

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE- SES-SP
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO – FUNDAP

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL - PAP

Soraia Maria do Nascimento

Moléculas biologicamente ativas da
hemolinfa de pupas de *Lonomia obliqua*

Monografia apresentada ao
Programa de Aprimoramento
Profissional - SES-SP,
elaborada no Instituto
Butantan

Área: Bioquímica

São Paulo
2015

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE- SES-SP
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS-CRH
GRUPO DE DESENVOLVIMENTO DE RECURSOS HUMANOS-GDRH
CENTRO DE FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS PARA O SUS
“Dr. Antonio Guilherme de Souza”
SECRETARIA DE ESTADO DA GESTÃO PÚBLICA
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO – FUNDAP

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL - PAP

Soraia Maria do Nascimento

Moléculas biologicamente ativas da
hemolinfa de pupas de *Lonomia obliqua*

Monografia apresentada ao
Programa de Aprimoramento
Profissional - SES-SP,
elaborada no Instituto
Butantan

Área: Bioquímica

Orientador: Dr. Pedro Ismael
da Silva Jr.

São Paulo
2015

RESUMO

Os insetos formam um grupo grande e diverso de animais. Eles vivem em quase todos os ecossistemas do planeta e essa ampla distribuição tem estimulado a pesquisa por moléculas bioativas entre eles. Vários estudos têm sido realizados demonstrando a presença de substâncias farmacologicamente ativas na hemolinfa dos insetos. A *Lonomia obliqua* é um inseto de importância médica, pois na sua fase larval possui cerdas urticantes com toxina que causa efeitos hemorrágicos. O veneno da *Lonomia* é bastante estudado, sendo que muitos dos seus componentes foram isolados e caracterizados. Na hemolinfa da *L. obliqua* já foram identificadas algumas moléculas como a lonofibrase, que tem ação fibrinogenolítica, e uma proteína de alto peso molecular que estimula a produção de proteínas recombinantes. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar moléculas bioativas presentes na hemolinfa de pupas da espécie citada. As pupas foram separadas nos grupos controle e experimental, que foi desafiado com a inoculação das bactérias Gram-negativa *Escherichia coli* e Gram-positiva *Micrococcus luteus*; 48 horas após a inoculação foi feita a coleta da hemolinfa de ambos os grupos. Separadamente, as amostras de hemolinfa coletadas dos grupos controle e experimental foram submetidas à extração ácida, pré-purificadas em colunas Sep-pak® C18 e purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência. As frações obtidas foram avaliadas quanto à presença de atividade antimicrobiana através da técnica de ensaio de inibição do crescimento em meio líquido. Foi escolhida uma fração, com atividade anti-*M. luteus* A270, entre todas as que apresentaram atividade antimicrobiana, esta foi avaliada por dosagem proteica, espectrometria de massas, sequenciamento “De novo”, buscas em bancos de dados utilizando-se a ferramenta Mascot® (Matrix Science), eletroforese em gel de poliacrilamida, ensaio hemolítico e imunodot blot. Os resultados obtidos indicaram que a molécula isolada das pupas de *L. obliqua* tem grande similaridade à lisozima encontrada na espécie de mariposa *Hyalophora cecropia*. Foram observados dois fragmentos com sequências de aminoácidos idênticas às encontradas na lisozima de *H. cecropia*: **CGLVQELR** e **DYGLFQINDK**. Sendo assim, a lisozima isolada das pupas de *L. obliqua* foi denominada Lyz_LonObl. Esta possui massa de 15 kDa e não provoca a hemólise de eritrócitos humanos. No experimento de imunodot blot

verificou-se que o anticorpo anti-lisozima de ovo galinha, que tem a capacidade de reconhecer e se ligar à uma lisozima do tipo C, não reconheceu a Lyz_LonObl, o que indica que esta é uma lisozima do tipo I, muito comum em invertebrados.

Palavras chave: *Lonomia obliqua*, hemolinfa, lisozima, insetos.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN : Acetonitrila

BCIP: 5-Bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate p-toluidine salt (Sal de 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato p-toluidina)

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DTT : Ditioneitol

HCl: Ácido clorídrico

IAA: Iodoacetamida

IgG: Imunoglobulina G

KCl: Cloreto de potássio

KH_2PO_4 : Fosfato de potássio monobásico

MgCl_2 : Cloreto de magnésio

NaCl: Cloreto de sódio

Na_2HPO_4 : Fosfato de sódio dibásico

NBT: Nitro blue tetrazolium (Tetrazólio nitroazul)

NH_4HCO_3 : Bicarbonato de amônia

PB: Poor broth (Meio de cultura pobre em nutrientes)

PBS: Phosphate buffered saline (Tampão Salino-Fosfato)

PTC: Phenylthiocarbamide (Feniltiocarbamida)

PTU: Phenylthiourea (Feniltiourea)

RPM: Rotações por minuto

SDS: Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)

TFA: Trifluoroacetic acid (Ácido trifluoracético)

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

λ : Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Espécie analisada: <i>Lonomia obliqua</i>	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
3.1. Obtenção das pupas	4
3.2. Indução das pupas	4
3.3. Coleta da hemolinfa	5
3.4. Extração ácida da hemolinfa total	5
3.5. Pré-purificação das amostras.....	5
3.6. Purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	6
3.7. Ensaio de inibição do crescimento em meio líquido.....	6
3.8. Dosagem proteica	7
3.9. Digestão proteica em solução	7
3.10. Espectrometria de Massas	8
3.11. Sequenciamento “De novo”	8
3.12. Buscas em bancos de dados: Mascot® (Matrix Science)	9
3.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida	9
3.14. Ensaio hemolítico	9
3.15. Immunodot blot.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4.1. Frações bioativas encontradas no grupo controle.....	11
4.2. Frações bioativas encontradas no grupo experimental	13
4.3. Repurificação e dosagem proteica da fração antimicrobiana	15
4.4. Análise por espectrometria de massas e sequenciamento “De novo”	16
4.5. Eletroforese	20
4.6. Ensaio hemolítico	21
4.7. Immunodot blot.....	23
5. CONCLUSÕES	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

Os insetos representam 55% de toda a biodiversidade da Terra e 85% de todos os animais conhecidos. Eles podem ser encontrados em quase todas as regiões do planeta, desde os polos até os desertos, e essa ampla distribuição tem estimulado a pesquisa por moléculas bioativas entre os insetos (Chernysh *et al.*, 2002; Greco, 2009a).

Vários estudos têm sido realizados demonstrando a presença de substâncias farmacologicamente ativas na hemolinfa de insetos, substâncias estas com efeitos enzimáticos, hormonais, ação imune, antibacterianos, antifúngicos e anticongelamento (Greco, 2009a). Sousa (2006) demonstrou que a hemolinfa de *Lonomia obliqua* possui moléculas que otimizam o cultivo de células do inseto *Spodoptera frugiperda*. Kanaya & Kobayashi (2000) isolaram e caracterizaram uma proteína presente na hemolinfa de *Bombyx mori* capaz de aumentar o título viral.

Algumas proteínas e peptídeos bioativos já estão sendo isolados de insetos. A purificação de peptídeos antimicrobianos vem recebendo atenção especial devido seu potencial uso como agentes terapêuticos (Greco, 2009a). Nakazawa *et al.* (2004) demonstraram em seu trabalho a atividade antiviral de uma serino-protease presente no suco digestivo de larvas de *Bombyx mori*. Ourth (2004) indicou que os peptídeos antivirais melitina e cecropina, isolados da hemolinfa de *Heliothis virescens*, inibiram a replicação do vírus da imunodeficiência humana, agindo como supressores da expressão gênica.

1.1. Espécie analisada: *Lonomia obliqua*

O gênero *Lonomia* pertence à ordem Lepidoptera, família Saturniidae e subfamília Hemileucinae. A maioria das espécies desse gênero distribue-se em regiões da América do Sul, mas também há registros de sua ocorrência no México e na América Central (Lorini, 1999), não sendo encontradas em outras partes do mundo. No Brasil, a *Lonomia obliqua* se distribui nos três estados da região sul do país (CIT, 1999).

Os insetos da ordem Lepidoptera, que compreendem borboletas e mariposas, quando na fase larval são conhecidos como taturanas, lagartas de fogo, entre outras denominações. Nesta fase muitas espécies são responsáveis por causar envenenamentos, cujos sintomas variam conforme a espécie envolvida, o grau de contato e a resposta individual da vítima. Os sintomas mais comuns são reações cutâneas, urticária, dor e sensação de queimadura no local de contato, mas também pode ocorrer náusea, dores de cabeça, febre, reações alérgicas, conjuntivite e, em casos mais raros, artrite, distúrbios da coagulação, hemorragias e insuficiência renal aguda (Diaz, 2005; Veiga, 2005).

O primeiro relato de acidente com lagartas no Brasil data de 1912 e envolveu um paciente que apresentou, entre outros sintomas, saliva sanguinolenta e hematúria, sintomas característicos de distúrbios no sistema hemostático, os quais duraram cerca de três dias. Entretanto, as lagartas que causaram esse acidente não foram identificadas na época (Veiga, 2005).

No final da década de 60 surgiram na América do Sul as primeiras publicações relatando casos de envenenamento devido ao contato com lagartas do gênero *Lonomia*, mais especificamente com a espécie *L. achelous* na Venezuela (Arocha-Pinango, 1967). No Brasil os primeiros relatos de acidentes com lagartas datam do final da década de 80, envolvendo a espécie *L. obliqua* na região sul (Duarte *et al.*, 1990; Veiga, 2005). A partir de 1989 os acidentes com *L. obliqua* nessa região do país assumiram proporções expressivas (CIT, 1999).

A *L. obliqua* é a lagarta que tem o veneno mais estudado, sendo que muitos dos seus componentes principais foram isolados e caracterizados. Entre eles duas proteínas: a Losac, ativadora do fator X da cascata de coagulação, e a Lopap, ativadora de protrombina (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2013).

Com relação à hemolinfa da *Lonomia obliqua* algumas moléculas já foram isoladas e caracterizadas. A Ionofibrase, por exemplo, é uma molécula com massa de 35 kDa que possui atividade fibrinogenolítica, ela cliva a ligação das cadeias $\alpha\beta$ da molécula de fibrinogênio (Fritzen *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2004; Veiga *et al.*, 2003). Uma molécula com atividade antiviral, com massa de 20 kDa, foi isolada da hemolinfa de *L. obliqua* e identificada como sendo ativa contra os vírus da

poliomielite, do sarampo e da gripe (Carmo *et al.*, 2012; Greco *et al.*, 2009b). Outro exemplo é uma proteína com ação antiapoptótica, com massa de 51 kDa, que é capaz de conferir proteção contra a fragmentação do DNA celular e retardar a morte das células de inseto (Sf-9) em cultivo (Souza *et al.*, 2005). Mendonça *et al.* (2008) identificaram uma proteína de alto peso molecular capaz de estimular a produção de proteínas recombinantes. A produção da glicoproteína G do vírus da raiva, expressa em células S2 de *Drosophila melanogaster*, foi aumentada em aproximadamente 59% sob a ação desta proteína isolada da hemolinfa da *L. obliqua*.

A *L. obliqua* é um animal que possui quatro estágios em seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos possuem coloração esverdeada e o período de incubação pode variar de 17 a 30 dias. Após a eclosão, as larvas passam por 6 estágios larvais (ínstares), período que pode variar de 50 a 80 dias e quando chegam a medir cerca de 7 centímetros. As lagartas empupam no solo sob restos de vegetação e o período de pupação pode oscilar de 46 a 92 dias, dependendo das condições do ambiente. Na fase de pupa pode ser observado dimorfismo sexual, sendo que o macho é menor do que a fêmea. Na fase adulta, as mariposas de *L. obliqua* têm hábito noturno e apresentam dimorfismo sexual, sendo o macho amarelado e de cores mais vivas do que a fêmea, que apresenta tonalidade pardorosa e tem tamanho maior. Os adultos vivem cerca de 15 dias e a ovipostura ocorre cerca de 7 dias após a cópula. O valor mínimo já registrado para o ciclo de vida de *L. obliqua* foi de quatro meses e meio e o valor máximo foi de oito meses e meio (CIT, 1999; Greco, 2009a; Lorini, 1999; Ministério da Saúde, 1998; Moraes, 1997; Veiga, 2005).

A Figura 1 mostra os quatro estágios do ciclo de vida da *Lonomia obliqua*:



Figura 1: Estágios do ciclo de vida da *Lonomia obliqua*. A) Primeiro estágio do ciclo de vida: ovos (Foto: Lorini & Corseuil, 2001), B) Segundo estágio: larva, C) Terceiro estágio: pupas (Fotos: Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2013) e D) Quarto e último estágio: fêmea adulta (Foto: Blog Faces da Biologia).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar moléculas bioativas presentes na hemolinfa de pupas da espécie *Lonomia obliqua*.

2.2. Objetivos específicos

- Purificar e isolar moléculas bioativas que estão presentes na hemolinfa de pupas de *L. obliqua*;
- Identificar e caracterizar tais moléculas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana destas moléculas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das pupas

As pupas de *Lonomia obliqua* utilizadas nesse estudo foram cedidas pelo Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, do Laboratório de Parasitologia e Entomologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

3.2. Indução das pupas

Vinte e uma pupas foram separadas para o grupo controle e não foram desafiadas. Quarenta e uma pupas formaram o grupo experimental e foram inoculadas com dois tipos de microrganismos: a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (SBS 363) e a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (A270), cepas obtidas da coleção do Instituto Pasteur, Paris.

Quatro alíquotas de cada um dos microrganismos citados, contendo uma concentração de 10^5 células/mL, foram misturadas e centrifugadas por 10 minutos a 14.000 RPM. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, uma agulha bem

fina foi passada no pellet de bactérias obtido e dessa forma foi feita a inoculação de cada pupa do grupo experimental.

3.3. Coleta da hemolinfa

Quarenta e oito horas após a indução das pupas do grupo experimental foi feita a coleta da hemolinfa de ambos os grupos. A extração da hemolinfa foi feita de três maneiras diferentes: coleta, pupa a pupa, com seringas apirogênicas, centrifugação das pupas e lavagem do corpo gorduroso com tampão PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4).

O conteúdo coletado de cada grupo foi armazenado em tubos contendo cristais de PTU/PTC, para evitar a ativação da cascata da fenoloxidase na hemolinfa. As amostras foram congeladas até o seu uso.

3.4. Extração ácida da hemolinfa total

A extração ácida da hemolinfa coletada de ambos os grupos foi feita para a extração de todo o conteúdo celular. Para isso, adicionou-se 30 mL de ácido acético 2 M à hemolinfa obtida de cada grupo, separadamente. A homogeneização foi feita num agitador magnético em banho de gelo durante 30 minutos. Após a homogeneização, foi feita a centrifugação das amostras durante 30 minutos, sob temperatura de 4 a 6°C a 16.000 xG. O sobrenadante foi coletado e congelado até o seu uso.

3.5. Pré-purificação das amostras

As amostras de hemolinfa foram pré-purificadas utilizando-se colunas de Sep-pak[®] C18 (5g) da marca Waters, uma coluna para cada grupo (controle e experimental). Para a ativação da resina das colunas utilizou-se metanol e a estabilização foi feita lavando-as com TFA 0,05%. Após a ativação e a estabilização das colunas, as amostras previamente acidificadas com TFA 0,01% foram aplicadas. Todo o material que não se ligou à resina foi coletado e denominado 0%. A

purificação da hemolinfa foi feita com eluições de 40 e 80% de ACN e as frações obtidas nessas eluições foram coletadas separadamente e denominadas 40 e 80%, respectivamente.

As amostras obtidas no processo de pré-purificação foram concentradas em centrífuga a vácuo refrigerada (Savant Instrument Inc) e congeladas até o seu uso.

3.6. Purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras obtidas na eluição com 40% de ACN na etapa de pré-purificação foram purificadas por CLAE. Para isso, elas foram reconstituídas com TFA 0,05%, centrifugadas a 16.000 xG por 5 minutos e a fração solúvel obtida foi aplicada numa coluna semi-preparativa de fase reversa Júpiter C18, utilizando-se o Sistema Shimadzu Prominence. A purificação foi realizada sob temperatura constante e a absorbância foi monitorada a 225 nm. Para a separação dos componentes da hemolinfa foi utilizado um gradiente de ACN (em água acidificada) de 2 a 60% durante 60 min, sob fluxo de 1,5 mL/min.

As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente, concentradas em centrífuga a vácuo refrigerada (Savant Instrument Inc), reconstituídas em água ultrapura MilliQ e congeladas até o uso.

A presença de atividade antimicrobiana nas frações foi verificada pelo método de ensaio de inibição do crescimento em meio líquido. A fração que apresentou atividade antimicrobiana foi repurificada por CLAE sob as mesmas condições citadas, mas utilizando-se um gradiente de ACN (em água acidificada) de 33 a 43% durante 60 min, sob fluxo de 1,5 mL/min.

3.7. Ensaio de inibição do crescimento em meio líquido

Para avaliar a atividade antimicrobiana das frações obtidas na etapa de purificação por CLAE foi utilizada a técnica de ensaio de inibição do crescimento em meio líquido seguindo o método descrito por Bulet *et al.* (1993).

O ensaio de inibição do crescimento foi feito em microplacas de 96 poços utilizando-se alíquotas de 20 µL de cada uma das frações, o volume de cada poço foi completado com 80 µL de meio de cultura PB (1% peptona; 0,5% NaCl; pH 7,4) contendo uma suspensão do microrganismo *Micrococcus luteus* (cepa A270) na fase logarítmica de crescimento e concentração final de 10^3 células/mL. Como controle negativo de crescimento microbiano foi empregado o antibiótico ampicilina em substituição às frações testadas. Para o controle positivo de crescimento foi utilizada água ultrapura MilliQ.

As placas foram incubadas em temperatura de 30°C durante 18 horas e sob agitação constante. O crescimento do microrganismo e a presença de atividade antimicrobiana das frações testadas foram avaliados pela medida de absorbância e avaliação da turbidez do meio em um leitor de microplaca Victor³ (1420 Multilabel Counter/Victor³ – Perkin Elmer) a 595 nm.

3.8. Dosagem proteica

A dosagem proteica da fração com atividade antimicrobiana foi feita utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop[®] 2000 (Thermo Scientific) de espectro completo (190 a 940 nm), com um comprimento de onda de 280 nm.

3.9. Digestão proteica em solução

O processo de digestão em solução foi feito seguindo o protocolo descrito por Stone & Willians (1996). Essa técnica realiza a redução e a alquilação dos resíduos de cisteína que podem estar presentes na molécula analisada. Além disso, dependendo da enzima que for utilizada, há a clivagem da cadeia peptídica em determinadas regiões. Neste caso foi utilizada a tripsina, que faz a clivagem de uma ligação peptídica adjacente a uma arginina ou uma lisina.

Aproximadamente 30 µg da amostra foram concentrados em centrífuga a vácuo refrigerada e reconstituídos em 20 µL da solução NH_4HCO_3 0,4 M; ureia 8 M. Foram adicionados 5 µL da solução DTT 45 mM e foi feita a incubação sob temperatura de 50°C durante 15 minutos. Após o resfriamento até a temperatura

ambiente, foram adicionados 5 µL da solução IAA 100 mM e a incubação foi feita sob temperatura ambiente e protegida da luz durante 15 minutos. Foram adicionados 130 µL de água ultrapura MilliQ para diluir a ureia para uma concentração de 1 M. Por fim, adicionou-se tripsina bovina (Sigma-Aldrich) na proporção 1/50 (enzima/proteína) e a incubação foi feita sob temperatura de 37°C por 24 horas. A ação da enzima foi interrompida com a adição da solução de TFA 0,1%.

Após o processo de digestão em solução foi feita a dessalinização da amostra utilizando-se ponteiras especiais ZipTip® (Merck Millipore), que possuem uma pequena coluna de fase reversa C18 em sua extremidade. A purificação foi feita com uma única eluição de 80% de ACN. A amostra foi concentrada numa centrífuga a vácuo e congelada até seu uso.

3.10. Espectrometria de Massas

A técnica de espectrometria de massas foi utilizada para avaliar a homogeneidade e a massa da fração que apresentou atividade antimicrobiana. Para isso, a amostra foi reconstituída em solução de ácido fórmico 0,1% e então aplicada no equipamento de espectrometria de massas.

A análise foi realizada por ESI-MS ("Electrospray Ionization - Mass Spectrometry") em um espectrômetro Q-TOF Ultima API (Waters Corporation) operando em modo positivo de ionização e acoplado a uma fonte de cromatografia líquida em nanoescala nano ACQUITY UltraPerformance LC® (Waters Corporation).

3.11. Sequenciamento “De novo”

A determinação da estrutura primária da amostra foi feita a partir da interpretação dos espectros de fragmentação obtidos na técnica de espectrometria de massas. Através da análise dos fragmentos “y” e “b” dos íons duplamente carregados da amostra, apresentados pelos espectros de fragmentação, foi possível elucidar a sequência de aminoácidos da molécula utilizando-se a técnica de sequenciamento “De novo” (Cantú *et al.*, 2008; Seidler *et al.*, 2010).

A interpretação desses espectros foi realizada com a ajuda do aplicativo “Peptide Sequencing” (MassLynX 4.1-Waters).

3.12. Buscas em bancos de dados: Mascot[®] (Matrix Science)

Com o intuito de verificar se a amostra analisada apresentava similaridade com alguma das moléculas já depositadas em diferentes bancos de dados foi utilizada a ferramenta de busca Mascot[®] (Matrix Science, London, United Kingdom).

3.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Com o objetivo de se verificar a homogeneidade e a massa da fração que apresentou atividade antimicrobiana foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo o método descrito por Laemmli (1970).

Foi utilizado o sistema Mini-PROTEAN III da BioRad[™]. A amostra foi diluída num tampão de amostra 4 vezes concentrado (40% glicerol; 50% Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 8% β-mercaptoetanol; 0,3 M SDS; 1 mM azul de bromofenol) e fervida a 90°C num termobloco durante 5 minutos. O material foi aplicado num gel de empilhamento 4,5% e gel de separação com concentração de 15% de poliacrilamida, a corrida foi feita em voltagem constante de 100 V e sob temperatura ambiente. O tampão de corrida utilizado foi composto por 25 mM Tris; 0,25 M glicina; 0,1% SDS; pH 8,3. Foi utilizado o marcador de peso molecular Fermentas (Page Ruler[™] Prestained Protein Ladder) como referência para os valores de massa.

O gel foi corado com azul de Comassie R-250 e descorado através da imersão contínua em solução de metanol/ácido acético/água na proporção 30:10:60 para a identificação das bandas proteicas.

3.14. Ensaio hemolítico

A fração que apresentou atividade antimicrobiana foi também testada contra eritrócitos humanos a fim de se verificar se ela possuía atividade hemolítica.

O sangue de um doador humano saudável foi coletado na presença de tampão citrato de sódio (150 mM; pH 7,4), centrifugado por 15 minutos a 700 xG, lavado três vezes com o mesmo tampão citado e ressuspenso em tampão PBS. A fração com atividade antimicrobiana, num volume de 20 µL, foi testada em triplicata em diluições seriadas numa microplaca de 96 poços com fundo em “U”. Foram adicionados 50 µL de uma solução 3% (v/v) de eritrócitos em tampão PBS. Como controle positivo, 100% de hemólise, foi utilizado o detergente Triton X-100 (0,1%) incubado com 50 µL da solução 3% de hemácias. Já como controle negativo, 0% de hemólise, foi utilizado o tampão PBS incubado com 50 µL da solução 3% de hemácias.

As amostras foram incubadas durante 1 hora a 37 °C. Após a incubação, a microplaca foi centrifugada por 5 minutos a 700 xG. O sobrenadante foi transferido para outra microplaca de 96 poços (sem fundo “U”) e usado para a medida de absorbância ($\lambda = 405 \text{ nm}$) em um leitor de microplaca Victor³ (1420 Multilabel Counter/Victor³ – Perkin Elmer).

O valor da absorbância a 405 nm foi determinado pela média da triplicata (Hao *et al.*, 2009). A porcentagem de hemólise foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{\text{Abs}_{405 \text{ nm}} \text{ da solução com peptídeo} - \text{Abs}_{405 \text{ nm}} \text{ em PBS}}{\text{Abs}_{405 \text{ nm}} \text{ em Triton } 0,1\% - \text{Abs}_{405 \text{ nm}} \text{ em PBS}} \times 100$$

3.15. Immunodot blot

A técnica de immunodot blot foi utilizada de acordo com o protocolo proposto por Salazar-Anton *et al.* (2012). Nessa técnica a amostra é aplicada diretamente na membrana de nitrocelulose e é incubada “overnight” à temperatura ambiente para secar e se aderir à membrana.

Após a secagem foi feito o bloqueio da membrana de nitrocelulose com solução de 5% de leite desnatado em PBS Tween 20% durante 1 hora sob agitação constante. O anticorpo primário empregado foi o anti-lisozima de ovo de galinha produzido em rato, este foi utilizado na proporção de 1:100, sendo diluído na solução

de 5% de leite desnatado em PBS Tween 20%. A membrana de nitrocelulose foi imersa nessa solução durante uma hora sob agitação. Após o tempo de incubação, foi feita a lavagem da membrana por três vezes durante 10 minutos em PBS Tween 20%. Foi utilizado o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG conjugado à fosfatase alcalina (marca Promega) na proporção de 1:10000, esse anticorpo foi diluído na solução de PBS Tween 20%. A incubação com o anticorpo secundário foi feita durante uma hora sob agitação constante. A membrana foi novamente lavada por três vezes durante 10 minutos em PBS Tween 20%.

A revelação da membrana foi feita utilizando-se uma solução contendo 99,01% de tampão para revelação (Tris/HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM); 0,66% de solução de NBT (60 mM dissolvidos em dimetilformamida 99%); e 0,33% de solução de BCIP (100 mM dissolvidos em dimetilformamida 69,3%). Quando houve o aparecimento de bandas coloridas a revelação foi interrompida com água deionizada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Frações bioativas encontradas no grupo controle

A partir das pupas do grupo controle foram obtidos 6,5 mL de hemolinfa, os quais foram submetidos à extração ácida e pré-purificação em coluna de Sep-pak[®] C18, com eluições de 40 e 80% de ACN. A fração obtida na eluição com 40% de ACN foi purificada utilizando-se a técnica de CLAE, numa coluna de fase reversa Júpiter C18 e com gradiente de ACN de 2 a 60% durante 60 min. Na purificação por CLAE foram obtidas 68 frações, que foram avaliadas quanto à presença de atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (cepa A270) através da técnica de ensaio de inibição do crescimento em meio líquido.

A Figura 2 mostra o perfil cromatográfico da purificação da hemolinfa do grupo controle e as respectivas frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *M. luteus* A270.

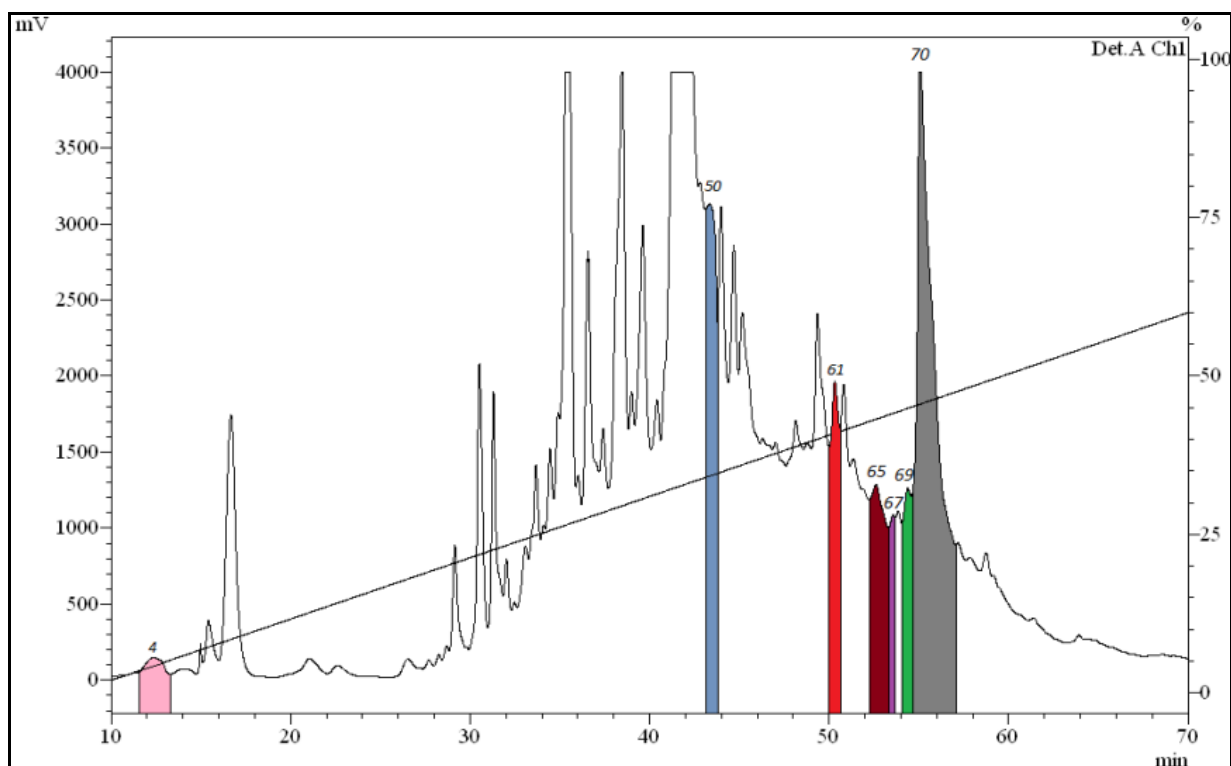


Figura 2: Perfil cromatográfico da purificação da hemolinfa do grupo controle. Cada um dos picos representados na imagem corresponde a uma fração que foi coletada separadamente. As frações 4 (cor-de-rosa), 50 (azul), 61 (vermelha), 65 (vinho), 67 (lilás), 69 (verde) e 70 (cinza) apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus* (A270).

Na hemolinfa do grupo controle foram identificadas 7 frações com atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus* (A270). Por terem sido detectadas no grupo controle, essas moléculas com atividade antimicrobiana são aparentemente constitutivas, ou seja, elas são previamente produzidas pelas pupas de *L. obliqua* sem que haja uma infecção.

A existência de moléculas antimicrobianas constitutivas é bastante conhecida entre os aracnídeos (aranhas, escorpiões e carrapatos) e entre os limúlídeos (Sayegh, 2011). Silva Jr. (2000) identificou na hemolinfa da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana* a gomesina, um peptídeo com amplo espectro de atividade antimicrobiana e que é produzido de forma constitutiva pelo animal. Riciluca *et al.* (2012) isolou da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria rondoniae* um peptídeo com atividade antifúngica denominado rondonina, peptídeo este que é derivado da porção C-terminal da subunidade D da molécula de hemocianina. Em

trabalho realizado por Sayegh (2011) observou-se que no opilião *Acutisoma longipes* há a presença de diversas moléculas com atividade antimicrobiana. Essas moléculas foram obtidas de animais que não foram desafiados com a aplicação de microrganismos, o que indica que tais moléculas são produzidas constitutivamente pelas espécies.

A maior parte dos estudos com insetos indica que a produção de moléculas com propriedades antimicrobianas ocorre após uma infecção. No entanto, em estudo realizado por Lamberty *et al.* (2001) verificou-se que no cupim *Pseudocanthotermes spiniger* há a presença constitutiva do peptídeo antimicrobiano termicina, que possui elevada atividade antifúngica. Assim como foi observado nesta espécie de cupim, em pupas de *L. obliqua* também há a presença constitutiva de moléculas antimicrobianas.

4.2. Frações bioativas encontradas no grupo experimental

A partir das pupas do grupo experimental foram obtidos 14,5 mL de hemolinfa, os quais foram submetidos à extração ácida e pré-purificação em coluna de Sep-pak[®] C18, com eluições de 40 e 80% de ACN. A fração obtida na eluição com 40% de ACN foi purificada utilizando-se a técnica de CLAE, numa coluna de fase reversa Júpiter C18 e com gradiente de ACN de 2 a 60% durante 60 min. Na purificação por CLAE foram obtidas 58 frações, que foram avaliadas quanto à presença de atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (cepa A270) através da técnica de ensaio de inibição do crescimento em meio líquido.

A Figura 3 mostra o perfil cromatográfico da purificação da hemolinfa do grupo experimental e as respectivas frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *M. luteus* A270.

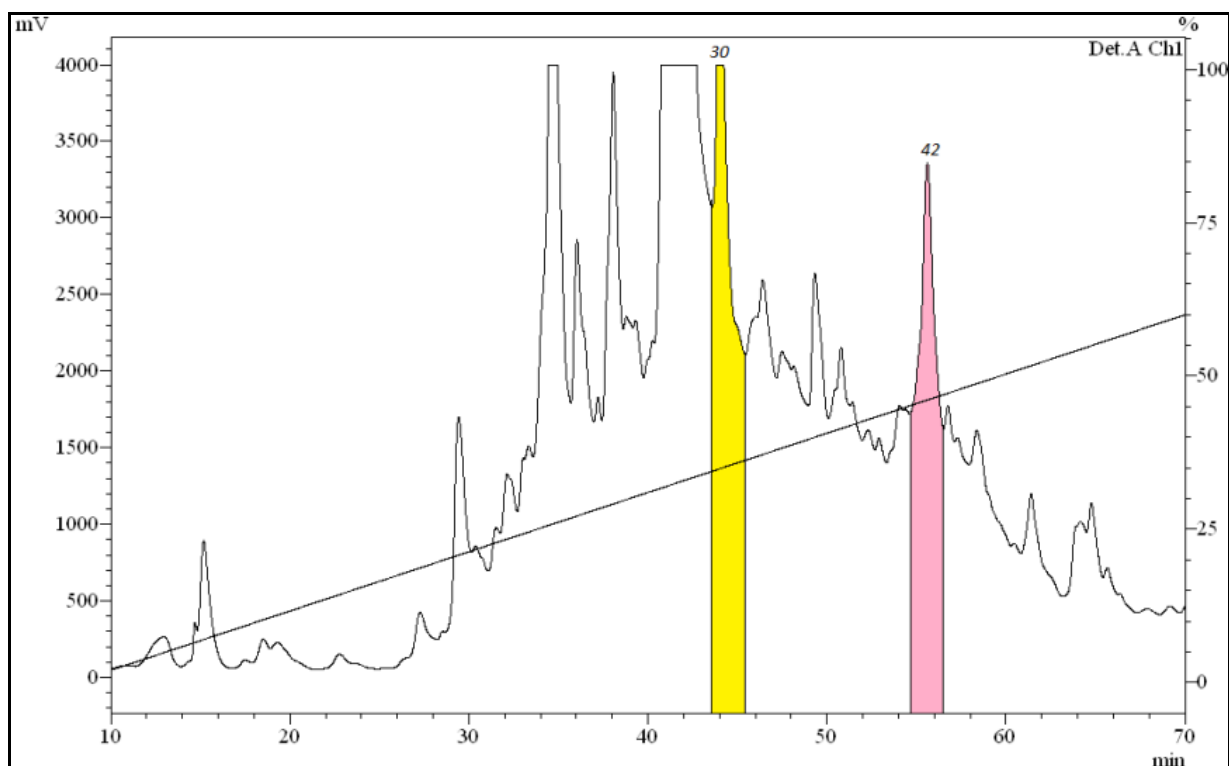


Figura 3: Perfil cromatográfico da purificação da hemolinfa do grupo experimental. Cada um dos picos representados na imagem corresponde a uma fração que foi coletada separadamente. As frações 30 (amarela) e 42 (cor-de-rosa) apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus* (A270).

Apenas duas frações do grupo experimental apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (cepa A270), ou seja, foram encontradas mais moléculas com atividade antimicrobiana no grupo controle do que no grupo experimental.

Dados observados na literatura apontam que em insetos ocorre um aumento na produção de moléculas com propriedades antimicrobianas algumas horas após injúrias e infecções (Engström, 1998; Hoffmann *et al.*, 1996; Manetti *et al.*, 1998). As atacinas e as cecropinas, por exemplo, são moléculas antimicrobianas que têm sua produção induzida em pupas de *Hyalophora cecropia* após a infecção por bactérias (Vargas-Albores & Ortega-Rubio, 1994). Lourenço (2007) observou que na espécie *Apis mellifera*, após a injúria causada pela injeção de microrganismos, ocorre aumento da ativação de genes relacionados à produção de peptídeos antimicrobianos e da Transferrina, uma proteína transportadora de ferro. Em

trabalho realizado por Tzou *et al.* (2002) foi identificado que durante uma infecção sistêmica a espécie *Drosophila melanogaster* apresenta um aumento da produção e secreção de peptídeos antimicrobianos e outras moléculas efetoras.

Sendo assim, a pequena quantidade de moléculas com atividade antimicrobiana identificada na hemolinfa do grupo experimental pode ser devido à baixa concentração das frações, o que pode ter mascarado o efeito antimicrobiano das mesmas.

4.3. Repurificação e dosagem proteica da fração antimicrobiana

Dentre todas as moléculas dos dois grupos (controle e experimental) que apresentaram atividade antimicrobiana uma delas foi escolhida e repurificada: a fração 61 do grupo controle, pico representado em vermelho na Figura 2. Esta fração foi repurificada por CLAE numa coluna de fase reversa Júpiter C18 com gradiente de ACN (em água acidificada) de 33 a 43% durante 60 min, sob fluxo de 1,5 mL/min. Nesta segunda etapa de purificação por CLAE foi identificada uma fração que continuou a apresentar atividade antimicrobiana contra a bactéria *M. luteus* A270.

A Figura 4 mostra o perfil cromatográfico obtido na segunda etapa de purificação da fração 61 e a fração que ainda apresentou atividade antimicrobiana.

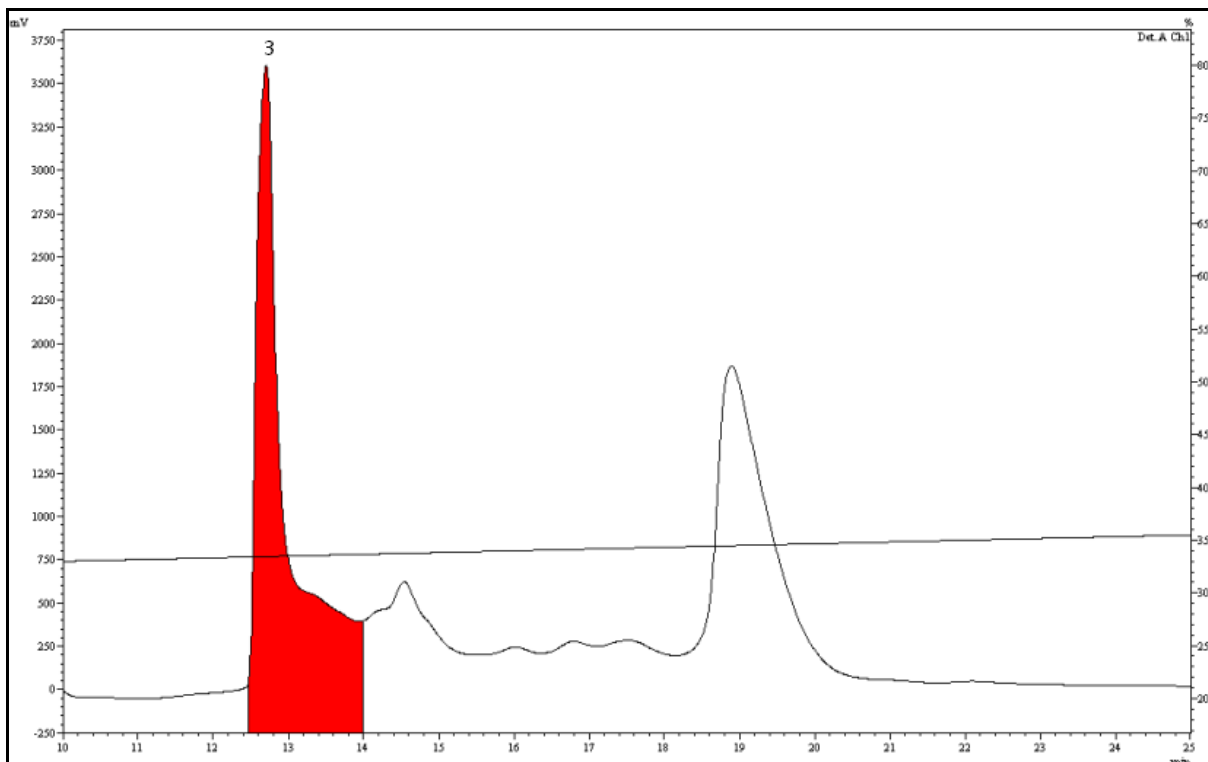


Figura 4: Perfil cromatográfico da segunda etapa de purificação da fração 61 do grupo controle. Cada um dos picos representados na imagem corresponde a uma fração que foi coletada separadamente. A fração 3 (em vermelho) foi a única que continuou apresentando atividade antimicrobiana contra *M. luteus* após o processo de repurificação.

A fração 3, única que continuou apresentando atividade antimicrobiana contra a bactéria *M. luteus* (A270), foi denominada “fração 61_3”. Tal fração foi analisada no espectrofotômetro NanoDrop[®] 2000 (Thermo Scientific), utilizando-se o comprimento de onda de 280 nm. A dosagem proteica obtida foi de 1,608 µg/µL.

4.4. Análise por espectrometria de massas e sequenciamento “De novo”

A fração 61_3 foi submetida ao processo de digestão em solução, analisada por espectrometria de massas e submetida a buscas em bancos de dados utilizando a ferramenta Mascot[®] (Matrix Science). A análise em diferentes bancos de dados revelou que a fração 61_3 é bastante semelhante à lisozima encontrada na mariposa *Hyalophora cecropia*, possuindo dois fragmentos com sequências de aminoácidos idênticas: **CGLVQELR** e **DYGLFQINDK**.

A Figura 5 indica o resultado da análise em bancos de dados feita utilizando a ferramenta Mascot® e a Figura 6 mostra a espécie *H. cecropia*.

{MATRIX} SCIENCE Mascot Search Results

Match to: P05105 Score: 50
Lysozyme OS=Hyalophora cecropia PE=2 SV=2
Found in search of Banda_L2.pkl
Taxonomy: [Hyalophora cecropia](#)

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MTKYVILLAV LAFALHCDK RFTHCGLVQE LRRLGFDETL MSNWVCLVEN
51 ESGRFTDKIG KVNKNGSRDY GLFQINDKW CSKGTTPGKD CNVTCNQLLT
101 DDISVAATCA KKIYKRHKFD AWYGWKNHCQ HGLPDISDC
```

Figura 5: Resultado obtido nas buscas em diferentes bancos de dados utilizando a ferramenta Mascot® (Matrix Science). A fração 61_3 possui similaridade com a lisozima encontrada na mariposa *H. cecropia*. As duas sequências destacadas com os retângulos verdes são as sequências idênticas encontradas tanto na lisozima de *H. cecropia* quanto na de *L. obliqua*. Esta sequência de aminoácidos descrita para a lisozima de *H. cecropia* está depositada no banco de dados Swiss-Prot.



Figura 6: Macho da espécie *Hyalophora cecropia* (Foto: Stan Malcolm Photos).

A partir do resultado obtido no banco de dados Swiss-Prot foi feito o sequenciamento “De novo” da fração 61_3. Assim, foi possível confirmar que as sequências **CGLVQELR** e **DYGLFQINDK**, idênticas às encontradas na lisozima da espécie *H. cecropia*, realmente são encontradas na lisozima que foi isolada das pupas da espécie *L. obliqua*. Diante da confirmação dos resultados, a fração 61_3 foi então denominada “Lyz_LonObl” (lisozima de *Lonomia obliqua*).

As Figuras 7 e 8 mostram o sequenciamento “De novo” feito utilizando-se o aplicativo “Peptide Sequencing” (MassLynX 4.1-Waters).

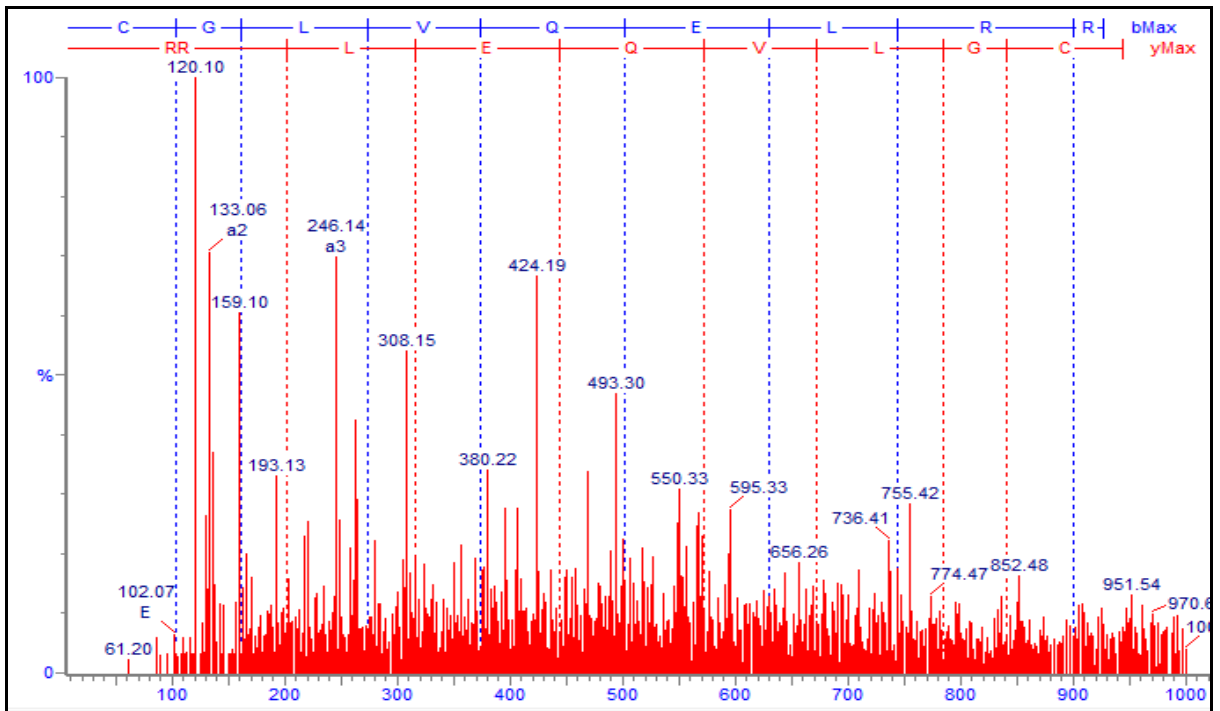


Figura 7: Sequenciamento "De novo" da Lyz_LonOb1: a seqüência CGLVQELR foi identificada na amostra. Esta seqüência é idêntica à encontrada na lisozima de *H. cecropia*.

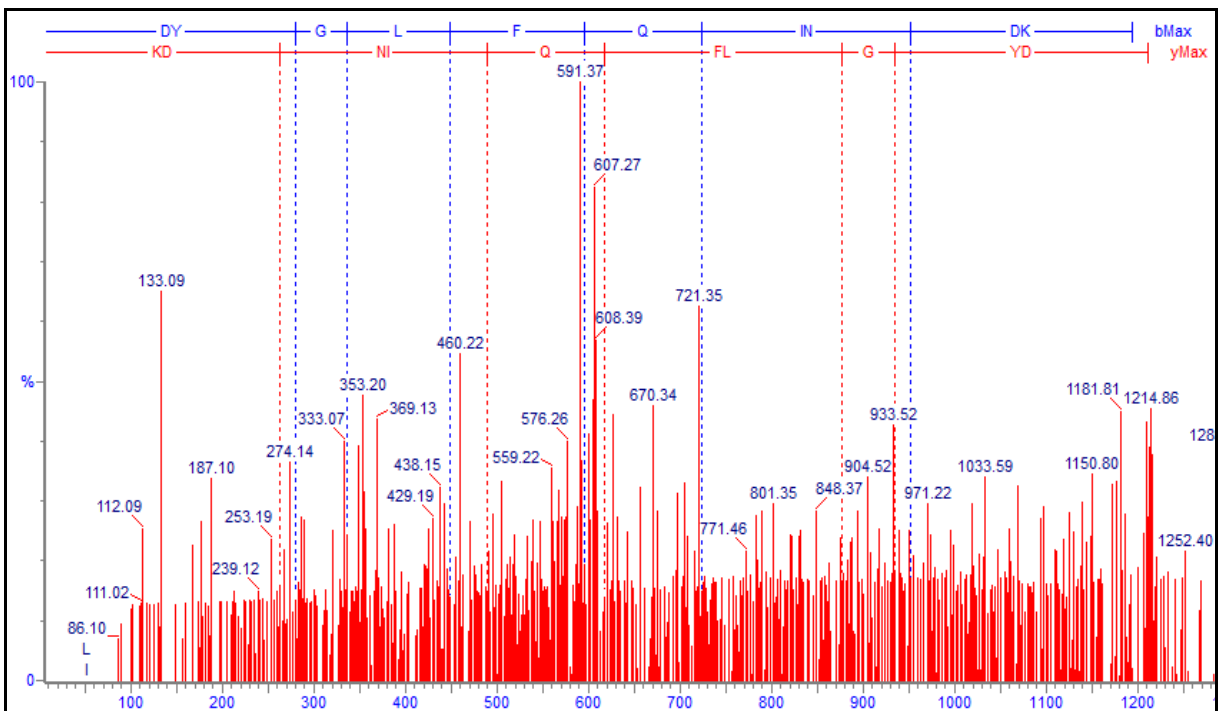


Figura 8: Sequenciamento "De novo" da Lyz_LonOb1: a seqüência DYGLFQINDK foi identificada na amostra. Esta seqüência é idêntica à encontrada na lisozima de *H. cecropia*.

A lisozima foi descoberta em 1921 pelo bacteriologista escocês Alexander Fleming. Ele observou que uma gota de muco nasal, que acidentalmente caiu sobre uma placa de ágar, causou a lise das bactérias presentes nessa placa. Isso o levou à detecção de um "elemento bacteriolítico marcante", que mais tarde chamou de lisozima (Callewaert & Michiels, 2010).

As lisozimas são enzimas hidrolíticas caracterizadas pela sua capacidade de clivar a ligação β -(1,4)-glicosídica entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina no peptidoglicano, o principal polímero da parede celular bacteriana. Esse polímero determina a forma das células e proporciona uma proteção contra a pressão celular. Sendo assim, a perda de integridade do peptidoglicano resulta na lise celular rápida e, conseqüentemente, morte do microrganismo (Callewaert & Michiels, 2010).

Uma grande variedade de lisozimas, que diferem em peso molecular, sequência de aminoácidos e propriedades enzimáticas, foram descritas desde o primeiro relato de Fleming sobre lisozimas presentes em tecido humano, animal e vegetal (Jollès & Jollès, 1984; Ruas, 2010). As lisozimas são amplamente distribuídas na natureza, sendo conhecidas principalmente pelo seu papel na defesa do organismo contra infecções. Porém, em alguns animais elas também desempenham um importante papel na digestão, como nos ruminantes, que possuem uma câmara de fermentação em seu tubo digestivo, e em alguns insetos que se alimentam de bactérias presentes em material em decomposição. Em ambos os casos as lisozimas quebram a parede bacteriana facilitando a liberação dos componentes celulares (Cançado *et al.*, 2007; Marana *et al.*, 2006; Ruas, 2010)

Nos insetos as lisozimas foram as primeiras moléculas antimicrobianas a serem purificadas a partir da hemolinfa (Powning & Davison, 1976; Vargas-Albores & Ortega-Rubio, 1994). Normalmente a lisozima é encontrada na hemolinfa da larva de *Hyalophora cecropia*, mas está ausente na pupa. No entanto, a produção de lisozima pelas pupas, juntamente com as cecropinas e as atacinas, pode ser induzida após a inoculação de bactérias (Sun *et al.*, 1991; Vargas-Albores & Ortega-Rubio, 1994).

Diferentemente do que ocorre *H. cecropia*, na espécie *L. obliqua* foi observado que a lisozima é produzida nas pupas mesmo sem a inoculação de microrganismos, já que a lisozima foi isolada da hemolinfa de pupas que não foram desafiadas. Sendo assim, em *L. obliqua* a lisozima é uma molécula constitutiva do seu sistema imune.

4.5. Eletroforese

Para verificar a massa e a homogeneidade da Lyz_LonObl foi utilizada a técnica de eletroforese baseada no método descrito por Laemmli (1970).

Num gel com concentração de 15% de poliacrilamida foram aplicados, aproximadamente, 16 µg da amostra Lyz_LonObl. A Figura 9 mostra o gel corado com azul de Comassie R-250 e as bandas proteicas identificadas.

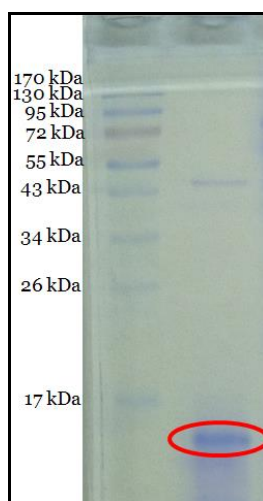


Figura 9: Gel de poliacrilamida (15%) contendo a amostra Lyz_LonObl, que corresponde à banda circulada em vermelho (15 kDa). Os valores de referência de massa correspondem ao marcador de peso molecular Fermentas (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder).

Foi identificada uma banda majoritária com massa de aproximadamente 15 kDa, que corresponde à Lyz_LonObl. No trabalho realizado por Vargas-Albores & Ortega-Rubio (1994) foi observado que lisozima da espécie *Hyalophora cecropia*, que apresentou grande similaridade à Lyz_LonObl, possui massa de 13,8 kDa.

Em outras espécies animais a molécula de lisozima possui massa semelhante à Lyz_LonObl. A Tabela 1 mostra alguns exemplos de lisozimas isoladas de diferentes espécies animais e suas respectivas massas.

Tabela 1: Diferentes tipos de lisozimas isoladas em animais e suas respectivas massas. Dados obtidos no banco de dados UniProtKB.

Espécie	Tipo de lisozima	Massa (em kDa)
<i>Anas platyrhynchos</i>	C-1	16
<i>Crassostrea virginica</i>	2	14
<i>Drosophila melanogaster</i>	X	15
<i>Homo sapiens</i>	C	16
<i>Mus musculus</i>	C-2	16
<i>Musca domestica</i>	1	15
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	C II	15
<i>Sus scrofa</i>	C-3	16

Todas as lisozimas citadas na Tabela 1 possuem ação bacteriolítica e massa semelhante, o que indica que ela é uma molécula bastante conservada em diferentes espécies.

4.6. Ensaio hemolítico

Com a Lyz_LonObl também foi feito o ensaio hemolítico a fim de se verificar se a mesma possuía citotoxicidade contra eritrócitos humanos. A amostra foi testada em triplicata numa concentração inicial de 32,16 µg, pois foi nesta concentração que foi observada a atividade antimicrobiana. A partir desta concentração foram feitas 9 diluições seriadas. A média dos valores de absorbância obtidos em cada uma das concentrações testadas foi usada para calcular a porcentagem de hemólise.

O Gráfico 1 indica que a Lyz_LonObl não causa o rompimento dos eritrócitos humanos, pois em todas as concentrações testadas a porcentagem de hemólise permaneceu em 0%.

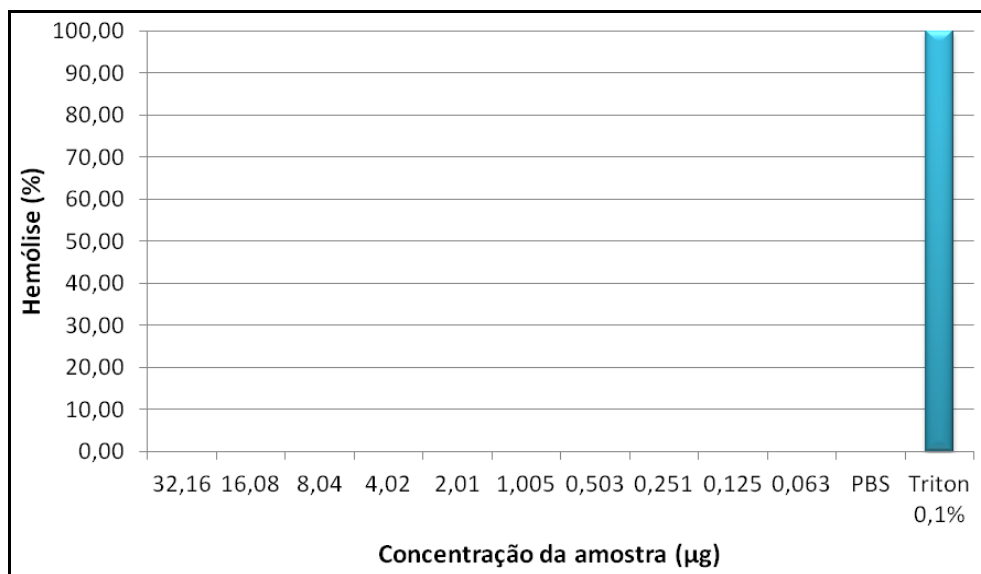


Gráfico 1: Valores obtidos no ensaio hemolítico realizado com a Lyz_LonObl em diferentes concentrações. O tampão PBS é o controle negativo, ou seja, que não causa hemólise. O tampão Triton X-100 0,1% foi usado como controle positivo, que causa 100% de hemólise.

A Figura 10, abaixo, também mostra o resultado final do ensaio hemolítico. Os “botões” observados no fundo dos poços indicam que os eritrócitos humanos permaneceram intactos e que, portanto, a Lyz_LonObl não possui atividade hemolítica.

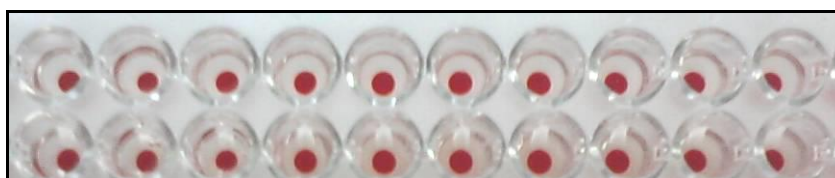


Figura 10: Foto da microplaca onde foi realizado o ensaio hemolítico com a Lyz_LonObl. É possível notar que os eritrócitos humanos estão conservados (Foto: Soraia M. Nascimento).

Devido ao fato de que a lisozima é uma molécula bastante conservada entre diferentes espécies, já era esperado que a Lyz_LonObl não causasse a hemólise dos eritrócitos humanos.

Dados encontrados na literatura mostram que lisozimas isoladas de diferentes espécies também não apresentaram efeito citotóxico contra as células com as quais foram testadas. Ruas (2010) avaliou a toxicidade da lisozima isolada do ovo de

galinha (Hen egg white lysozyme) em cultura de células de fibroblastos (ATCC CCL-92) e observou que a lisozima não apresentou efeito citotóxico. Fernandes *et al.* (2004) isolaram e caracterizaram a lisozima C II da pele da espécie *Oncorhynchus mykiss* e observaram que esta lisozima não causa a hemólise dos eritrócitos de truta.

4.7. Immunodot blot

A fim de se comparar a Lyz_LonObl com lisozimas de outros insetos foi utilizada a técnica de immunodot blot. Foi utilizada a hemolinfa dos insetos *Leurolestes circumvagans* (barata redonda), *Tenebrio molitor* (tenébrio comum) e *Podalia* sp. (lagarta-bugia), que estão representados na Figura 11:



Figura 11: Insetos dos quais foi extraída hemolinfa para o experimento de immunodot blot. A) *Leurolestes circumvagans*, B) *Tenebrio molitor* (Fotos: Soraia M. Nascimento) e C) *Podalia* sp. em sua fase larval (Foto: Renato Rizzaro).

Uma alíquota da hemolinfa de cada um destes insetos foi aplicada numa membrana de nitrocelulose. Na mesma membrana também foram aplicados 16 µg de Lyz_LonObl e 0,1 µg de lisozima isolada de ovo de galinha. O anticorpo primário utilizado foi o anti-lisozima de ovo de galinha produzido em rato, na proporção de 1:100. Já o anticorpo secundário utilizado foi o anti-mouse IgG conjugado à fosfatase alcalina (marca Promega), na proporção de 1:10000.

A revelação da membrana indicou que houve o reconhecimento da lisozima presente na hemolinfa dos três insetos testados e também da lisozima extraída do ovo de galinha. No entanto, a Lyz_LonObl não foi reconhecida pelo anticorpo anti-lisozima de ovo de galinha produzido em rato. A Figura 12 mostra o resultado obtido após a revelação da membrana de nitrocelulose:

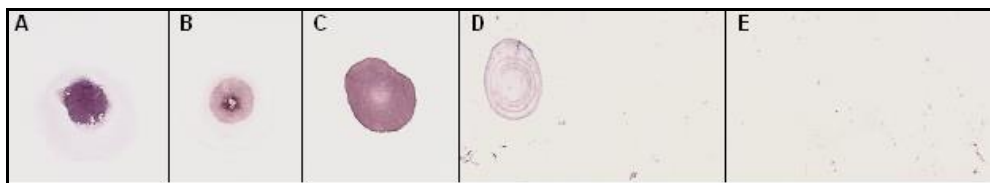


Figura 12: Membrana de nitrocelulose utilizada na técnica de immunodot blot após a revelação. A) hemolinfa de *Leurolestes circumvagans*, B) hemolinfa de *Tenebrio molitor*, C) hemolinfa de *Podalia* sp., D) lisozima extraída de ovo de galinha e E) Lyz_LonObl. A coloração roxa indica que o anticorpo anti-lisozima de ovo de galinha produzido em rato reconheceu e se ligou à lisozima presente nas amostras.

As lisozimas ocorrem em todos os principais táxons de organismos vivos (Callewaert & Michiels, 2010). Com base nas diferenças na sequência de aminoácidos, assim como nas propriedades bioquímicas e enzimáticas, as lisozimas podem ser classificadas em vários tipos e cada tipo tem uma distribuição filogenética (Herreweghe & Michiels, 2012). No reino animal, três tipos principais de lisozimas foram identificados: tipo C (**ch**icken ou **con**ventional-type), tipo G (**g**oose-type) e tipo I (**i**nvertebrate-type). A análise da distribuição filogenética revela que as lisozimas do tipo C são predominantes no filo Chordata e em diferentes classes do filo Arthropoda, estando presentes em várias espécies de lepidópteros, dípteros, isópteros e insetos hemípteros, além de aracnídeos e crustáceos. Além disso, verificou-se que em todos os genomas de insetos completamente sequenciados há a presença genes codificadores de lisozimas tipo I, sugerindo que estas enzimas são comuns ou até mesmo universalmente presentes em insetos (Callewaert & Michiels, 2010).

A existência da lisozima tipo I, de invertebrados, foi proposta pela primeira vez em 1975, com base na comparação de uma lisozima isolada de invertebrados marinhos com outros tipos de lisozimas conhecidas na época, como de frango, ganso e de um fago (Jollès & Jollès, 1975). Apenas em 1999 foi confirmado que as lisozimas do tipo I são exclusivas de invertebrados e amplamente distribuídas ao longo de diferentes filios, incluindo moluscos, anelídeos, equinodermos e nematóides (Ito *et al.*, 1999).

As lisozimas do tipo I possuem uma elevada quantidade de pontes dissulfeto em sua estrutura. Em 35 lisozimas estudadas, pertencentes a diferentes filios de

invertebrados, foi observada a conservação quase completa de 14 resíduos de cisteína e todos estes resíduos estão envolvidos na formação de pontes dissulfeto. Este elevado número de pontes distingue as lisozimas do tipo I das demais lisozimas do tipo C e do tipo G (Herreweghe & Michiels, 2012).

Como já citado anteriormente, dados disponíveis na literatura mostram que em insetos podem ser encontradas as lisozimas dos tipos C e I (Callewaert & Michiels, 2010). Além disso, a lisozima de ovo de galinha é uma lisozima do tipo C (Herreweghe & Michiels, 2012). Sendo assim, o anticorpo primário anti-lisozima de ovo de galinha produzido em rato, utilizado no experimento de imunodot blot, tem a capacidade de reconhecer e se ligar à uma lisozima do tipo C. No experimento de imunodot blot foi utilizada a hemolinfa total dos insetos *Leurolestes circumvagans*, *Tenebrio molitor* e *Podalia* sp, enquanto que a lisozima isolada de pupas de *L. obliqua* (Lyz_LonObl) foi utilizada pura. O anticorpo utilizado, tendo a capacidade de reconhecer uma lisozima do tipo C, pode ter reconhecido e se ligado à lisozimas do tipo C que estavam presentes na hemolinfa dos insetos utilizados. Como não houve o reconhecimento da Lyz_LonObl pelo anticorpo anti-lisozima de ovo de galinha é possível afirmar que ela é uma lisozima do tipo I, comum em invertebrados.

5. CONCLUSÕES

A partir da hemolinfa das pupas de *Lonomia obliqua* foram purificadas, ao todo, 9 frações com atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (cepa A270). Duas destas frações foram obtidas do grupo que foi desafiado com a aplicação de microrganismos (experimental) e sete frações foram obtidas do grupo controle. Era esperado que uma maior quantidade de moléculas com atividade antimicrobiana fosse isolada do grupo experimental, já que dados da literatura afirmam que em insetos há um aumento na produção de peptídeos e proteínas antimicrobianas após a inoculação de microrganismos. No entanto, o pequeno número de moléculas antimicrobianas identificadas do grupo experimental pode ser devido à baixa concentração das frações obtidas na etapa de purificação, o que pode ter mascarado o potencial antimicrobiano das amostras.

Uma molécula isolada do grupo controle foi escolhida entre todas as que apresentaram potencial antimicrobiano e analisada mais detalhadamente. Por ter sido encontrada no grupo controle é possível afirmar que esta é uma molécula constitutiva, ou seja, ela é sintetizada pelas pupas de *Lonomia obliqua* mesmo sem haver uma infecção prévia.

A análise por espectrometria de massas e as buscas em bancos de dados utilizando a ferramenta Mascot[®] mostraram que a molécula escolhida possui grande similaridade à lisozima encontrada na mariposa *Hyalophora cecropia*, que possui sequência completa depositada no banco de dados Swiss-Prot. Através do sequenciamento “De novo” foi possível confirmar que as sequências de aminoácidos **CGLVQELR** e **DYGLFQINDK**, idênticas à duas sequências encontradas na lisozima da espécie *H. cecropia*, realmente estão presentes na lisozima que foi isolada das pupas de *Lonomia obliqua*, que foi então denominada Lyz_LonObl.

Através da técnica de eletroforese foi possível determinar que a massa da Lyz_LonObl é de 15 kDa, que é muito semelhante à massa da lisozima de *H. cecropia*, que possui 13,8 kDa. Lisozimas de outras espécies animais também possuem a mesma atividade antimicrobiana e massa semelhante.

No ensaio hemolítico foi observado que a Lyz_LonObl não causa a hemólise de eritrócitos humanos na concentração em que foi testada, a mesma concentração

na qual apresentou atividade antimicrobiana contra *M. luteus* (A270). Esse resultado já era esperado, já que a lisozima é uma molécula bastante conservada entre as diferentes espécies animais.

No experimento de imunodot blot o anticorpo utilizado, o anti-lisozima de ovo de galinha produzido em rato, não reconheceu a Lyz_LonObl. Este anticorpo é capaz de reconhecer uma lisozima do tipo C e, portanto, não reconheceu a Lyz_LonObl porque, provavelmente, esta é uma lisozima do tipo I, comum em invertebrados.

As lisozimas são enzimas hidrolíticas caracterizadas pela sua capacidade de clivar a ligação β -(1,4)-glicosídica entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina no peptidoglicano, o principal polímero da parede celular bacteriana. As lisozimas são, portanto, moléculas muito importantes para o sistema de defesa dos invertebrados contra infecções por bactérias Gram-positivas, já que a imunidade adaptativa é ausente em invertebrados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arocha-Piñango, C. L. 1967. Fibrinólisis producida por contacto con orugas: comunicación preliminar. **Acta Científica Venezolana**. **18**. 136-139.

Blog Faces da Biologia. 2013. **Lonomia**. Disponível em: <http://facesdabiologia.blogspot.com.br/2012/05/lonomia.html>. Acessado em: 14/02/2014.

Bulet, P.; Dimarcq, J. L.; Hetru, C.; Lagueux, M.; Charlet, M.; Hegy, G.; Van Dorsselaer, A. & Hoffmann, J. A. 1993. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. **The Journal of Biological Chemistry**. **268**. (20): 14893-14897.

Callewaert, L. & Michiels, C. W. 2010. Lysozymes in the animal kingdom. **Journal of Biosciences**. **35**. (1): 127-160.

Cançado, F. C., Valério, A. A.; Marana, S. R. & Barbosa, J. A. R. G. 2007. The crystal structure of a lysozyme c from housefly *Musca domestica*, the first structure of a digestive lysozyme. **Journal of Structural Biology**. **160**. (1): 83-92.

Cantú, M. D.; Carrilho, E.; Wulff, N. A. & Palma, M. S. 2008. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**. **31**. (3): 669-675.

Carmo, A. C.; Giovanni, D. N.; Corrêa, T. P.; Martins, L. M.; Stocco, R. C.; Suazo, C. A.; Moraes, R. H.; Veiga, A. B. & Mendonça, R. Z. 2012. Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. **Antiviral Research**. **94**. (2): 126-130.

Chernysh, S.; Kim, S. I.; Bekker, G.; Pleskach, V. A.; Filatova, N. A.; Anikin, V. B.; Platino, V. G. & Bulet, P. 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. **99**. (20): 12628-12632.

Chudzinski-Tavassi, A. M.; Alvarez-Flores, M. P.; Carrijo-Carvalho, L. C. & Ricci-Silva, M. E. 2013. Toxins from *Lonomia obliqua* - recombinant production and molecular approach. In: **An Integrated View of the Molecular Recognition and**

Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications. Gandhi Rádis Baptista (ed). InTech. p. 175-206.

CIT - Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. 1999. **Manual de diagnóstico: tratamento de acidentes por *Lonomia*. Manuais técnicos I.** Porto Alegre - RS/Brasil. 20 p.

Diaz, J. H. 2005. The evolving global epidemiology, syndromic classification, management and prevention of caterpillar envenoming. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** **72.** (3): 347-357.

Duarte, A. C.; Caovilla, J.; Lorini, I.; Lorini, D.; Mantovani, G.; Sumida, J.; Manfre, P. C.; Silveira, R. C. & de Moura, S. P. 1990. Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. **Jornal Brasileiro de Nefrologia.** **12.** (4): 184-186.

Engström, Y. 1998. Insect immune gene regulation. In: **Molecular mechanisms of immune responses in insects.** Chapman & Hall. Brey, P. T. & Hultmark, D. (ed). London/UK. p. 211-244.

Fritzen, M.; Schattner, M.; Ribeiro, A. L.; Batista, I. F.; Ventura, J.; Prezoto, B. C. & Chudzinski-Tavassi, A. M. 2003. *Lonomia obliqua* venom action on fibrinolytic system. **Thrombosis Research.** **112.** (1-2): 105-110.

Greco, K. N. 2009a. **Estudo de proteínas obtidas de hemolinfa de *Lonomia obliqua* com ação antiviral.** Dissertação - Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo. São Paulo. 92 p.

Greco, K. N.; Mendonça, R. M.; Moraes, R. H.; Mancini, D. A. & Mendonça, R. Z. 2009b. Antiviral activity of the hemolymph of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **Antiviral Research.** **84.** (1): 84-90.

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

Herreweghe, J. M. V. & Michiels, C. W. 2012. Invertebrate lysozymes: diversity and distribution, molecular mechanism and in vivo function. **Journal of Biosciences**. **37**. (2): 327-348.

Hoffmann, J. A.; Reichhart, J. M. & Hetru, C. 1996. Innate immunity in higher insects. **Current Opinion in Immunology**. **8**. (1): 8-13.

Ito, Y.; Yoshikawa, A.; Hotani, T.; Fukuda, S.; Sugimura, K. & Imoto, T. 1999. Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family. **European Journal of Biochemistry**. **259**. (1-2): 456-461.

Jollès, P. & Jollès, J. 1984. What's new in lysozyme research? **Molecular and Cellular Biochemistry**. **63**. (2): 165-189.

Jollès, J. & Jollès, P. 1975. The lysozyme from *Asterias rubens*. **European Journal of Biochemistry**. **54**. (1): 19-23.

Kanaya, T. & Kobayashi, J. 2000. Purification and characterization of an insect haemolymph protein promoting in vitro replication of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**. **81**. (4): 1135-1141.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. **227**. (5259): 680-685.

Lamberty, M.; Zachary, D.; Lanot, R.; Bordereau, C.; Robert, A.; Hoffmann, J. A. & Bulet, P. 2001. Insect immunity. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. **Journal of Biological Chemistry**. **276**. (6): 4085-4092.

Lorini, L. M. 1999. **A taturana - aspectos biológicos e morfológicos da *Lonomia obliqua***. EDIUPF. Passo Fundo - PR/Brasil. 67 p.

Lorini, L. M. & Corseuil, E. 2001. Aspectos Morfológicos de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera: Saturniidae). **Neotropical Entomology**. **30**. (3): 373-378.

Lourenço, A. P. 2007. **Genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos e de outras proteínas envolvidas na resposta imune de *Apis mellifera***. Tese - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade da São Paulo. Ribeirão Preto. 182 p.

Manetti, A. G. O.; Rosetto, M. & Marchini, M. 1998. Antibacterial peptides of the insect reproductive tract. In: **Molecular mechanisms of immune responses in insects**. Chapman & Hall. Brey, P. T. & Hultmark, D. (ed). London/UK. p. 67-91.

Marana, S. R.; Cançado, F. C.; Valério, A. A.; Ferreira, C.; Terra, W. R. & Barbosa, J. A. R. G. 2006. Crystallization, data collection and phasing of two digestive lysozymes from *Musca Domestica*. **Acta Crystallographica**. **F62**. 750-752.

Mendonça, R. Z.; Greco, K. N.; Sousa, A. P. B.; Moraes, R. H. P.; Astray, R. M. & Pereira, C. A. 2008. Enhancing effect of a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph on recombinant protein production. **Cytotechnology**. **57**. (1): 83-91.

Ministério da Saúde. 1998. Acidentes por Lepidópteros. In: **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Fundação Nacional de Saúde. Brasília - DF/Brasil. p. 75-84.

Moraes, R. H. P. 1997. Lagartas urticantes. **Biológico**. **59**. (2): 21-25.

Nakazawa, H.; Tsuneishi, E.; Ponnuvel, K. M., Furukawa, S.; Asaoka, A. Tanaka, H.; Ishibashi, J. & Yamakawa, M. 2004. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. **Virology**. **321**. (1): 154-162.

Ourth, D. D. 2004. Antiviral activity against human immunodeficiency virus-1 in vitro by myristoylated-peptide from *Heliothis virescens*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. **320**. (1): 190-196.

Pinto, A. F.; Dobrovolski, R.; Veiga, A. B. & Guimarães, J. A. 2004. Lonofibrase, a novel alpha-fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. **Thrombosis Research**. **113**. (2): 147-154.

Powning, R. F. & Davison, W. J. 1976. Studies on insect bacteriolytic enzymes--II. Some physical and enzymatic properties of lysozyme from haemolymph of *Galleria mellonella*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. **55**. (2): 221-228.

Renato Rizzaro. **Lagarta-bugia (*Podalia* sp)**. Disponível em: <http://www.flickr.com/photos/renato-rizzaro/4233497841/>. Acessado em: 03/12/2013.

Riciluca, K. C. T.; Sayegh, R. S. R.; Melo, R. L. & Silva Jr., P. I. 2012. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. **Results in Immunology**. **2**. 66–71.

Ruas, G. W. 2010. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas**. Dissertação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo. São Paulo. 81 p.

Salazar-Anton, F.; Tellez, A. & Lindh, J. 2012 Evaluation of an immunodot blot technique for the detection of antibodies against *Taenia solium* larval antigens. **The journal parasitology research**. **110**. (6): 2187-2191.

Sayegh, R. S. R. 2011. **Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae; Opiliones)**. Dissertação - Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo. São Paulo. 153 p.

Seidler, J.; Zinn, N.; Boehm, M. E. & Lehmann, W. D. 2010. De novo sequencing of peptides by MS/MS. **Proteomics**. **10**. (4): 634-649.

Silva Jr., P. I. 2000. **Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana***. Tese - Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo. São Paulo. 169 p.

Sousa, A. P. B. 2006. **Isolamento e identificação de proteínas obtidas da hemolinfa da lagarta *Lonomia obliqua* com efeitos na otimização de cultivos de células de inseto *Spodoptera frugiperda* da linhagem Sf-9 e na replicação de *Baculovirus***. Tese - Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo. São Paulo. 161 p.

Souza, A. P.; Peixoto, C. C.; Maranga, L.; Carvalhal, A. V.; Moraes, R. H.; Mendonça, R. M.; Pereira, C. A.; Carrondo, M. J. & Mendonça, R. Z. 2005. Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. **Biotechnology Progress**. **21**. (1): 99-105.

Stan Malcolm Photos. **Cecropia Moth (*Hyalophora cecropia*), Adults 2008**. Disponível em: <http://www.performance-vision.com/cecropia/cecropia2.htm>. Acessado em: 03/12/2013.

Stone, K. L. & Willians, K. R. 1996. Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrylamide gels. In: **The protein protocols handbook**. Humana Press. Walter, J. M. (ed). Totowa - NJ/USA. p. 415-421.

Sun, S. C.; Asling, B. & Faye, I. 1991. Organization and expression of the immunoresponsive lysozyme gene in the giant silk moth, *Hyalophora cecropia*. **Journal of Biological Chemistry**. **266**. (10): 6644-6649.

Tzou, P.; De Gregorio, E. & Lemaitre, B. 2002. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. **Current Opinion in Microbiology**. **5**. (1): 102-110.

UniProtKB. **Results for lysozyme in UniProtKB**. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=lysozyme&offset=100&sort=score>. Acessado em: 20/02/2014.

Vargas-Albores, F. & Ortega-Rubio, A. 1994. El sistema inmune humoral de los insectos. **Tópicos de Investigación y Posgrado**. **4**. (1) 21-28.

Veiga, A. B.; Pinto, A. F. & Guimaraes, J. A. 2003. Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. **Thrombosis Research**. **111**. (1-2): 95-101.

Veiga, A. B. G. 2005. **Caracterização molecular dos componentes do veneno de *Lonomia obliqua*: genes expressos e princípios ativos envolvidos nos distúrbios da coagulação e da fibrinólise**. Tese - Centro de Biotecnologia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 118 p.