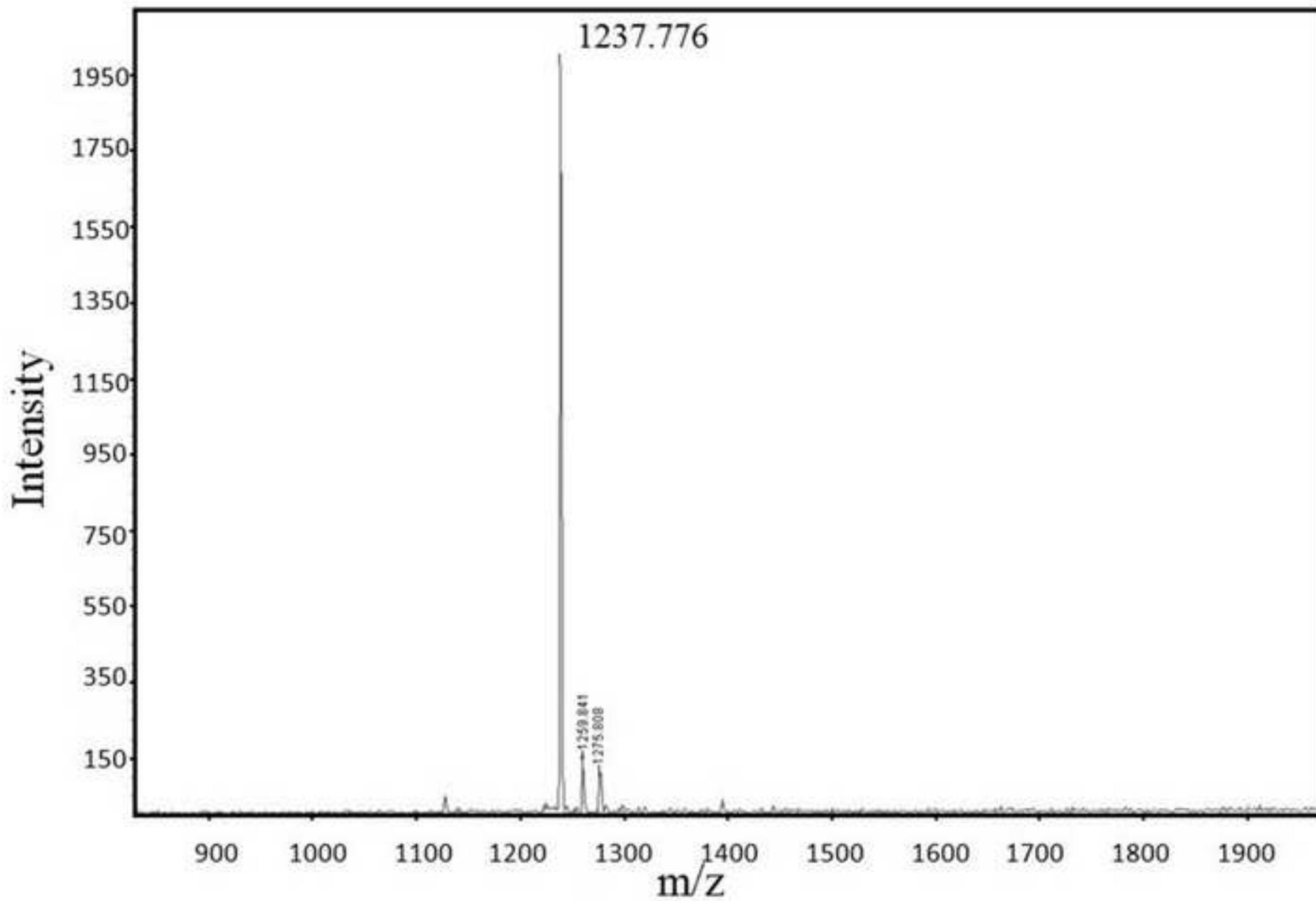


Figure 04

[Click here to download high resolution image](#)

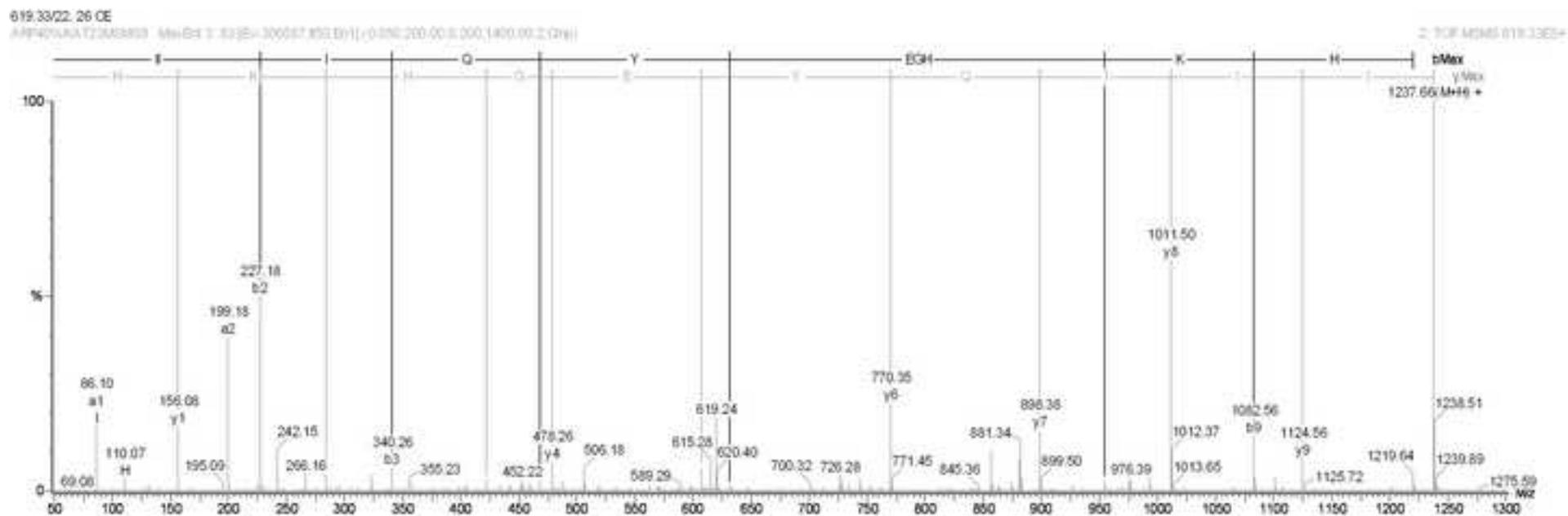


Figure 05

[Click here to download high resolution image](#)

a	MGYPFDRKITADTHEEFLTGNMNISHVTVRFQD	631
b	MGFPFDRDIKADSIPEWLHPNMHFSEVTITHHQ	627
c	MGFPFDRPIPEGHASNLHQPNVSFSQIKIQHH	629
d	MGYPFDRPIQVRTPSQFKTPNMAFQE IIIQYEGHKKH	627
e	MGFPFDRVIEGLTLEEFLTPSMSCTDVRIKYTDIK	624
f	MGFPFDRVIKARTVADFRTTNMSFTDVKIQFKDQV	629
g	MGFPFDRPTKIHTAEEILTPNMSLTDVVIOYVGHE	628

Figure 06
[Click here to download high resolution image](#)

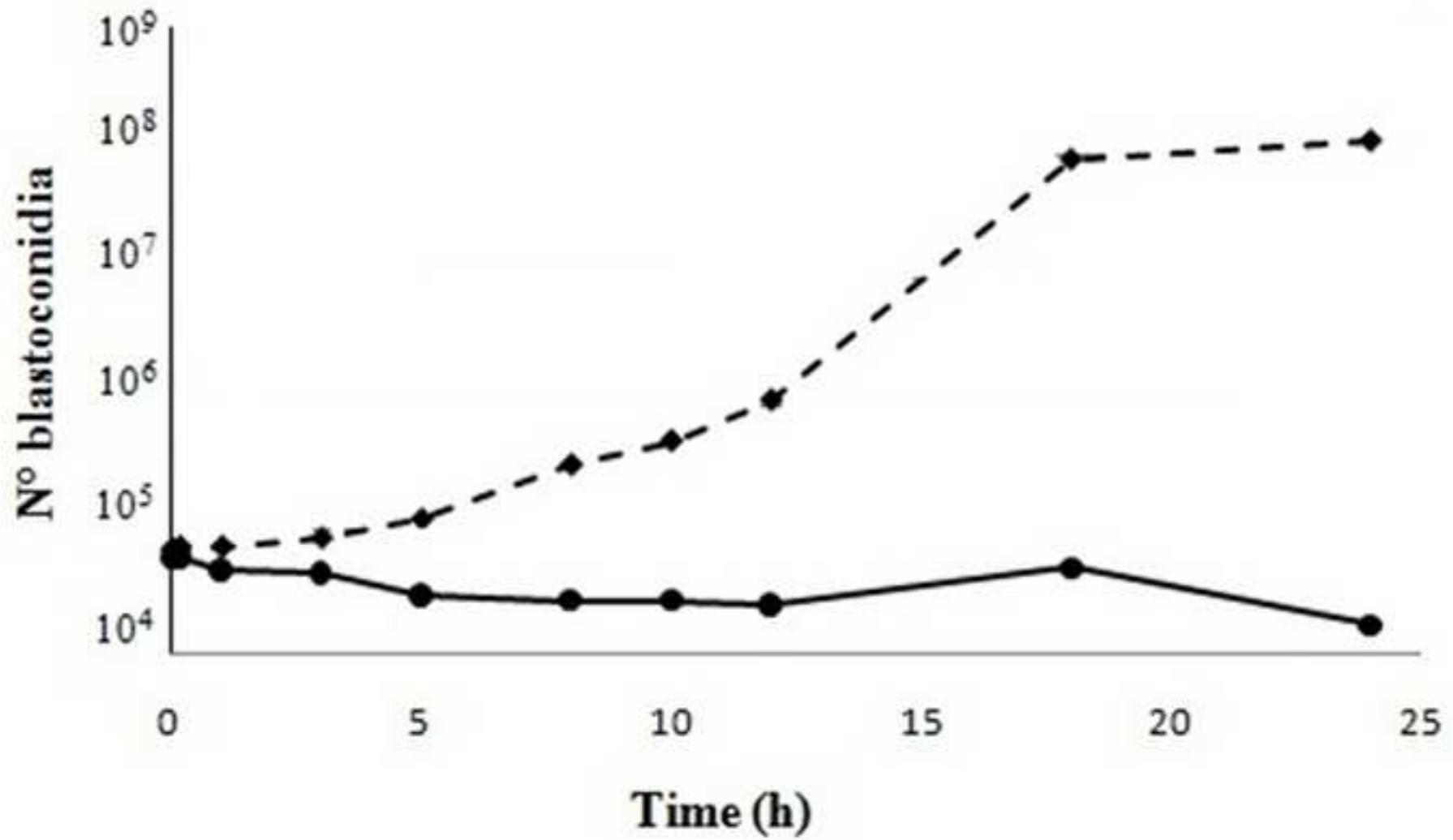
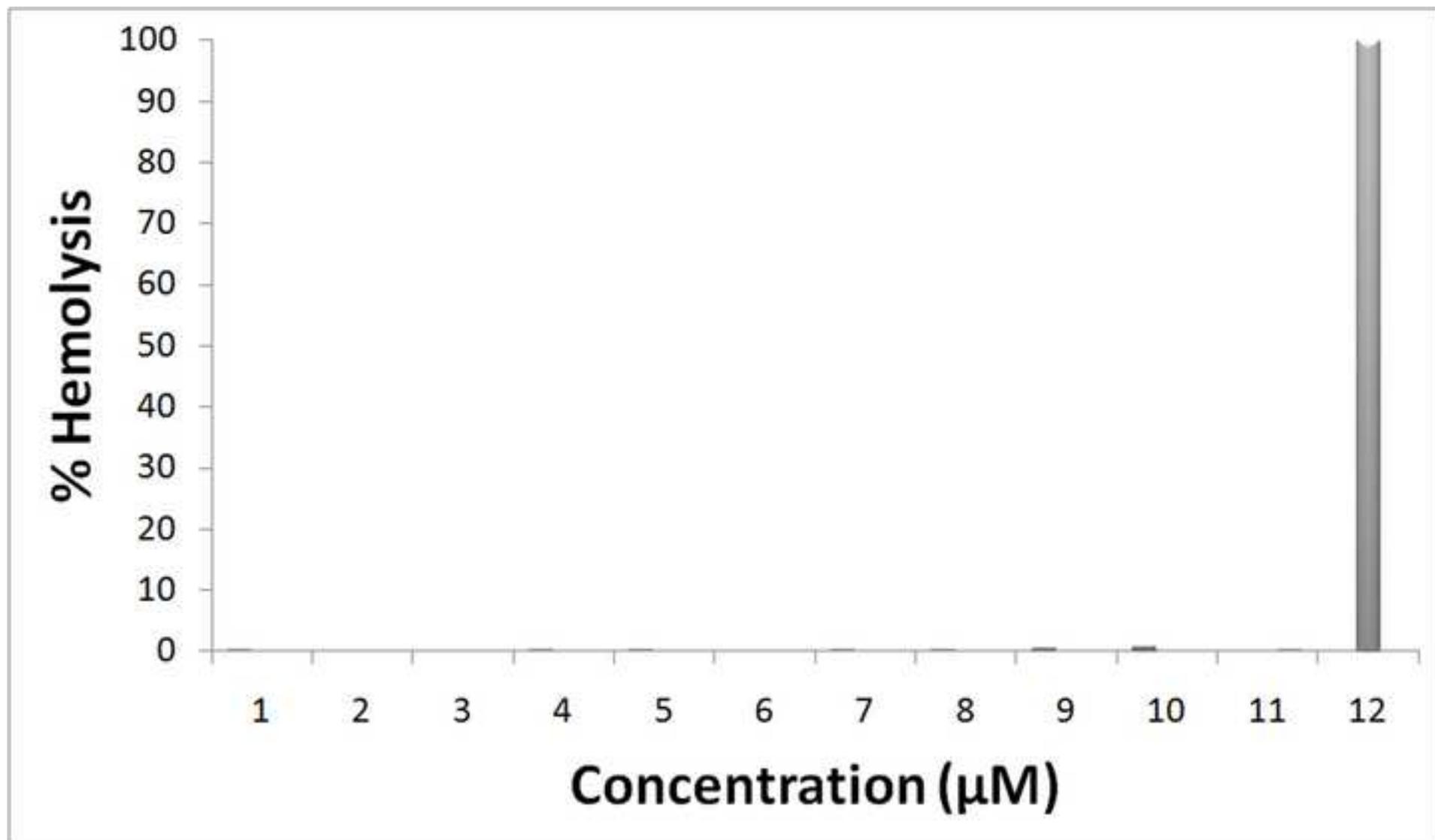


Figure 07
[Click here to download high resolution image](#)



Anexo 3 - Manuscrito em fase de elaboração para submissão a revista Journal of Life Science

Pedro Ismael da Silva Jr <peisjr@gmail.com> Wed, Sep 28, 2011 at 5:12 PM
To: life-sciences <life-sciences@davidpublishing.com>
Cc: Kate Ricaluca <katericaluca@gmail.com>

Dear Editor

I am sending an abstract of the manuscript that I'm trying to present for evaluation for publication in this journal. Please tell me if it is in accord with general the scope of the Journal of Life Sciences (ISSN1934-7391).

Thanks in advance,

Pedro Ismael da Silva Jr., PhD
Leta - CAT/Cepid
Butantan Institute
peisjr@butantan.gov.br
peisjr@gmail.com

From: life-sciences <life-sciences@davidpublishing.com>
Date: 2011/9/28
Subject: Re: Re: Call for paper, 2010 ESA Annual Meeting
To: Pedro Ismael da Silva Jr <peisjr@gmail.com>

Dear Dr. Pedro Ismael da Silva Jr.,

Thank you for your email.
This is Managing Editor of *Journal of Life Sciences*.

We have read the abstract of your paper.
We are interested in the researches on the area of innate immunity against microorganisms and other pathogens very much.
Welcome to submit the paper in MS word format to us.
Feel free to contact us with any questions.
Best regards.

Sincerely,
Beata

Journal of Life Sciences (ISSN1934-7391), USA
David Publishing Company, <http://www.davidpublishing.com>
Email: life-sciences@davidpublishing.com
life-sciences@hotmail.com
Address: 1840 Industrial Drive, Suite 160, Libertyville, Illinois 60048, U.S.A.
Tel: [1-847-281-9862](tel:1-847-281-9862), Fax: [1-847-281-9855](tel:1-847-281-9855)
2011-09-29

MANUSCRIPT: IS RONDONIN WIDESPREAD IN THE FAMILY THERAPHOSIDAE?

Abstract:

The widespread occurrence of antimicrobial substances suggests they play a role in innate immunity against microorganisms and other pathogens. In the plasma of *Acanthoscurria rondoniae* spider we have identified a peptide with antifungal activity with 1,236.405 Da and primary structure: IIIQYEGHKH with identity to a spider haemocyanin fragment, to which we propose the name rondonin. This spider belongs to Theraphosidae family which presents 933 species in 118 genera, and is responsible for 35% of the Mygalomorphae suborder. Although most are terrestrial, living in burrows in the soil or under rocks and other natural cavities, there are arboreal species in Central and South America, Asia and Africa. They are distributed on all continents, as well as in many tropical and subtropical areas. Theraphosidae is considered a monophyletic group, presenting as synapomorphic character a tarsal scopula well developed, in combination with tufts subunguis. Out of the 7 traditionally accepted Theraphosidae subfamilies, only 3 are found in Brazil: Aviculariinae, Ischnocolinae and Theraphosinae. Once we found rondonin in *A. rondoniae*, we decided to look if this peptide is present in other theraphosids. In this case, will be rondonin widespread among the genera of Theraphosidae family? The haemolymph was collected from *A. gomesiana*, *Vitalius wacketi*, *Nhandu coloratovilosum*, *Lasiadora parahybana*, *Avicularia juruensis* and *Grammostola pulchra* spiders, by cardiac puncture with an apyrogenic syringe. In the plasma collected was added acidified water. The Sep-Pak fraction 40% was applied to reverse phase chromatography on a semi preparative Jupiter C18 column. The presence of antifungal activity was determined by liquid growth inhibition assays against *Candida albicans*. According to our results, we found the same peptide only in *A. gomesiana*, *N. coloratovilosum*; *V. wacketi* and *L. parahybana*, confirmed by the molecular mass and primary sequence of rondonin. In *G. pulchra*, which is in the base of the phylogenetic tree of Theraphosinae subfamily, rondonin was not found. Also, in *A. juruensis*, a member of the Aviculariinae subfamily, we have not identified this peptide. Thus, our results suggest rondonin may be conserved within the Theraphosinae subfamily.

However we cannot discard the hypothesis of other fragments of haemocyanin that has not been identified yet are present among these groups, participating in their innate immune response.

IS RONDONIN WIDESPREAD IN THE FAMILY THERAPHOSIDAE?

Katie Cristina Takeuti Riciluca^{1,2}, Raphael Santa Rosa Sayegh¹, Júlia Pinheiro Chagas da Cunha¹; Tatiana Soares³; Patrícia Maria Guedes Paiva³, Robson Lopes Melo¹, Pedro Ismael da Silva Jr^{1*}

Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada-CAT-CEPID,

Instituto Butantan, São Paulo 05503-900, SP, Brasil¹.

Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD- São Paulo, Brazil²

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil³

Abstract: The widespread occurrence of antimicrobial substances suggests that they play a role in innate immunity against microorganisms and other pathogens. In the plasma of *Acanthoscurria rondoniae* was identified one peptide with antifungal activity with 1,236.405 Da and primary structure: IIIQYEGHKKH with identity with an hemocyanin fragment and was nominated rondonin. Will be rondonin widespread among the genera of the family Theraphosidae?. The hemolymph was collected from *A.gomesiana*, *Vitalius wacketi*, *Nhandu coloratovilosum*, *Avicularia juruensis* and *Grammostola pulchra*, by cardiac puncture with an apyrogenic syringe. In the plasma collected was added acidified water. The Sep-Pak fraction 40% was applied to reverse phase chromatography on a semi preparative Jupiter C18 column. The presence of antibacterial activity was determinate by a liquid growth inhibition assay against *Candida albicans*. According our results, we found the same peptide only in the *A. gomesiana*, *N. coloratovilosum*; *V. wacketi* and *L. parahybana* it showed the same molecular mass and sequence with rondonin, it can be possible because they belong to the same subfamily Theraphosinae. Maybe rondonin is a specific character of the subfamily Theraphosinae since it is not present in *Avicularia* that belongs to subfamily Aviculariinae and *G. pulchra*. is present at base of phylogenetic tree.

Keywords: rondonin, antimicrobial peptide, haemolymph, theraphosidae, spider

1. Introduction

The Theraphosidae are found on all continents, except Antarctica. More than 900 species are described consisting roughly of a third of all described mygalomorph species [1]. Most theraphosids are found in tropical areas but some representatives live in subtropical and temperate regions. They are mainly terrestrial in habit, living in burrows and other natural cavities or under rocks and fallen logs. Arboreal forms are found mainly in the tropical New World but also in Africa and Asia [2-6].

Corresponding autor: Pedro Ismael da Silva Jr., Ph.D., scientific researcher V., biochemistry, pisjr@butantan.gov.br

Invertebrates are constantly exposed to microbial infections, and to protect

themselves they have developed powerful immune defense mechanisms similar to those innate to vertebrates. These mechanisms involve cellular and humoral responses. The former consists of encapsulation, nodulation, and phagocytosis of microbes by haemocytes, while humoral response comprises factors related to the recognition of invading microorganisms, serine protease cascades participating in melanization and coagulation, and killing factors such as antimicrobial peptides (AMPs), reactive oxygen species, and reactive nitrogen intermediates, including nitric oxide [7].

The antimicrobial peptides are generally small, positively charged, amphipathic molecules

of variable amino acid composition and length (six to 100 amino acids) [8]. A large number of amphiphilic and cationic peptides have been characterised in invertebrates, especially from the phyla Arthropoda [9]. Recently was characterised from the spider *Acanthoscurria rondoniae* a peptide, rondonin, with molecular mass of 1,236.32 Da and amino acid sequence of IIIQYEGHKH that showed antifungal activity and no haemolytic activity and identity with the C-terminal fragment of subunit “d” of haemocyanin from the tarantulas *Eurypelma californicum* and *A. gomesiana* and 90% identity with a fragment of subunit “f” of *A. gomesiana*, differing in only the second amino acid: ILIQYEGHKH [10].

The haemocyanin from arthropods is a large, copper-containing protein present in the haemolymph. It is colorless in the deoxy form and blue in the oxygenated form. The traditional role of haemocyanin is the transport and storage of molecular oxygen. Subsequently, it was demonstrated that haemocyanin is a multifunctional protein involved in several physiological processes such as protein storage, osmoregulation, molt cycle and exoskeleton formation [11-13].

More recent reports reveal that haemocyanin may be a novel important type of non-specific innate immune defense molecule [14–24]. Besides, haemocyanin and its degenerated fragments possess antimicrobial properties [9, 20, 21].

There are few studies about the immunity of spiders. The study of mygalomorphs is very interesting from evolutionary point of view of innate

immunity, since this represents one of the oldest groups of the order Araneae [25, 26].

2. Material and Methods

2.1. Microorganisms

Fungal and bacterial strains were obtained from various sources. *Escherichia coli* SBS 363 and *Micrococcus luteus* A270 were from the Pasteur Institut, Paris; *Candida albicans* (MDM8) was from the Department of Microbiology from the University of São Paulo, Brazil.

2.2 Spider Blood

The spiders (*A. gomesiana*, *Nhandu coloratovillosus*, *Vitalis wacketi*, *Lasiadora parahybana*, *Grammostola pulchra* and *Avicularia juruensis*, tarantulas of the Theraphosidae family) were kept alive in the biotherium of the Special Laboratory of Toxinology Applied of the Institute Butantan (São Paulo, Brazil). These animals were collected under License Permanent Zoological Material n0. 11024-3-IBAMA and Special Authorisation for Access to Genetic Patrimony n0. 001/2008. The haemolymph from animals of either sex at different stages of development was collected by cardiac puncture with a pyrogenic syringe. To avoid haemocyte degranulation and coagulation, the haemolymph was collected in the presence of sodium citrate buffer, pH 4.6 (2:1, v/v) [27]. The plasma was separated, and blood cells were removed by centrifugation at 800 xg for 10 min at 4°C.

2.3 Antimicrobial activity assays

During the purification procedure, the antimicrobial activities of samples were monitored by a liquid growth inhibition assay against the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* SBS363, Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* A270 and yeast strain *Candida albicans* MDM8. The peptide was dissolved in sterile Milli-Q. Microbial growth was measured by monitoring the increase in OD at 595 nm after incubation at 30°C for 18 h.

2.4 – Purification of plasma

The plasma was acidified with acidified water (TFA –trifluoroacetic acid 0.05%), agitated on ice for 30 min and centrifuged at 16,000 xg at 4°C. The acidic supernatant was loaded onto classic Sep-Pak C18 cartridges equilibrated in acidified water (TFA 0.05%). After washing with acidified water, three stepwise elutions were successively performed with 5%, 40% and 80% acetonitrile (ACN/TFA 0.05%). The 40% Sep- Pak fraction was concentrated in a vacuum centrifuge and reconstituted in Milli-Q water (Millipore™). The reconstituted 40% Sep-Pak fraction was subjected to reverse phase chromatography on a semi-preparative Jupiter C18 column equilibrated in acidified water. The sample was eluted with a linear 2-60% gradient of acetonitrile in acidified water over 60 min at a flow rate of 1.5 mL/min. Fractions corresponding to absorbance peaks were collected by hand, concentrated under vacuum (Speed-Vac Savant) and reconstituted

in Milli-Q water. The presence of antimicrobial activity was determined by a liquid growth inhibition assay.

2.5 Mass analysis by MALDI-TOF and LC/MS

Briefly, 0.35 µL of sample in Milli-Q water was mixed with 0.35 µL of saturated matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid solution deposited onto the sample slide and dried on the bench. The analysis was performed with the spectrometer operating in positive mode, which detects positively charged ions. To determine the amino acid sequence of rondonin, the doubly charged ions were subjected to “de novo” sequencing in a Q-TOF Ultima API (Micromass) spectrometer operating in positive ionisation mode. The spectrum was analysed, and the “y” and “b” fragments were used to elucidate the primary structure of the molecule.

3. Results and Discussion

3.1. Antimicrobial activity of rondonin measured by liquid growth inhibition

Antimicrobial activity of rondonin was monitored by Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeast. The fractions “R” of different spiders showed only activity against *C. albicans* MDM8 like rondonin, isolated from *Acanthoscurria rondoniae* plasma [10].

3.2 Purification of plasma from spiders and identification of rondonin

Plasma of all animals were collected and dissolved in acidified Milli-Q water as previously described. The supernatant obtained by centrifugation was applied to a Sep-Pak C18 column and subjected to three successive extractions of increasing concentrations of acetonitrile (5%, 40% and 80%) to pre-purify antimicrobial peptides. The fraction that eluted at 40% was subjected to high resolution HPLC. All fractions were analyzed in the liquid growth inhibition assay using *M. luteus*, *E. coli*, and *C. albicans* to identify the fraction correspondent and confirm its antifungal activity.

In plasma of *V. wacketi* we found a molecule with antimicrobial activity against *C. albicans* with molecular mass 1,236.654 Da (Fig 1) and when submitted to analyze Q-TOF revealed the same feature of fragmentation of ions of rondonin can deduce its primary sequence by “de novo” sequencing (Fig 2).

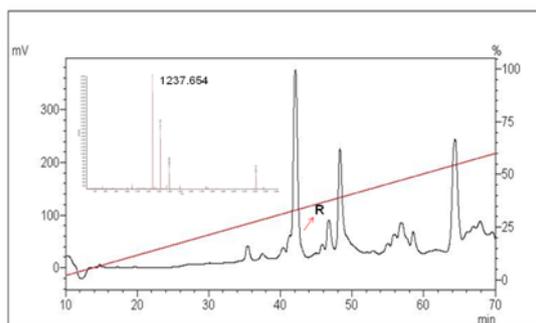


Fig. 01 - Purification of rondonin from spider plasma by reverse phase HPLC. An acidic extract obtained from *V. wacketi* plasma was submitted to solid phase extraction on Sep-Pak C18 cartridges. The fraction that eluted at 40% acetonitrile was analysed on a semi-preparative Jupiter C18 column with a linear gradient from 2 to 60% acetonitrile in acidified water over 60 min at a flow rate of 1.5 mL/min. Analysis of fraction R by mass spectrometry MALDI-TOF showed a molecule with an m/z of 1,237.654 mass (“inset”).

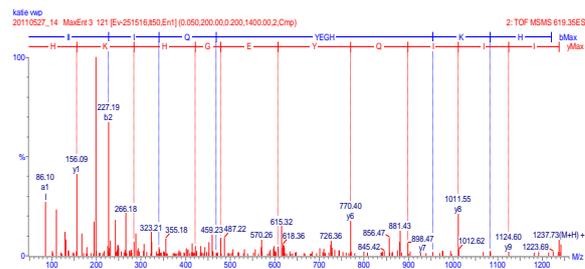


Fig. 02 - Representative “de novo” sequencing of fraction R from *V. wacketi* plasma in a Q-TOF Micro TM (Micromass). The fragments shown correspond to the b and y series. The peptide sequence following the b and y series orientation is shown on the top of the graph. Mass spectrometric “de novo” peptide sequencing was performed in positive ionisation mode on a Q-TOF MicroTM fitted with an electrospray ion source.

In plasma of *N. coloratovillosus* we found a molecule with antimicrobial activity against *C. albicans* with molecular mass 1,236.569 Da (Fig 3) and when submitted to analyze Q-TOF revealed the same feature of fragmentation of ions of rondonin can deduce its primary sequence by “de novo” sequencing (Fig 4).

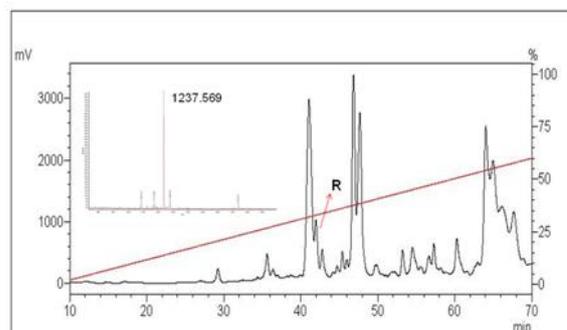


Fig. 03 - Purification of rondonin from spider plasma by reverse phase HPLC. An acidic extract obtained from *N. coloratovillosus* plasma was submitted to solid phase extraction on Sep-Pak C18 cartridges. The fraction that eluted at 40% acetonitrile was analysed on a semi-preparative Jupiter C18 column with a linear gradient from 2 to 60% acetonitrile in acidified water over 60 min at a flow rate of 1.5 mL/min. Analysis of fraction R by mass spectrometry MALDI-TOF showed a molecule with an m/z of 1,237.569 mass (“inset”).

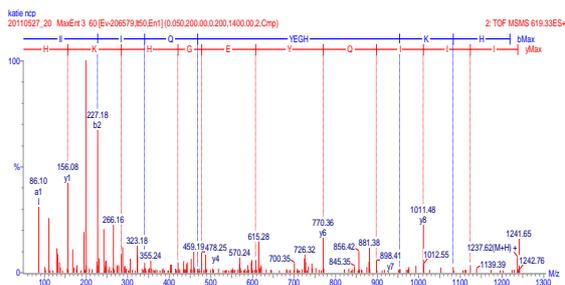


Fig. 04 - Representative “de novo” sequencing of fraction R from *N. coloratovillosus* plasma in a Q-TOF Micro TM (Micromass). The fragments shown correspond to the b and y series. The peptide sequence following the b and y series orientation is shown on the top of the graph. Mass spectrometric “de novo” peptide sequencing was performed in positive ionisation mode on a Q-TOF MicroTM fitted with an electrospray ion source.

In plasma of *A. gomesiana* we found a molecule with antimicrobial activity against *C. albicans* with molecular mass 1,236.569 Da (Fig 5) and when submitted to analyze Q-TOF revealed the same feature of fragmentation of ions of rondonin can deduced its primary sequence by “de novo” sequencing (Fig 6).

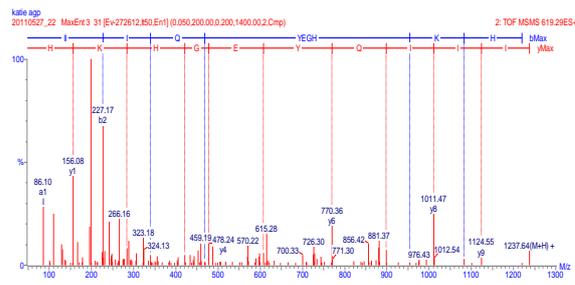


Fig. 06 - Representative “de novo” sequencing of fraction R from *A. gomesiana* plasma in a Q-TOF Micro TM (Micromass). The fragments shown correspond to the b and y series. The peptide sequence following the b and y series orientation is shown on the top of the graph. Mass spectrometric “de novo” peptide sequencing was performed in positive ionisation mode on a Q-TOF MicroTM fitted with an electrospray ion source.

In plasma of *L. parahybana* we found a molecule with antimicrobial activity against *C. albicans* with molecular mass 1,236.581 Da (Fig 7) and when submitted to analyze Q-TOF revealed the same feature of fragmentation of ions of rondonin can deduced its primary sequence by “de novo” sequencing (Fig 8).

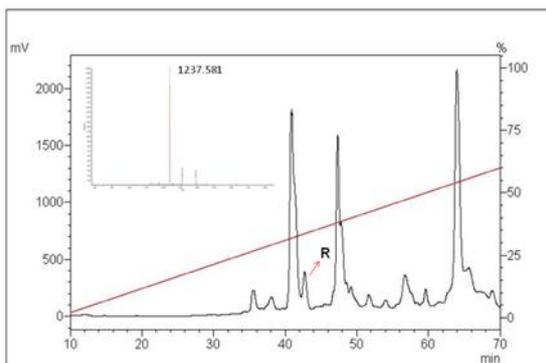


Fig. 05 - Purification of rondonin from spider plasma by reverse phase HPLC. An acidic extract obtained from *A. gomesiana* plasma was submitted to solid phase extraction on Sep-Pak C18 cartridges. The fraction that eluted at 40% acetonitrile was analysed on a semi-preparative Jupiter C18 column with a linear gradient from 2 to 60% acetonitrile in acidified water over 60 min at a flow rate of 1.5 mL/min. Analysis of fraction R by mass spectrometry MALDI-TOF showed a molecule with an m/z of 1,237.581 mass (“inset”).

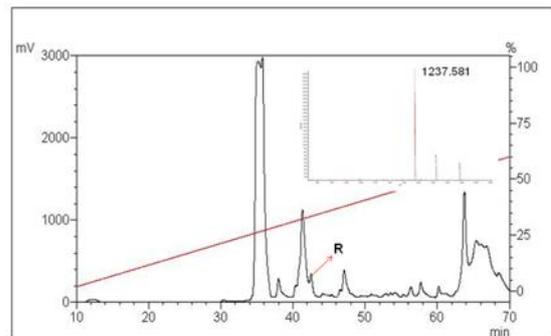


Fig. 07 - Purification of rondonin from spider plasma by reverse phase HPLC. An acidic extract obtained from *L. parahybana* plasma was submitted to solid phase extraction on Sep-Pak C18 cartridges. The fraction that eluted at 40% acetonitrile was analysed on a semi-preparative Jupiter C18 column with a linear gradient from 2 to 60% acetonitrile in acidified water over 60 min at a flow rate of 1.5 mL/min. Analysis of fraction R by mass spectrometry MALDI-TOF showed a molecule with an m/z of 1,237.581 mass (“inset”).

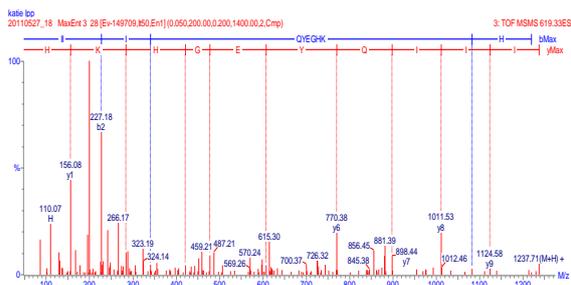


Fig. 08 - Representative “de novo” sequencing of fraction R from *L. parahybana* plasma in a Q-TOF Micro TM (Micromass). The fragments shown correspond to the b and y series. The peptide sequence following the b and y series orientation is shown on the top of the graph. Mass spectrometric “de novo” peptide sequencing was performed in positive ionisation mode on a Q-TOF MicroTM fitted with an electrospray ion source.

These results show us that the hemocyanin in these groups may have been conserved throughout evolution, once that the hemocyanin is conserved within all arthropod (28). In the plasma of *G. pulchra* (Fig. 9) and *A. juruensis* (Fig. 10) was not found the peptide, which can be explained by the fact that *A. juruensis* belonging to the subfamily Aviculariinae and *G. pulchra* despite belonging to the subfamily Theraphosinae, is located in a more basal in the phylogenetic tree, but we cannot discard the hypothesis of other fragments of haemocyanin that didn't be identified are present in these groups participating in the innate immune response.

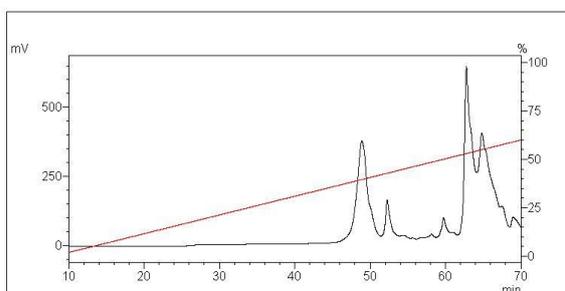


Fig. 09 - Purification of rondonin from spider plasma by reverse phase HPLC. An acidic extract obtained from *G. pulchra* plasma was submitted to solid phase extraction on Sep-Pak C18 cartridges. The fraction that eluted at 40% acetonitrile was analysed on a semi-preparative Jupiter C18 column with a linear gradient from 2 to 60% acetonitrile in

acidified water over 60 min at a flow rate of 1.5 mL/min.

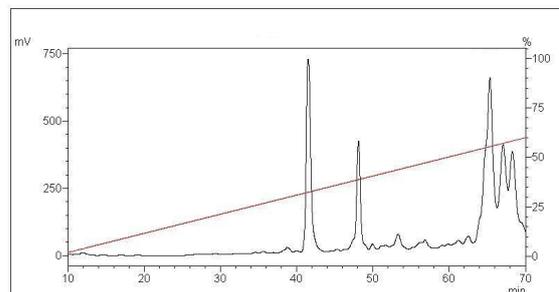


Fig. 10 - Purification of rondonin from spider plasma by reverse phase HPLC. An acidic extract obtained from *A. juruensis* plasma was submitted to solid phase extraction on Sep-Pak C18 cartridges. The fraction that eluted at 40% acetonitrile was analysed on a semi-preparative Jupiter C18 column with a linear gradient from 2 to 60% acetonitrile in acidified water over 60 min at a flow rate of 1.5 mL/min.

Based on existing cladograms [28, 29] since there is no proposed for all taxa in the study, we constructed a model to show the position that fits rondonina these groups (fig 11). Thus we can assume that rondonin is a probably character existing in subfamily Theraphosinae only in the more derived groups.

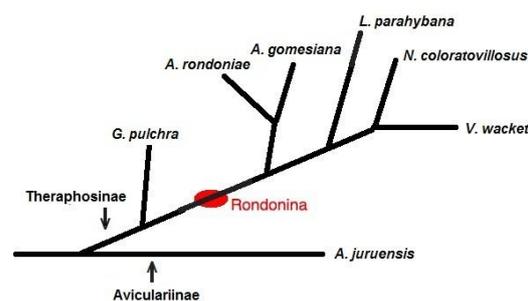


Fig. 11 – Rondonin like a probably character of a group of spider from subfamily Theraphosinae. (adapted from [29], [30])

4. Conclusion

According our results we can conclude that haemocyanin in these groups is much conserved at C-terminus, once the peptides isolated from plasma showed

antifungal activity and primary structure IIIQYEGHKK in *Vitalius wacketi*, *Nhandu coloratovilosus*, *Acanthoscurria gomesiana* and *Lasiadora parahybana* like *Acanthoscurria rondoniae*. These results showed us that the subfamily Theraphosinae presents the C-terminus of haemocyanin conserved in the groups more derived.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Brazil) for providing financial support.

References

- [1] N. I Platnick, The world spider catalog, version 11.5. American Museum of Natural History, available online at: <http://research.amnh.org/iz>
- [2] R.J. Raven, Comments on the proposed precedence of *Aphonopelma* Pocock 1901 (Arachnida, Aranae) over *Rhechostica* Simon 1892. Bulletin Zoology Nomenclature 47 (2) (1990) 126.
- [3] D. Stradling, Distribution and Behavioral Ecology of an Arboreal "Tarantula" Spider in Trinidad. Biotropica 26 (1) (1994) 84-97.
- [4] A.M Smith, Baboon Spiders. Tarantulas of Africa and the Middle East. Fitzgerald Publishing. (1990). London. 1: 142pp.
- [5] A. M. Smith, Tarantula Spiders: Tarantulas of the U.S.A. and Mexico. Fitzgerald Publishing. (1995). London, 196 pp.
- [6] R. Bertani, Revision, cladistic analysis, and zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*, with notes on other theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae). Arquivos de Zoologia, (36) (2001) 265-356.
- [7] N.A. Ratcliffe, M.M.A. Whitten Vector Immunity. In: Gillespie, S.H.; L. et al (Ed.). Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases. Cambridge: Cambridge University Press. 2005; 240-71.
- [8] A. Giuliani, G. Pirri, S. Nicoletto Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. Cent Eur J Biol 2 (2007) 1-33.
- [9] Andreu D, Rivas L Animal antimicrobial peptides: an overview. Biopolymers 47 (1998) 415-433
- [10] K.C.R. Takeuti, R.S.R Sayegh, R.L Melo, P.I. Silva Jr. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. Comp. Develop. Immunol. (in press).
- [11] K. Adachi, K. Wakamatsu, S. Ito, N Miyamoto, T. Kokubo, T. Nishioka, et al. An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis. Pigment Cell Res 18 (2005) 214-9.
- [12] E. Jaenicke, R. Foll, H. Decker. Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OHecdysone. J Biol Chem 274 (1999) 34267-71.
- [13] R.J. Paul, R. Pirow The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. Zoology 100 (1998) 298-306.
- [14] H. Decker, E. Jaenicke. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. Dev Comp Immunol 28 (2004) 673-87.
- [15] H. Decker, M. Ryan, E. Jaenicke, N. Terwilliger. SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and cancer magister. J Biol Chem 276 (2001) 17796-17799.
- [16] H. Decker, T. Rimk. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. J Biol Chem 273 (1998) 25889-25882.

- [17] T. Nagai, S-I. Kawabata. A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J Biol Chem* 275 (2000)29264–29267.
- [18] T. Nagai, T. Osaki, S-I. Kawabata. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 275 (2001) 27166–27170.
- [19] N. Jiang, N.S. Tan, B. Ho, J.L. Ding. Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy. *Nat Immunol* 8(10) (2007) 1114–1122.
- [20] D. Destoumieux-Garzón, D. Saulnier, J. Garnier, C. Jouffrey, P. Bulet, E. Bachère E. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J Biol Chem* 276 (2001) 47070–47077.
- [21] S.Y. Lee, B.L. Lee, K. Soderhall. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus Leniusculus*. *J Biol Chem* 278 (2003)7927–7933.
- [22] X.B. Zhang, C.H. Huang, Q.W. Qin. Antiviral properties of hemocyanin isolated from *Penaeus monodon*. *Antiviral Res* 61 (2004) 93–99.
- [23] K.Y. Lei, F. Li, M.C. Zhang, H.J Yang, T. Luo, X. Xu. Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense. *Dev Comp Immunol* 32 (7) (2008) 808–813.
- [24] Y.L Zhang, S.Y Wang, A.L Xu, Y. Chen, B.K. Lin, X.X. Peng. Affinity proteomic approach for identification of an IgA-like protein in *Litopenaeus vannamei* and study on its agglutination characterization. *J Proteome Res* 5 (2006)815–821.
- [25] R.F. Foelix. *Biology of Spiders*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts/London, 1996; 305pp.
- [26] Silva Jr, P.I. *Sistema Imune de Aracnídeos: Estrutura química e atividade de peptídeos antimicrobianos da Hemolinfa de *Acanthoscurria gomesiana**. [tese] São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 2000.
- [27] K. Söderhäll, V.J. Smith. Separation of the hemocyte population of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 7 (2) (1983) 229-239.
- [28] J. Markl, H. Decker. Molecular structure of the arthropod hemocyanins. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 13 (1992) 325-376.
- [29] F. Pérez-Miles, S.M. Lucas, P.I. Silva Jr, R. Bertani. Systematic revision and cladistic analysis of theraphosinae (Araneae: Theraphosidae). *Mygalomorph.* 1 (1996) 33-68.
- [30] R.C. West, S.D Marshall, C.S. Fukushima, R. Bertani. Review and cladistic analysis of the Neotropical tarantula genus *Euphebopus* Simon 1892 (Araneae: Theraphosidae) with notes on the Aviculariinae. *Zootaxa.* 1849 (2008) 35-58.

