

**Gabriela Ayroza**

**"PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DO VENENO DE *Avicularia juruensis*  
(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.

**Área de Concentração:** Pesquisas  
Laboratoriais em Saúde Pública.

**Orientador:** Dr. Pedro Ismael da  
Silva Jr.

**São Paulo**

**2012**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Ayroza, Gabriela

Peptídeos antimicrobianos do veneno de *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae) / Gabriela Ayroza – São Paulo, 2012.

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 Junior

1. Venenos de aranha/ isolamento & purificação  
2. Peptídeos/isolamento & purificação 3. Aracnídeos 4. Venenos de aranha/Bioquímica

SES/CCD/CD-261/12

**Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio em tudo que faço na minha vida. À Filó por todo o companheirismo e alegria que me proporcionou por todos esses anos - RIP.**

## AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa se conclui, e para que isso fosse possível tenho a obrigação de agradecer às pessoas que me ajudaram, apoiaram e incentivaram.

Primeiramente, ao meu orientador, Dr. Pedro Ismael, que acreditou e confiou em mim, pelo aprendizado e incentivo nesses 5 anos, pela paciência e pela alegria e humildade sempre.

Aos meus pais e ao meu irmão, que sempre me apoiaram em tudo e me incentivaram a correr atrás do meu sonho. Sem vocês nada disso seria possível. Amo muito vocês e sou grata por tê-los na minha vida. Minha querida Vó Ilda, por me agüentar e cuidar de mim.

À minha melhor amiga e companheira, Filó, que me deixou esse ano, mas que me deu muitas alegrias e sabia como ninguém o que eu sentia e como me consolar e me fazer feliz. Sinto muito a sua falta e penso em você todos os dias. Rest in Peace.

À minha maravilhosa cidade de Ubatuba, pelos momentos de paz, descanso, diversão e praia.

Ao Rogério e Carol, pelas risadas, conversas e idas a campo, sempre divertidas e estimulantes.

Aos meus amigos da Química de Proteínas: Katie, por ser amiga e confidente, por sempre me ajudar e me incentivar; Ivan, pelas conversas e por toda a ajuda; Léo, Raphael, Carol, Soraia, Elisa e tantos outros que passaram ou estão por aqui. À Amanda pela cumplicidade e amizade, Milene, Ana Karina, Luciana, Edson, Débora, Eduardo e Gabi, pela companhia no almoço ou por um simples bate-papo no corredor. Assim como todos os alunos e funcionários do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, que de alguma forma fazem o dia-a-dia ser mais prazeroso, Ivan, Zezé, Rosa, Siqueira, Isaías, Bruno, Mari, Úrsula, enfim, à todos um muito obrigada!

Aos meus amigos Vinícius, Bruna, Brunão e Carol, Bia, Inayê e Cauê, Marco Aurélio, Giba e Janaína, Hussein, Rafaela Lafraia e todos os outros, pois sem a amizade não somos nada.

À Dra. Solange Serrano e ao Dr. Hugo Armelin por me deixarem desenvolver este trabalho no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) CAT-CEPID.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado; À FAPESP pelo investimento no laboratório.

Aos membros da secretaria e aos professores da Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças.

E a todos que contribuíram e estiveram presentes na conclusão dessa etapa.  
Desculpem-me se esqueci de alguém.

Muito Obrigada por tudo!

**“E mesmo que às vezes o curso mude, o rio sempre alcança o mar.”**

(And though the course may change sometimes, rivers always reach the sea)

Robert Plant & Jimmy Page

## Resumo

Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) são os principais elementos da imunidade inata contra bactérias e fungos em ambos os reinos: animal e vegetal. PAMs são um grupo extremamente diversificado de pequenas proteínas e sua função é essencial para a resposta imunológica dos organismos. Venenos animais são boas fontes de substâncias antimicrobianas, pois contêm um grande número de diferentes componentes biologicamente ativos de diferentes estruturas químicas, tais como proteínas, polipeptídeos e aminas. Toxinas que apresentam o nó cistina (CKTs) em venenos de aranhas representam uma rica fonte de novos ligantes para canais iônicos, e estão entre os constituintes mais estudados de venenos de aranha. Eles são moléculas pequenas, compactas ligadas por três a cinco pontes de dissulfeto, assegurando uma maior estabilidade na conformação da molécula que a contém, e, portanto, oferece um elevado potencial para aplicações na engenharia de proteínas. O nó d cistina ocorre numa grande variedade de peptídeos e proteínas e é relativamente comum em pequenas toxinas ricas em cisteína e pequenos peptídeos, com massas moleculares variando de 3,5 a 7 kDa. As toxinas que contêm o nó de cistina possuem uma alta gama de atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, anti-HIV e bloqueio de canais iônicos. Este estudo teve como principal objetivo a caracterização do veneno e a identificação e caracterização de moléculas bioativas presentes no veneno da aranha caranguejeira *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae), em especial peptídeos antimicrobianos. O veneno foi obtido por estimulação elétrica, diluído em água acidificada (TFA – ácido trifluoracético 0,05%) e centrifugado. A parte solúvel foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em uma coluna semi preparativa Júpiter C18 de fase reversa. A presença de atividade antimicrobiana foi determinada por ensaio líquido de inibição de crescimento contra bactérias Gram negativas e Gram positivas, leveduras e fungos filamentosos. Neste trabalho, foram isoladas 4 moléculas denominadas Juruentatoxinas (AJ2; AJ22; AJ23 e AJ24) provenientes do veneno da aranha amazônica *A. juruensis* com atividade antimicrobiana. As frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram reavaliadas quanto a

sua homogeneidade e, quando não se apresentavam homogêneas, eram repurificadas e as frações obtidas submetidas a uma nova análise de atividade. As massas moleculares das frações obtidas a partir de cromatografia em fase reversa foram determinadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Frações que se apresentaram puras no espectro de massas foram submetidas ao seqüenciamento “De novo”. A fração AJ22-2 (anti *C. albicans*) teve sua seqüência de aminoácidos elucidada: **FTCAISCDIKVNGKPCCKGSGEKKCSGGWSCKFNVCVKV**. Quando comparada em um banco de dados (BLAST), a seqüência apresentou 82% de identidade com uma toxina que contem o nó de cistina encontrada no veneno de uma aranha caranguejeira chinesa chamada *Chilobrachys jingzhao*. A juruentatoxina AJ22 foi denominada **Juruína**, em homenagem a espécie da aranha utilizada, *A. juruensis*. A juruína apresentou alta atividade contra leveduras, principalmente contra as do gênero *Candida*, e contra o fungo filamentoso *A. níger*. Por outro lado, a juruína não apresentou atividade contra nenhuma atividade contra bactérias Gram negativas e positivas, o que indica que esta molécula tem uma ação antifúngica específica. De uma outra fração, AJ24 (anti *C. albicans*), foi possível sequenciar parcialmente alguns fragmentos: **XFECSXSCXENK** e **FNXCVCVK**. A avaliação por Maldi-TOF dessa molécula revelou a presença de duas massas: 4.253Da e 4.321Da. A análise em banco de dados (BLAST) dos fragmentos obtidos de AJ24 mostrou identidade com HNTX-II-15, peptídeo encontrado no veneno da aranha caranguejeira chinesa *Selenocosmia (Ornithoctonus) huwena*. As outras frações ainda precisam passar por novas etapas de purificação por não se encontrarem totalmente isoladas. Com o surgimento de organismos multi-resistentes aos antibióticos e pesticidas convencionais a busca de novos compostos e sua caracterização podem auxiliar o desenvolvimento de novas moléculas para combatê-los e o estudo dos venenos se mostra de grande importância nessa busca de novos fármacos.

## ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are key components of innate immunity against bacteria and fungi in both plant and animal kingdoms. AMPs are an incredibly diverse group of small proteins and their function is essential for the immune response of organisms. Animal venoms are good sources of antimicrobial substances, because they contain a large number of different biologically active components of different chemical structures, such as proteins, polypeptides and amines. Cystine knot toxins (CKTs) in spider venoms represent a rich source of novel ligands for varied ion channels, and are among the most extensively studied constituents of spider venoms. They are small, compact molecules cross-linked by three to five disulfide bonds, ensuring greater stability in the conformation of the molecule that contains it, and therefore offers a high potential for applications in engineering proteins. It occurs in a variety of peptides and proteins and is relatively common in small cysteine-rich toxins and small peptides. Toxins containing the cystine knot feature a range of biological activities, like antimicrobial activities, anti-HIV and blocking ion channels. The CKTs have molecular masses ranging from 3.5 to 7 kDa. This study aimed to characterize the venom and the identification and characterization of bioactive molecules presents in the venom of the tarantula spider *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae), in particular antimicrobial peptides. Venom was obtained by electrical stimulation, diluted with acidified water (TFA - trifluoroacetic acid 0.05%) and centrifuged. The soluble part was submitted to high performance liquid reversed-phase chromatography (HPLC) on a semi preparative Jupiter C18 column. The presence of antimicrobial activity was determined by liquid growth inhibition assay against Gram negative and Gram positive bacteria, yeasts and filamentous fungi. In this study, we isolated four molecules denominated Jruentatoxins (AJ2, AJ22, AJ23 and AJ24) from the venom of the spider Amazon *A. juruensis* with antimicrobial activity. The fractions that showed antimicrobial activity were re-evaluated for homogeneity and, if not homogeneous, were re-purified and the fractions submitted to a new

analysis of activity. The molecular masses of the fractions obtained from reverse phase chromatography were determined by mass spectrometry MALDI-TOF. Fractions that showed pure mass spectrometric sequencing were submitted to "De novo" sequencing. The fraction AJ22-2 (anti *C. albicans*) had elucidated its amino acid sequence: **FTCAISCDIKVNGKPCKGSGEKKCSGGWSCKFNVCVKV**. When compared to a database (BLAST), the sequence showed 82% identity with a "cystine knot toxin" found in the venom of a Chinese tarantula spider called *Chilobrachys jingzhao*. The AJ22 juruentatoxin Juruína was named in honor of the spider species used *A. juruensis*. Juruin showed high activity against yeasts, especially against the genus *Candida*, and against filamentous fungus *A. niger*. Moreover, juruína showed no activity against any of the positive and Gram negative bacteria tested, suggesting that this molecule has a specific antifungal activity. In another fraction, AJ24 (anti *C. albicans*), we partially sequenced fragments: XFECSXSCXENK and FNXCVVK. The evaluation of MALDI-TOF of the molecule revealed the presence of two masses, and 4.253Da 4.321Da. The analysis in a database (BLAST) of the fragments obtained showed identity with HNTX-II-15, a peptide found in the venom of the Chinese spider *Selenocosmia (Ornithoctonus) huwena*. The other fractions still need to undergo further purification steps because they were not totally isolated. With the emergence of multidrug-resistant organisms to conventional antibiotics and pesticides, the search for new compounds and their characterization may allow the discovery of new molecules to fight them and the study of poisons is shown of great importance in the search for new drugs.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ACN: Acetonitrila

AF: Ácido Fórmico

ATCC: “American Type Culture Collection”

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLAE – FR: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa

DIC: Dissociação induzida por colisão

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético

ESI-Q-ToF/ MS: “Eletrospray Ionization-quadrupole time of flight/ Mass Spectrometry”

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

m/z: massa/carga

MALDI/TOF – MS: “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/ Time of flight-Mass Spectrometry “

PAM: Peptídeo antimicrobiano

PAMA: Peptídeo antimicrobiano aniônico

PBS: Tampão fosfato salino

TFA: Ácido Trifluoroacético

## Lista de Símbolos

### Aminoácidos

Alanina .....	A
Cisteína .....	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 Tabelas**

Tabela 1 – Massas moleculares e atividades antimicrobianas das frações encontradas no veneno de *Avicularia juruensis*.....pág 36

Tabela 2 – Espectro de atividade antimicrobiana do peptídeo rico em cisteína (juruína) comparado a gomesina e ao antifúngico anfotericina B.....pág 53

## Lista de Figuras

Figura 1 – Diagrama esquemático das três classes de nós de cistina.

Figura 2 – Exemplar de *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae).

Figura 3 - Área de ocorrência da espécie *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae).

Figura 4 – Teste de atividade antimicrobiana em microplaca de 96 poços.

Figura 5 – Esquema de Ensaio Hemolítico em microplaca.

Figura 6 – Perfil eletroforético do veneno bruto de *Avicularia juruensis* em SDS-PAGE a 10%.

Figura 7 - Perfil eletroforético do veneno bruto de *Avicularia juruensis* em SDS-PAGE a 15%.

Figura 8 – Perfil eletroforético de atividade gelatinolítica em SDS-PAGE 12,5% do veneno bruto de *Avicularia juruensis*.

Figura 9 – Perfil eletroforético de atividade caseinolítica em SDS-PAGE 10% do veneno bruto de *Avicularia juruensis*.

Figura 10 – Perfil eletroforético de atividade fibrinogenolítica em SDS-PAGE 10% do veneno bruto de *Avicularia juruensis*.

Figura 11 – Perfil eletroforético de atividade sobre o colágeno I em SDS-PAGE em gradiente de 6-18% do veneno bruto de *Avicularia juruensis*.

Figura 12 – Primeira etapa de purificação de fatores antimicrobianos do veneno de *A. juruensis*.

Figura 13 - Espectro de massa (Maldi-TOF) da fração AJ2.

Figura 14 – Segunda etapa de purificação da fração AJ22.

Figura 15 - Espectro de massa (Maldi-TOF) fração AJ22-2.

Figura 16 - Espectro de massa (Maldi-TOF) fração AJ23.

Figura 17 - Espectro de massa (Maldi-TOF) fração AJ24.

Figura 18 – Seqüenciamento “De Novo” de um fragmento da fração AJ24 (XFEC SXSCXENK).

Figura 19 – Seqüenciamento “De Novo” de outro fragmento da fração AJ24 (FNXC VVK).

Figura 20: Comparação da seqüência encontrada na fração AJ24 com o banco de dados BLAST.

Figura 21. Análise por espectrometria de massas do peptídeo AJ22-2 (juruína).

Figura 22 – Estrutura covalente da juruína.

Figura 23: Comparação da seqüência encontrada na fração AJ22-2 com o banco de dados BLAST.

Figura 24: Comparação da sequêcia de aminoácidos da juruína (Aju1a) com outras moléculas que contém o nó de cistina (ICK).

Figura 25. Modelagem por homologia da juruína.

Figura 26 – Atividade da juruína sobre eritrócitos humanos.

## ÍNDICE

<b>I</b>	<b>Introdução</b>	<b>01</b>
	1.1- Sistema Imune dos Invertebrados	01
	1.2- Peptídeos Antimicrobianos	02
	1.3- Histórico de Peptídeos Antimicrobianos	06
	1.3.1- Peptídeos antimicrobianos provenientes de toxinas animais	07
	1.4- Venenos de Aranhas	08
	1.5- Nó de Cistina	10
	1.6- <i>Avicularia juruensis</i>	13
<b>II</b>	<b>Objetivos</b>	<b>15</b>
	1- Objetivos Gerais	15
	2- Objetivos Específicos	
<b>III</b>	<b>Material e Métodos</b>	<b>15</b>
	1- Animais	15
	2- Extração do Veneno	16
	3- Caracterização Bioquímica do Veneno	16
	3.1- Dosagem Protéica	16
	3.2- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	17
	3.3- Zimografia em Gel de Poliacrilamida com SDS Co- polimerizado com Gelatina	17
	3.4- Zimografia em Gel de Poliacrilamida com SDS Co- polimerizado com Caseína	18
	3.5- Perfil de Degradação de Fibrinogênio em Gel de Poliacrilamida	19
	3.6 – Hidrólise do Colágeno I	19
	4- Purificação de Peptídeos Antimicrobianos	20
	5- Bioensaios	21
	5.1- Microrganismos	21
	5.2- Atividade Antimicrobiana	21
	5.3- Ensaio Hemolítico	23
	6- Caracterização Estrutural	25
	6.1- Espectrometria de Massa	25
	6.2- Sequenciamento “De novo”	26
	6.3- Redução e Alquilação das Frações <b>AJ22-2 e AJ24</b>	27
	6.4- Clivagem Enzimática das Frações <b>AJ22-2 e AJ24</b>	27
	6.5- Modelagem por Homologia	27
<b>IV</b>	<b>Resultados</b>	<b>29</b>
	1- Caracterização Bioquímica do Veneno	29

1.1-	Dosagem Protéica	29
1.2-	Perfil Eletroforético com e sem Redução	29
1.3-	Atividade Gelatinolítica	31
1.4-	Atividade Caseinolítica	32
1.5-	Atividade Fibrinogenolítica	33
1.6-	Hidrólise do Colágeno I	34
2-	Purificação de Peptídeos Antimicrobianos	35
3-	Caracterização da Fração <b>AJ22-2</b>	44
<b>V</b>	<b>Discussão</b>	<b>55</b>
	1 - Caracterização do veneno bruto	55
	2 - Purificação e caracterização de moléculas bioativas do veneno	58
<b>VI</b>	<b>Conclusão</b>	<b>65</b>
<b>VII</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>66</b>
<b>VIII</b>	<b>Anexo</b>	<b>82</b>

## **I – Introdução**

Desde o surgimento da humanidade, humanos e aranhas convivem no mesmo habitat. As aranhas estão presentes em praticamente todos os ambientes terrestres, desde desertos até florestas tropicais, do litoral até as regiões mais altas acima da linha das árvores, e muitas se adaptaram facilmente a viver muito próximas ao homem (Escoubas *et al.*, 2000).

Por terem uma ampla distribuição e sucesso nos ambientes em que são encontrados, é provável que possuam mecanismos eficientes de defesa contra patógenos. Assim, podemos dizer que parte do seu êxito na colonização de tantos ambientes está nos mecanismos de defesa e no seu sistema imune (Silva Jr., 2000).

Por estarem expostos diariamente a infecções e patógenos, e para se defenderem, esses organismos desenvolveram mecanismos eficientes que fazem parte da resposta imune inata. A maioria dos invertebrados vive em ambientes onde há uma grande quantidade de micro-organismos, muitos patogênicos, por isso há a necessidade de se ter um sistema de defesa eficiente. Em invertebrados, apenas a imunidade inata está presente, enquanto que em vertebrados estão presentes tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (Bulet *et al.*, 2004).

### **1.1 – Sistema Imune dos Invertebrados**

Diferente do sofisticado mecanismo de imunidade dos vertebrados, que é altamente específico com a presença de imunoglobulinas e de uma memória imunológica, o sistema de defesa dos invertebrados em geral se constitui num complexo e não-específico mecanismo de imunidade inata, que envolve reações celulares coordenadas. Essas reações são mediadas pelos hemócitos, células circulantes da hemolinfa desses animais, que podem atuar de diversas maneiras no combate ao patógeno, por exemplo, quando ocorre a invasão de uma pequena quantidade de micro-organismo, estes são fagocitados pelos hemócitos. No caso de uma infecção por um número elevado de micro-organismos ou por parasitas, os hemócitos atuam

em grupo, formando cápsulas ou nódulos em torno dos patógenos invasores, fazendo com que ocorra a morte destes por asfixia ou pela ação de substâncias tóxicas liberadas dentro dos nódulos ou cápsulas. Para haver o isolamento completo dos micro-organismos invasores, é muito comum ocorrer a reação de melanização, que é devida a ação da enzima fenoloxidase. Esta faz parte de um sistema complexo de proteases, proteínas de reconhecimento e inibidores de proteases, denominado sistema ativador da pró-fenoloxidase (revisão Söderhäll e Cerenius, 1998).

Nessas reações de defesa, há componentes presentes em pequenas quantidades na hemolinfa que são ativados apenas quando a infecção já está em curso. É o caso dos fenóis, das lectinas, da hemolina e dos peptídeos e proteínas antimicrobianas (Thomma *et al.*, 2001).

## **1.2 – Peptídeos Antimicrobianos**

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são elementos primitivos da resposta imune inata de todas as espécies de seres vivos, cujas vias de indução são relativamente conservadas em vertebrados e insetos (Hoffman *et al.*, 1999). Esta imunidade inata mediada por peptídeos antimicrobianos é necessariamente rápida, eficaz e multifuncional uma vez que são simples produtos de transcrição e tradução gênica (Thomma *et al.*, 2001; Pelegrini & Franco, 2005).

São geralmente descritos como moléculas anfipáticas e catiônicas, podendo ser também aniônicos, compostas de 12 a 45 resíduos de aminoácidos e codificadas por genes, mas já há evidências de que outros PAMs ou polipeptídeos possam se originar de várias outras fontes, tais como de hidrólises de proteínas inativas (Bachère *et al.*, 2004).

Os peptídeos antimicrobianos catiônicos foram os primeiros a serem relatados e compreendem o maior grupo de peptídeos, sendo amplamente distribuídos desde as plantas até os animais, e apresentam uma grande diversidade de funções, características estruturais e propriedades biológicas (como atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas, Gram

negativas, fungos, parasitas e alguns vírus) (Andreu e Rivas, 1998; Bullet *et al.*, 1999).

O principal mecanismo de ação desses peptídeos se dá pela desestruturação das membranas celulares dos micro-organismos invasores, aumentando a sua permeabilidade e levando o organismo a morte. Assim, ocorre uma interação eletrostática entre o PAM positivamente carregado e os componentes da membrana dos microorganismos, que são carregados negativamente, fazendo com que haja uma interação entre a porção apolar da membrana das células e os resíduos hidrofóbicos dos PAMs, resultando na permeabilização das membranas (Silva Jr., 2000).

Baseados em suas características estruturais, os PAMs catiônicos podem ser classificados em (Bacheré, 2000; Auvynet, 2009):

- Peptídeos Lineares: peptídeos que formam estruturas anfipáticas em  $\alpha$ -hélice. Ex: cecropinas e a moricina. Presentes em dípteros e lepidópteros.
- Peptídeos ricos em cisteína: apresentam pontes de dissulfeto intramoleculares. Ex: defensinas, drosomicinas, taquiplesinas, polifemusina, mitilina e gomesina. Presentes em insetos, limulídeos (Merostomatas), moluscos e aracnídeos.
- Peptídeos ricos em aminoácidos específicos:
  - Ricos em prolina: peptídeos compostos por resíduos de prolina. Ex: apidaecinas, abaecinas, drosocinas. Presentes em dípteros, himenópteros e hemípteros.
  - Ricos em glicina: peptídeos compostos por resíduos de glicina. Ex: atacinas, dipterocinas, sarcotoxinas. Presentes em coleópteros e lepidópteros.

Com relação à ruptura da membrana plasmática foram propostos quatro modos de ação:

- Modelo “barrel-stave” – Neste, os PAMs anfipáticos,  $\alpha$ -hélice, após interação eletrostática com a face externa da membrana bacteriana, formam poros do tipo barril, onde a porção apolar do peptídeo interage com a porção hidrofóbica dos fosfolípidios 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, produzida pelo fungo *Trichoderma viride*, 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 do detergente, com a desintegração e formação de micelas, o que leva a morte da bactéria. A ovispirina, encontrada em células mielóides de ovelhas, é um exemplo de PAM com este tipo de ação (Brogden, 2005).

- Formação de poro toroidal – Após a interação com fosfolípidios 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 fosfolípidios, mesmo quando inseridos perpendicularmente a bicamada lipídica. Este tipo de poro transmembrânico é induzido pelas magaininas (presente no sapo africano *Xenopus laevis*), protegrinas (presentes em leucócitos de porcos) e melitinas (principal componente presente em venenos de abelhas) (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); a simulação por dinâmica molecular realizada com o peptídeo melitina em presença da bicamada

lipídica de dipalmitoilfosfatidilcolina, mostrou a formação espontânea de poros transmembranares acima da concentração crítica de peptídeo/lipídeo (P/L). Porém, diferente do modelo tradicional, eles mostraram que um ou dois peptídeos são suficientes para forrar o poro toroidal (Sengupta *et al.*, 2008).

Os peptídeos antimicrobianos aniônicos representam um pequeno grupo de moléculas que apresentam atividade antimicrobiana, e foram isolados principalmente de mamíferos. Esses podem ser divididos em 4 classes (Marshall e Arenas, 2003):

- Peptídeos derivados dos neuropeptídeos: decorrentes do processamento de neuropeptídeos precursores. Ex: Pro-encefalina-A, peptídeo B, enquelitina, encontrados em bovinos, humanos e invertebrados.
- Peptídeos ricos em ácido aspártico: apresentam resíduos de ácido aspártico em abundância. Ex: dermicidina, encontrados em humanos.
- Dipeptídeos aromáticos: apresentam baixa massa molecular. Ex: N-alanil-5-S-glutationil-3,4-dihidroxi-fenilalanina, *p*-hidroxicinaldeído, encontrados em larvas de dípteros.
- Proteínas que ligam oxigênio: são derivados de proteínas que ligam oxigênio. Ex: PvHct, Pshct1, Pshct2, encontrados em camarões.

Para serem eficazes contra patógenos, é necessário aos PAMs terem 4 características: 1) seletividade da toxicidade, sendo capazes de discriminar entre células hospedeiras e microbianas; 2) matar rapidamente os patógenos, pois o tempo de geração desses organismos é curto (20 minutos no caso da *Escherichia coli*); 3) amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo eficientes contra muitas espécies de microorganismos; e 4) apresentar um modo de ação em que o patógeno não possa facilmente desenvolver resistência (Matsuzaki, 1999).

Devido ao surgimento de organismos multi-resistentes aos antibióticos e pesticidas convencionais, tornou-se muito importante à busca por substâncias que tenham atividades antimicrobianas específicas, exercendo-as através de mecanismos de ação alternativos daqueles dos antibióticos comuns. Os peptídeos antimicrobianos são, portanto, candidatos promissores para o desenvolvimento de novas drogas com amplo espectro de ação antimicrobiana para combater patógenos resistentes aos antibióticos e pesticidas convencionais.

### **1.3 – Histórico de Peptídeos Antimicrobianos**

Aproximadamente 2000 peptídeos antimicrobianos (The Antimicrobial Peptide Database - <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) já foram identificados em todas as espécies vivas, provenientes de uma grande diversidade de plantas e animais, e com um amplo espectro de atividades, sendo que nos últimos anos uma grande quantidade dessas moléculas foi isolada de invertebrados (Daffre *et al.* 2001).

Muitos dos PAMs foram isolados da hemolinfa de invertebrados. Na hemolinfa do escorpião *Androctonus australis*, foram encontrados três peptídeos antimicrobianos: androctonina, butinina e um tipo de defensina (Ehret-Sabatier, 1996). Do camarão *Penaeus vannamei* (Decapoda) foram isoladas as penaeidinas, provenientes da hemolinfa e que têm ação contra bactérias (Gram positivas e negativas) e fungos (Destoumieux *et al.*, 1997). Em carrapatos, foram isolados dois fatores antimicrobianos da hemolinfa de *Dermacentor variabilis*, que apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas (Johns *et al.*, 1998). Em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Fogaça *et al.*, 1999) foi encontrado um fragmento de hemoglobina tomada como alimento com atividade antimicrobiana. Nesse mesmo carrapato foram encontrados vários outros peptídeos antimicrobianos como a Ixodidina (Fogaça *et al.*, 2006) e a microplusina (Esteves *et al.*, 2009). Na hemolinfa do carrapato *Amblyomma hebraeum* foram encontrados dois peptídeos antimicrobianos (Abliomadefensina I e II) (Lai *et al.*, 2004) e em

glândula salivar de *Ixodes sinensis* foi isolado um peptídeo antimicrobiano a ixosina (Da *et al.*, 2006).

Na hemolinfa da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana* foram encontradas quatro moléculas com atividade antimicrobiana, um peptídeo no plasma (theraphosinina), dois nos hemócitos (gomesina e acanthoscurrina) e uma acilpoliamina (migalina) (Silva Jr., 2000; Silva Jr. *et al.*, 2000; Pereira, 2007). Nos hemócitos da aranha *Cupiennius salei*, foi encontrada a Ctenidina, um peptídeo antimicrobiano rico em glicina (Kuhn-Nntwig *et al.*, 2010). Outro peptídeo encontrado na hemolinfa de aranha caranguejeira foi a Rondonina, que tem ação antifúngica e foi caracterizado pelo nosso grupo. (Riciluca *et al.*, 2012).

Os PAMs também podem ser encontrados nos seres humanos, como as defensinas e as catelicidinas, presentes nos leucócitos e também secretados por vários epitélios (Gordon, 2005).

### **1.3.1 – Peptídeos Antimicrobianos Provenientes de Toxinas Animais**

A primeira descrição de atividade antimicrobiana em venenos de aranhas foi publicada em 1989 por Xu e colaboradores, em um estudo com o veneno da aranha *Lycosa singoriensis*. Desde então, muitos estudos envolvendo peptídeos antimicrobianos de veneno tem sido realizados. Outros exemplos de peptídeos antimicrobianos provenientes de venenos de aranhas podem ser citados: licotoxinas I e II do veneno da aranha *Lycosa carolinensis* (Yan & Adams, 1998), as cupieninas, uma família de peptídeos da aranha *Cupiennius salei* (Kuhn-Nentwig, 2003).

No veneno do escorpião africano *Pandinus imperator* foram identificados e caracterizados dois peptídeos antimicrobianos designados pandinina I e II. São peptídeos policatiônicos com alta atividade contra bactérias Gram positivas e negativas. Pandinina II também apresenta atividade contra a levedura *Candida albicans* e uma forte atividade hemolítica (Corzo *et al.*, 2001).

Em venenos de formigas, foram identificados 15 novos peptídeos com propriedades antimicrobianas, inseticidas e hemolíticas, chamados de ponerinas (Orivel *et al.*, 2001).

A partir de venenos de vespas, muitas substâncias bioativas foram identificadas, entre elas a Vespa mastoparan (MB-VBs) e o peptídeo quimiotático VESPVBs, que apresentaram atividade antimicrobiana e foram purificadas do veneno da *Vespa bicolor* (Fabricius). O veneno dessa vespa possui efeito paralisante na presa, assim como o veneno de insetos e aranhas (Chen *et al.*, 2008).

No veneno da lacraia *Scolopendra subspinipes mutilans* foi encontrado um peptídeo (scolopendrina I) com ação antimicrobiana com atividade contra bactérias Gram positivas e negativas e contra fungos (Wenhua *et al.*, 2006).

Mais de cinquenta peptídeos antimicrobianos de toxinas de anfíbios já foram isolados, tendo como principal característica a natureza catiônica e a capacidade de permeabilizar membranas de micro-organismos. Foram detectados peptídeos com atividade antimicrobiana nas espécies *Rana esculenta*, *R. brevipoda*, *R. catesbeiana*, *R. rugosa* e *R. temporária*, denominados esculentinas, brevininas, ranalexinas, rugosinas e temporinas, respectivamente. A particularidade encontrada nos peptídeos desse gênero é a sua estruturação secundária, a qual é decisiva no modo de interação toxina/microrganismo, distinta de todas as outras até então descritas (Prates & Bloch, 2000).

#### **1.4 – Venenos de Aranhas**

Durante milhões de anos de evolução, e por terem sofrido alterações mínimas em sua morfologia, é possível que o uso do veneno pelas aranhas tenha se desenvolvido muito cedo. O veneno é usado primeiramente para paralisar e matar a presa, mas também pode exercer um papel de pré-digestão, ou ainda pode ser usado como um mecanismo de defesa contra predadores. De qualquer forma, o uso do veneno se desenvolveu muito

durante a evolução, possivelmente mais do que o uso de fios de seda. (Rash and Hodgson, 2002).

Venenos e toxinas provenientes dos artrópodes constituem ricas fontes de moléculas com alto potencial terapêutico e biotecnológico, já que muitos deles têm receptores, membranas e enzimas como alvos moleculares primários. Essa riqueza pode ser útil para a biotecnologia de muitas maneiras, como a prospecção de novos candidatos a medicamentos ou de novas entidades químicas (Pimenta e De Lima, 2005).

Enquanto bibliotecas combinatórias têm sido amplamente utilizadas para a geração de diversos compostos químicos sintéticos (Martin *et al.*, 1995; Kirkpatrick *et al.*, 1999), os venenos de aranhas são uma biblioteca com peptídeos biologicamente ativos naturalmente selecionados com elevada especificidade. Por isso, as toxinas de aranha têm sido constantemente utilizadas como ferramentas farmacológicas e protótipos para o desenvolvimento de novas drogas. De uma perspectiva evolutiva, as aranhas pertencem a um grupo muito antigo e diversificado de artrópodes com mais de 40.700 espécies descritas, distribuídas em cerca de 109 famílias, o que os torna os predadores terrestres mais abundantes (Escoubas and Rash, 2004; Herzig *et al.*, 2011).

A diversidade molecular do veneno de aranhas é estimada em até 12 milhões de compostos. Essas toxinas possuem atividades biológicas distintas, muitas das quais foram selecionadas ao longo da evolução para atuarem bloqueando seletivamente seus alvos celulares, como, por exemplo, canais de potássio dependentes de voltagem, causando uma rápida paralisia da presa (Escoubas & Rash, 2004). Devido a sua grande seletividade, o modo de ação das toxinas de diversas aranhas foi utilizado como ferramenta para elucidação da estrutura, função e farmacologia de receptores celulares (Adams, 2004; Ushkaryov *et al.*, 2004), incluindo canais iônicos específicos (Doyle *et al.*, 1998; MacKinnon *et al.*, 1998) e metabotrópicos (Guharay & Sachs, 1984).

A seletividade de ligação e os efeitos neuromoduladores das toxinas podem ser utilizados no tratamento de doenças neurodegenerativas, tais

como epilepsia, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (Mazzuca *et al.*, 2007; Estrada *et al.*, 2007; Saez *et al.*, 2010.). Além disso, a grande diversidade de toxinas do veneno de aranhas tem ajudado no desenvolvimento de biotecnologias nas mais diversas áreas, como bioinseticidas (Tedford *et al.*, 2004; Fitches *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2006; Corzo *et al.*, 2003), arritmia cardíaca (Bode *et al.*, 2001), disfunção erétil (Nunes *et al.*, 2008) e doenças infecciosas (Kozlov *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2006; Budnik *et al.*, 2003; Haeberli *et al.*, 2000; Yan & Adams, 1998; Silva Jr. *et al.*, 2000).

Avanços nas últimas décadas em espectrometria de massas e métodos de biologia molecular têm permitido a caracterização de genes relacionados a tais toxinas peptídicas, que lançam uma nova luz sobre a diversidade molecular e evolução dessas bibliotecas combinatórias vivas (Corzo e Escoubas, 2003; Escoubas e Rei, 2009).

## 1.5 – Nó de Cistina

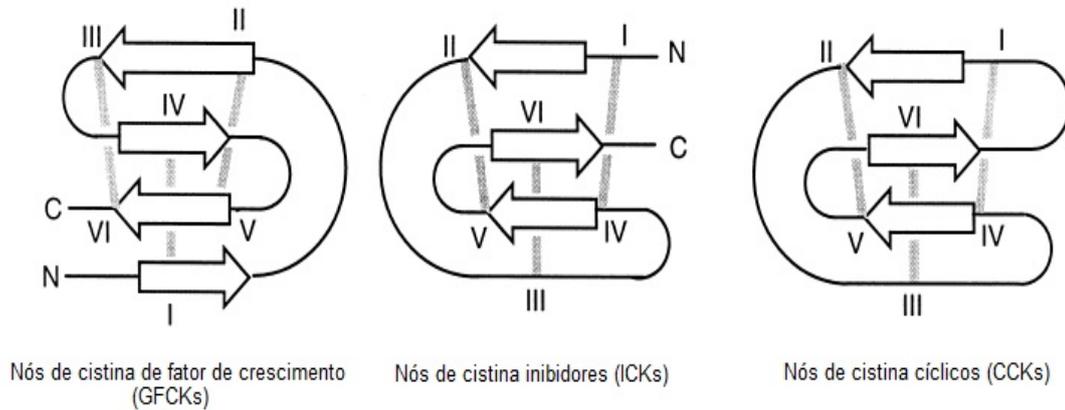
Diversos componentes podem ser encontrados na peçonha de aranhas podendo apresentar distintas ações, como bloqueadores e moduladores de canais iônicos e formadores de poros de membranas (Escoubas *et al.*, 2000; Corzo & Escoubas, 2003). As duas principais classes de moléculas presentes no veneno de aranhas são acilpoliaminas e peptídeos (Escoubas e Rash, 2004; Kuhn-Nentwig *et al.*, 2011). Estas duas classes de moléculas representam em torno de 60% do veneno liofilizado da maioria das aranhas estudadas (Corzo *et al.*, 2002). Apesar da grande diversidade estimada, a maior parte dos peptídeos encontrados no veneno parece estar restrita a alguns padrões estruturais. No veneno de aranhas, a maioria dos peptídeos detectados encontram-se com massas entre 3,5kDa e 7,5kDa, compostas pelo motivo “*Inhibitory Cystine Knot*” (ICK), altamente conservado. O motivo ICK é composto por três folhas  $\beta$ -pregueadas anti-paralelas, interconectadas por três pontes dissulfeto pareadas entre Cys<sup>1</sup>-

Cys<sup>4</sup>, Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>5</sup> e Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>6</sup> – que ocupam a mesma posição relativa em todas as toxinas conhecidas e com um número de resíduos entre as cisteínas idêntico (Escoubas & Rash, 2004). A filogenia molecular dessas toxinas sugere que elas tenham se originado de genes relacionados à  $\beta$ -defensina, uma classe de peptídeos antimicrobianos amplamente distribuídos. No veneno, as toxinas teriam se originado por duplicação gênica de um ou mais genes relacionados às defensinas nas glândulas de veneno, sofrendo diversificação e neofuncionalização (Fry *et al.*, 2009). Diversas evidências corroboram a hipótese do “recrutamento” de  $\beta$ -defensinas no veneno: enquanto  $\beta$ -defensinas de *Drosophila melanogaster* também bloqueiam canais de sódio dependentes de voltagem de uma maneira idêntica ao mecanismo de atuação de neurotoxinas contendo o motivo ICK de aracnídeos (Cohen *et al.*, 2009), a expressão de neurotoxinas contendo o motivo ICK de escorpiões é induzida pela infecção por bactérias (Gao *et al.*, 2007). Além disso, diversas dessas neurotoxinas de aracnídeos são potentes antimicrobianos (Redaelli *et al.*, 2010), e alguns peptídeos antimicrobianos encontrados no veneno atuam sinergicamente com neurotoxinas do veneno, aumentando sua potência contra alvos celulares específicos (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2004).

O “nó de cistina” ocorre em uma grande variedade de peptídeos e proteínas e é relativamente comum em pequenas toxinas ricas em cisteína e pequenos peptídeos. Existem três classes de moléculas com nó de cistina (Figura 1), variando de acordo com o tamanho do nó:

- Nós de cistina de fator de crescimento (GFCKs), que incluem os fatores de crescimento de nervos (NGF), fator transformador de crescimento (TGF $\beta$ 2) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB).
- Nós de cistina inibidores (ICKs), presentes em uma variedade de toxinas de plantas e animais.

- Nós de cistina cíclicos (CCKs), presentes em ciclotídeos de plantas e contém uma estrutura peptídica circular.



**Figura 1 – Diagrama esquemático das três classes de nós de cistina.** As folhas  $\beta$ -pregueadas estão representadas pelas setas, os resíduos de cisteína aparecem em ordem da I  $\pm$  VI, a partir da região N-terminal para a C-terminal. As pontes de dissulfeto estão representadas como linhas sombreadas. A ligação das pontes de dissulfeto para formar o nó nos nós de cistina de fator de crescimento é Cys (I  $\pm$  IV), enquanto que nos outros tipos é Cys (III  $\pm$  VI) (Craik *et al.*,2001).

Acredita-se que os peptídeos cíclicos de menor tamanho são provenientes de plantas e fungos, enquanto que os provenientes de animais tendem a ser maiores. Toxinas que contém o nó de cistina apresentam uma gama de atividades biológicas, desde atividades antimicrobianas e anti-HIV, até bloqueadores de canais de íons. Essa alta gama de atividades biológicas dá a possibilidade de algumas dessas moléculas poderem ser úteis no desenho de drogas (Craik *et al.*,2001).

Muitas moléculas contendo o nó de cistina já foram identificadas, e são provenientes de toxinas de plantas, fungos, moluscos marinhos, insetos e aranhas, como por exemplo, a Kalata B1 com 29 aminoácidos, proveniente da planta *Oldenlandia affinis* que tem atividade antimicrobiana, a MVIIA com

26 aminoácidos, do molusco *Conus magus* que apresenta atividade bloqueadora de canais de cálcio, a POI com 38 aminoácidos, proveniente da mosca *Musca domestica* que inibe a fenoloxidase e as  $\mu$ -Agatoxin-I e IV ambas com 36 aminoácidos, da aranha *Agelenopsis aperta*, que tem atividade bloqueadora de canais de sódio (Craik *et al.*,2001).

### 1.6 – *Avicularia juruensis*

A aranha caranguejeira *Avicularia juruensis* (Figura 2) é uma aranha migalomorfa pertencente ao gênero *Avicularia*, o qual é constituído por 14 espécies. São animais amazônicos de hábitos arborícolas, que vivem em arbustos e palmeiras, onde fazem seus “ninhos”. Diferem-se dos outros gêneros da família Theraphosidae (Mello - Leitão, C., 1923) por apresentarem a 1ª fileira dos olhos extremamente pró curva, apófise tibial da perna I com 1 ramo só, formado por vários espinhos juntos, bulbo copulatório com êmbolo longo e fino, torcido retro lateralmente, tarso e metatarso espatuliforme e pelo urticante do tipo II. No Brasil, esta espécie pode ser encontrada nos estados do Acre, Rondônia, Amazonas e Mato Grosso, podendo ocorrer também em algumas áreas do Peru e da Bolívia (Figura 3).



**Figura 2 – Exemplar de *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae).**

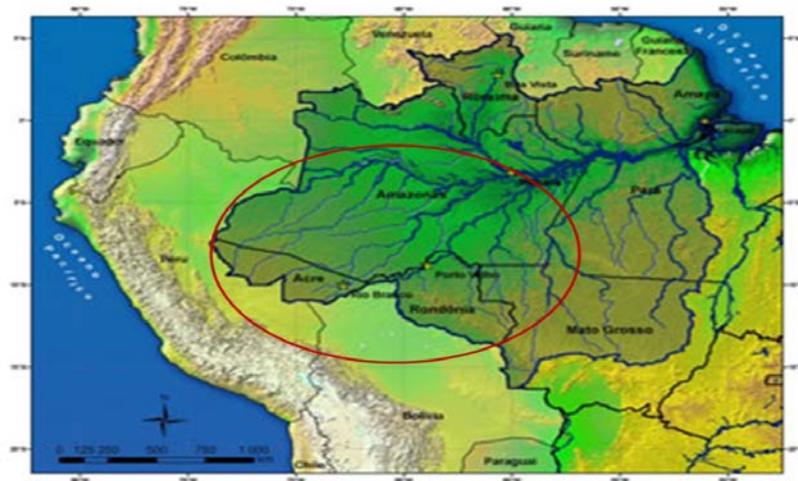


Figura 3 – Área de ocorrência da espécie *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae).

## **II – Objetivos**

### **1 – Objetivos Gerais**

Este estudo teve como principal objetivo a caracterização do veneno e a identificação e caracterização de moléculas bioativas presentes no veneno da aranha caranguejeira *Avicularia juruensis*, em especial peptídeos antimicrobianos.

### **2 - Objetivos Específicos**

- Caracterizar o veneno de *Avicularia juruensis*, avaliando as atividades presentes no veneno, tais como atividade caseinolítica, gelatinolítica (zimografia) e fibrinogenolítica;

- Isolar, purificar e caracterizar as frações que apresentaram atividade antimicrobiana a partir da purificação do veneno de *Avicularia juruensis*;

## **III – Material e Métodos**

### **1 – Animais**

Para a realização deste estudo, foram utilizadas aranhas migalomorfas pertencentes à espécie *Avicularia juruensis* da subfamília Aviculariinae e família Theraphosidae (Figura 2), de ambos os sexos e diferentes estágios de desenvolvimento, 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.

## **2 – Extração do Veneno**

Após a contenção dos animais foi feita a extração do veneno com o auxílio de um estimulador elétrico (AVS-100), onde foram aplicados choques de 15 a 30 Volts (dependendo do tamanho do animal). Os eletrodos foram posicionados na parte ventral do animal, em um local denominado esterno, ou na região basal das quelíceras e coletado com o auxílio de uma micropipeta, ou com as quelíceras posicionadas dentro de um tubo de micro centrífuga de volume de 0,5 mL, fazendo com que o veneno escorra diretamente para dentro do tubo. Após a coleta, o veneno foi centrifugado a 16.000 x g durante 15 minutos a 4°C. A fração solúvel foi seca em uma centrífuga a vácuo (Savant Instrument Inc) ou liofilizador (Thermo) e reservada a -20°C até o uso. Para todos os experimentos foi utilizado um “pool” de veneno.

## **3 – Caracterização Bioquímica do Veneno**

### **3.1 – Dosagem Protéica**

A dosagem protéica do veneno foi feita utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific), de espectro completo (190 a 840 nm), com um comprimento de onda de 280nm. O veneno liofilizado foi ressuspenso em água ultra pura e aplicado 1µL para avaliação. Também foi feita a dosagem do veneno pelo método descrito por Bradford (1976). Ambas apresentaram resultados semelhantes.

### **3.2 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Géis de poliacrilamida em concentrações de 10% e 15% de acrilamida foram utilizados nesta preparação, a qual foi realizada sob voltagem constante de 100 V, em condições redutoras e não-redutoras (pela presença ou ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, respectivamente). A concentração utilizada do veneno foi de 10 $\mu$ g/ $\mu$ L, que foram diluídos em um mesmo volume de tampão de amostra (4 vezes concentrado) (350 mM de Tris/HCl; 30% de glicerol; 1,2 mg de azul de bromofenol;), e fervidas a 100°C em termobloco durante 5 minutos. O material foi aplicado em um gel de empilhamento de 4,5 % de poliacrilamida. Foi utilizado o marcador de massa molecular Fermentas (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder). O ensaio foi realizado em um sistema Mini-PROTEAN III da Biorad™ (18 x 16 cm x 1,5 mm).

A revelação das bandas protéicas dispostas nos géis se deu através da utilização do corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Os géis foram descorados através da imersão contínua em uma solução contendo metanol/ácido acético/água, na proporção 30:10:60.

A eletroforese é um método muito utilizado para a avaliação quantitativa e qualitativa de proteínas. Tem alta resolução, permitindo a determinação das massas moleculares através da migração das proteínas numa matriz de poliacrilamida. O método mais utilizado é o descrito por Laemmli (1970).

### **3.3 – Zimografia em Gel de Poliacrilamida com SDS co-polimerizado com Gelatina**

A técnica de zimografia é uma técnica de eletroforese para avaliar a atividade proteolítica. A matriz em que as proteínas serão separadas, constituída de poliacrilamida, é co-polimerizada com diversos substratos, nesse caso com gelatina, que é degradado pelas peptidases durante o período de incubação. A coloração azul do gel revela os locais de proteólise como faixas brancas sobre o fundo azul escuro (Leber & Balkwill, 1997).

Para este ensaio, foram utilizados géis (18 x 16 cm x 1,5 mm) na concentração de 12,5%, contendo gelatina (na concentração final de 1mg/mL). A eletroforese ocorreu em voltagem de 100 V, sob condições não redutoras. Após a corrida os géis foram lavados por 60 minutos em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, contendo 2,5% do detergente Triton X-100, para a remoção do SDS presente no gel. Em seguida foram lavados 3 vezes por 5 minutos com água ultra pura para a remoção do Triton X-100 e incubados por 12 horas a 37°C em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 com CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 200 mM e 0,02% de IGEPAL. Os géis foram submetidos ao mesmo processo de revelação de bandas protéicas aplicado para SDS-PAGE, utilizando o corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma, St. Louis, USA). A descoloração foi feita até o aparecimento das áreas de atividade proteolítica.

#### **3.4 – Zimografia em Gel de Poliacrilamida com SDS co-polimerizado com Caseína**

Para avaliar a atividade caseinolítica do veneno, foi preparado um gel de SDS-PAGE a 12,5% co-polimerizado com caseína bovina (0,1%). Foram aplicadas alíquotas do veneno (10µg/µL), diluídos em um mesmo volume de tampão de amostra (4 vezes concentrado) (350 mM de Tris/HCl; 30% de glicerol; 1,2 mg de azul de bromofenol;). A eletroforese ocorreu em voltagem de 90 V. Após a corrida, o gel foi lavado em uma solução de Triton X-100 a 2,5% por 30 minutos para a remoção do SDS e incubado *overnight* a 37°C no tampão de reação (Tris-HCl 30 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM e CaCl<sub>2</sub> 10 mM). O gel foi submetido ao mesmo processo de revelação de bandas protéicas aplicado para SDS-PAGE, utilizando o corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma, St. Louis, USA). A descoloração foi feita até o aparecimento das áreas de atividade proteolítica.

### 3.5 – Perfil de degradação de Fibrinogênio em Gel de Poliacrilamida

A atividade fibrinogenolítica do veneno foi avaliada em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970). As amostras de veneno foram incubadas a 37°C com uma solução de fibrinogênio humano (5mg/mL, Sigma Aldrich, St.Louis, USA) diluído em água ultra pura (3µL de veneno para 3 µL da solução de fibrinogênio), por 1 hora em banho termostatizado (37°C). Ao final da incubação, as amostras foram reduzidas com β-mercaptoetanol (tampão de amostra com redução) e fervidas em termobloco por 5 minutos à 100°C. Em seguida, a mistura foi aplicada em gel de poliacrilamida a 10% e submetido à eletroforese com corrente de 90 V.

Como controle de integridade da molécula de fibrinogênio, utilizamos uma alíquota da solução de fibrinogênio incubada com tampão (Tris-HCl 50mM, pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> 1M), denominado de controle 1. Para o controle do perfil do veneno, utilizamos uma alíquota do veneno incubada com tampão (controle 2). Por fim, para o controle de atividade fibrinogenolítica, utilizamos uma alíquota de veneno de *Bothrops jararaca* (solução de 6,25 mg/mL) incubada com a solução de fibrinogênio e tampão (controle 3), e para avaliar o perfil do veneno de *Bothrops jararaca*, foi incubado uma alíquota do veneno com tampão. Todos os controles foram incubados por 1 hora em banho termostatizado à 37°C e depois aplicados ao gel. O gel foi corado com solução de nitrato de prata.

### 3.6 – Hidrólise do Colágeno I

A solução de colágeno I de tendão de cauda de rato (BD – Biosciences), em ácido acético 0,02 M teve seu pH neutralizado (pH ~7) com tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, e foi incubada com o veneno bruto de *Avicularia juruensis*. A reação ocorreu em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 contendo CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, na proporção enzima:substrato 1:10 durante 1 hora, 3 horas e 18 horas a 37 °C. As reações enzimáticas foram interrompidas pela adição de tampão desnaturante e redutor para eletroforese e aquecidas

a 95 °C por 5 minutos (Laemmli, 1970). Uma amostra de colágeno I, usada como controle, foi incubada sem o veneno bruto em condições idênticas de concentração, temperatura e tempo. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de gradiente de 6-18% de SDS-poliacrilamida e corado com prata.

#### **4 – Purificação de Peptídeos Antimicrobianos**

O veneno obtido por estimulação elétrica foi reconstituído em água ultra pura acidificada (ácido trifluoracético 0,05% - TFA), centrifugado a 16.000 xg e então, a fração solúvel, submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A purificação por CLAE foi realizada a temperatura ambiente, utilizando um sistema de cromatografia líquida Shimadzu Prominence. A absorvância foi monitorada a 225 nm. Na primeira etapa de purificação, o material foi aplicado em uma coluna de fase reversa semi-preparativa Jupiter C18 e a eluição realizada em um gradiente de acetonitrila em água acidificada de 0 a 80%, por 60 minutos, sob um fluxo de 1,5 mL/min. As frações que apresentaram atividade e não se mostraram homogêneas, quando analisadas por espectrometria de massa, foram repurificadas por CLAE utilizando-se uma coluna de fase reversa tanto semipreparativa como analítica Júpiter C18 em diferentes gradientes de concentração de acetonitrila.

As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente, concentradas em uma centrífuga a vácuo (Savant Instrument Inc), e reconstituídas em água ultra pura.

## 5 – Bioensaios

### 5.1 – Micro-organismos

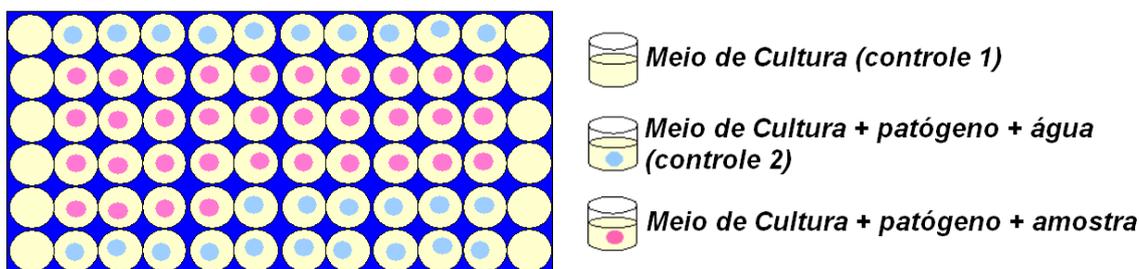
Para os ensaios antimicrobianos, foram utilizadas as bactérias Gram positiva *Micrococcus luteus* A270 e Gram negativa *Escherichia coli* SBS363 (obtidas da coleção do Instituto Pasteur, em Paris) e a levedura *Candida albicans* MDM8 (obtida da Coleção do Departamento de Microbiologia do Instituto de 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 foram obtidas junto ao American Type Culture Collection (ATCC). As leveduras *Candida krusei* IOC 4559, *C. glabrata* IOC 45658, *C. albicans* IOC 45588, *C. parapsilosis* IOC 456416, *C. tropicalis* IOC 45608 e *C. guilliermondii* IOC 455716 foram obtidas de isolados clínicos (agentes da candidíase) gentilmente cedidos pela Dra. Miriam A. F. Hayashi (Depto. Farmacologia/UNIFESP) e depositados na coleção do Instituto Oswaldo Cruz. O fungo filamentosso *Beauveria bassiana* foi isolado a partir de uma aranha mumificada coletada em campo pelo nosso grupo, e os fungos filamentosos *A. niger*, *A. flavus* e *Cladosporium sp* foram obtidos a partir de isolados de pão. Já o fungo filamentosso *Paecilomyces farinosus* IBCB 113 foi obtido da coleção do Instituto Biológico de Campinas.

### 5.2 – Atividade Antimicrobiana

A presença de atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) no material fracionado foi determinada por ensaios de inibição de crescimento em meio líquido (Bulet *et al.*, 1993), o qual consiste em utilizar de 10 µL ou 20 µL da fração a ser testada ou de água (controle), aplicados em poços de uma microplaca, adicionando-se 90µL ou 80µL de meio de

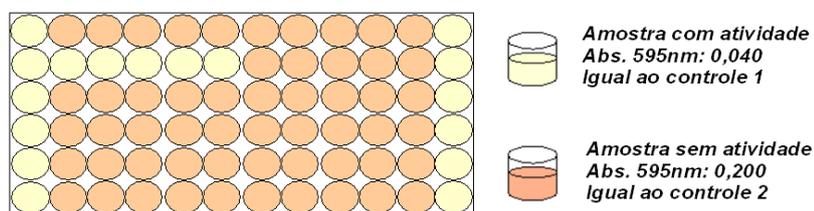
cultura contendo uma suspensão de uma cultura de microorganismo em fase logarítmica. O crescimento dos microorganismos foi avaliado por medida de absorbância da cultura por um leitor de microplaca Victor3 (1420 Multilabel Counter/Victor3 – PerkinElmer) a 595 nm após 18 horas de incubação a 30°C (fig. 3). Como controle de inibição de crescimento, foram utilizados a Tetraciclina e/ou Anfotericina B, que são, respectivamente, um antibiótico e um antifúngico comerciais. 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.

### ENSAIO DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO



*Incubação a 30°C por 18 horas sob agitação*

### Absorbância a 595nm



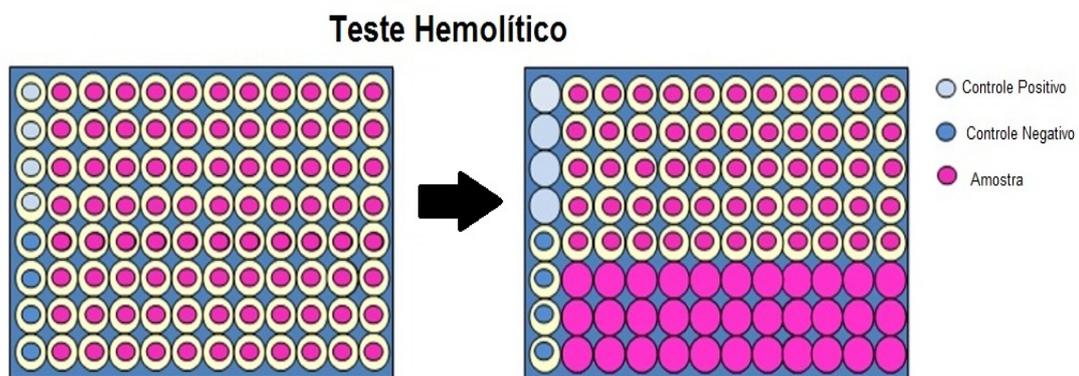
**Figura 4 – Teste de atividade antimicrobiana em microplaca de 96 poços.**

### 5.3 – Ensaio Hemolítico

A atividade hemolítica do peptídeo AJ22-2 foi testada contra eritrócitos humanos em microplaca de 96 poços com fundo em “U” (Figura 5). O sangue de um doador voluntário saudável, coletado na presença de tampão citrato de sódio (150 mM; pH 7,4) foi centrifugado por 15 minutos a 700 x g, lavados três vezes e ressuspendido em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM; pH 7,4). A solução do peptídeo AJV22 num volume de 50µL foi testado em triplicata adicionando-se mais 50µL de uma solução 3% (v/v) de eritrócitos em PBS. A microplaca foi centrifugada por 5 min a 700 x g após ter sido incubada por três horas em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido e usado para medida de absorvância (λ=414nm) em um leitor de microplaca Victor<sup>3</sup> (1420 Multilabel Counter/ Victor<sup>3</sup> – Perkin Elmer). As medidas de absorvância do sobrenadante para 0 e 100% de hemólise foram obtidas com 50µL da solução 3% de hemácias em 50µL de PBS e Triton X-100 0,1%, respectivamente. O valor da absorvância a 414nm das hemácias em PBS e Triton X-100 0,1% 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 414nm, pois este foi o pico de absorvância da solução após o rompimento dos eritrócitos em Triton X-100 0,1%. Este comprimento de onda é semelhante ao pico de Abs da cadeia α oxigenada da hemoglobina em solução (λ=413,7nm), segundo dados de Sugita, 1975.



**Figura 5 – Esquema de Ensaio Hemolítico em microplaca.**

## 6 – Caracterização Estrutural

### 6.1 - Espectrometria de Massa

Para controlar a pureza e avaliar a massa molecular das moléculas com atividade antimicrobiana durante a etapa de purificação foi utilizado espectrometria de massa. As análises foram realizadas por MALDI/TOF-MS (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight”) durante as etapas de purificação para controlar a pureza das moléculas e para avaliarmos a massa daquelas que apresentaram atividade antimicrobiana. Inicialmente, 0,35µL da amostra em água ultrapura foram misturadas em um mesmo volume de cristais de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, depositadas sobre a lâmina e deixadas sobre 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. As moléculas são aceleradas através de um campo elétrico, sendo direcionadas para um analisador de tempo de vôo, que permite determinar a relação massa/carga ( $m/z$ ) dos íons formados de moléculas ionizadas em fase gasosa, medindo o tempo que o íon leva para atingir o detector. A velocidade adquirida por um íon acelerado por uma dada energia dentro de um campo elétrico é inversamente proporcional à sua relação  $m/z$ . Os íons são, portanto, detectados em ordem crescente. A detecção foi efetuada em modo positivo. Os espectros finais foram obtidos após o acúmulo de 200 espectros simples ou após 5 minutos de análise, iniciando-se com 34% de energia do laser, e posteriormente calibrados. A calibração do equipamento foi realizada com um padrão de massa molecular contendo os peptídeos angiotensina II e P<sub>14</sub>R (Sigma Aldrich, St, Louis, MO, EUA) com massas moleculares monoisotópicas de 1.045,53 e 1.532,86 Da, respectivamente.

Para a determinação da seqüência de aminoácidos dos peptídeos com atividade antimicrobiana, utilizamos o equipamento Q-ToF Ultima API (Micromass) operando em modo positivo de ionização.

## 6.2 – Sequenciamento “De novo”

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

Os produtos da digestão enzimática dos peptídeos (ver item 6.4) foram ressuspensos em 20µL em ACN/H<sub>2</sub>O 1:1 com ácido fórmico 0,1% e submetidos à análise por infusão direta sob fluxo de 0,5µL/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 minutos de aquisição.

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

### **6.3 - Redução e Alquilação das Frações AJ22-2 e AJ24**

As frações AJ22-2 e AJ24 foram submetidas à redução e alquilação usando os procedimentos descritos por Bulet *et al.*, (1993). Alíquotas dos peptídeos (2nmol) foram dissolvidas em 40µl de Tris-HCL 0,5M contendo ácido etilenodiaminotetra acético (EDTA), 2mM e hidrocloreto de guanidina (6M), pH 7,5, ao qual, 2µl de ditioneitol (DTT) 2,2 M foram adicionados. A amostra foi submetida sob atmosfera de nitrogênio durante a incubação por 1h a 45°C, protegida da luz. Após a incubação, foi adicionado 2µl de 4-vinilpiridina pura e, incubada por tempo adicional de 10min.

### **6.4 - Clivagem Enzimática das Frações AJ22-2 e AJ24 com Tripsina**

As frações AJ22-2 e AJ24 foram tratadas com tripsina (Boehringer Mannheim) numa razão enzima /substrato de 1:20 (p/p) em que 40µl de reação contendo 0,1 M de Tris-HCL, pH 7,5. A incubação foi realizada por 16 horas a 37 °C. A reação foi interrompida por acidificação do meio com TFA 0,1%. O espectro de massas dos fragmentos gerados foi obtido utilizando um Maldi-TOF. A ferramenta de busca utilizada para analisar os resultados obtidos contra diferentes bancos de dados foi o MASCOT (Matrix Science, London, UK).

### **6.5 – Modelagem por Homologia**

Como a molécula com atividade antimicrobiana encontrada (juruína) apresenta 60% de identidade com a sequência encontrada na U1-theraphotoxin-Ba1a (PDB ID: 2KGH) da aranha caranguejeira *Brachypelma ruhnai*, com todos os resíduos de cisteína conservados quando feito o

alinhamento por Muscle (Edgar, 2004), a estrutura da U1-theraphotoxin-Ba1a, determinada por Ressonância Magnética Nuclear (NMR, em inglês) (Corzo *et al.*, 2009), foi utilizada como modelo para se fazer modelagem por homologia. SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009), um servidor automatizado de modelagem de proteínas (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>), foi utilizado para se obter um modelo tridimensional preliminar da juruína. Contudo, 3 pontes de dissulfeto estavam faltando no modelo. As pontes de dissulfeto foram incorporadas utilizando-se o módulo Biopolymer do software Insight II (Accelrys). O modelo foi submetido à minimização de energia usando o método de gradiente, seguido do método de gradiente conjugado até que o RMSD (a raiz do desvio médio quadrático) fosse 0,5 kcal/mol Å (1kcal≈4.184 kJ). A estrutura resultante foi verificada para o comprimento e consistência do ângulo da ligação, assim como para a conformação da ligação peptídica. A qualidade da estrutura final foi avaliada utilizando um gráfico de Ramachandran.

## IV – Resultados

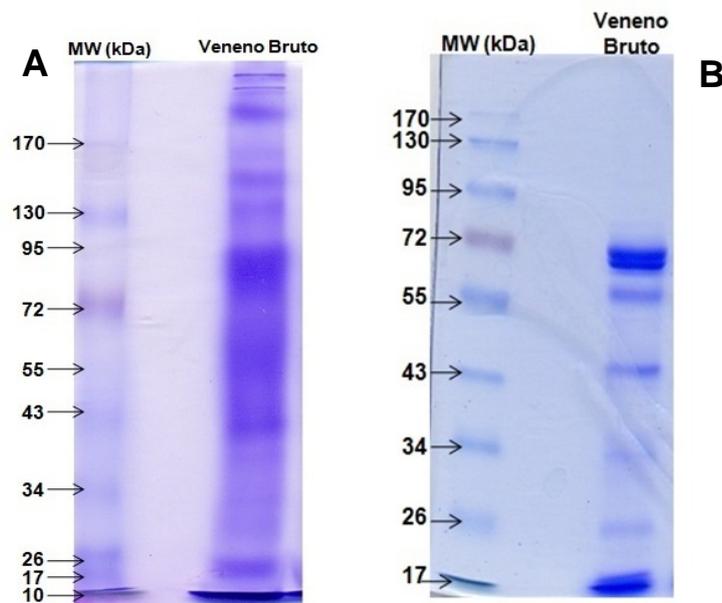
### 1 - Caracterização Bioquímica do Veneno

#### 1.1– Dosagem Protéica

Ao ser aplicado no NanoDrop, o veneno apresentou uma concentração de 11,2 mg/mL. Ao ser analisado pelo método de Bradford (1976), o veneno apresentou resultado semelhante.

#### 1.2 – Perfil Eletroforético Com e Sem Redução

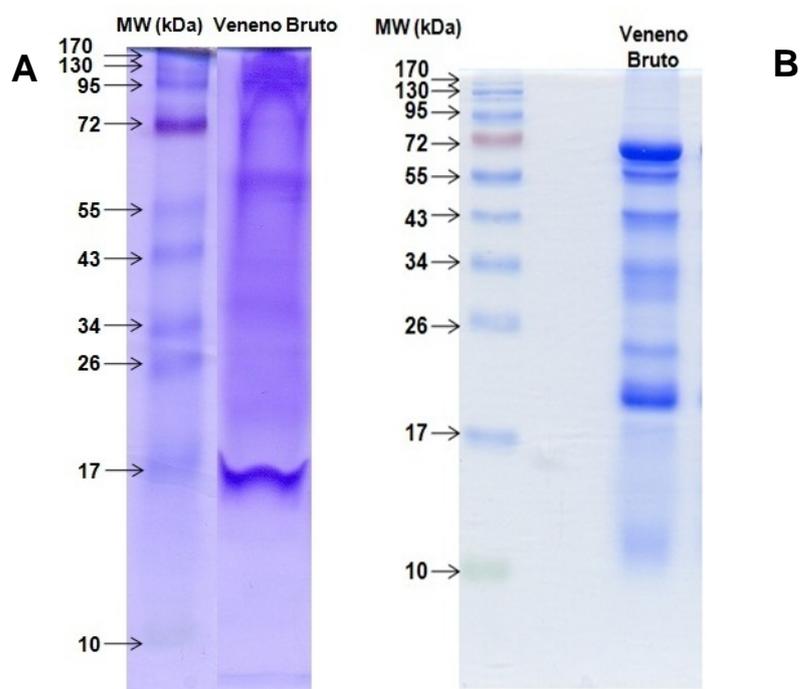
O gel em condições não redutoras a 10% (Figura 6 A) possibilitou a visualização de bandas com massa molecular nas faixas entre 170 e 130 kDa, 95 kDa, 55 kDa, 43 kDa, e 17 kDa. Já o gel em condições redutoras a 10% (Figura 6 B) apresenta bandas majoritárias nas faixas de 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa e 17 kDa.



**Figura 6 – Perfil eletroforético do veneno bruto de *Avicularia juruensis* (11,2 mg/mL) em SDS-PAGE a 10%: (A) gel em condições não**

redutoras; **(B)** gel em condições redutoras. Foram aplicados 112µg de veneno.

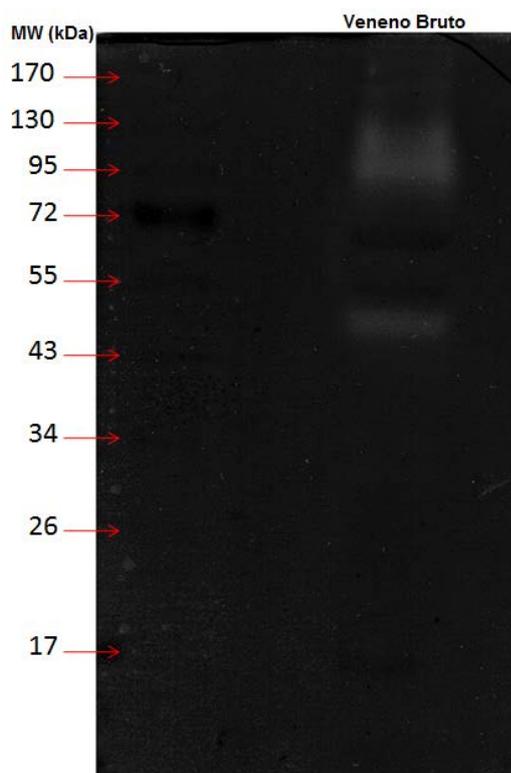
O gel em condições não redutoras a 15% (Figura 7 A) apresentou bandas nas faixas de 95 kDa, entre as faixas de 72 e 55 kDa, 34 kDa e 17 kDa. Em condições redutoras a 15% (Figura 7 B), o gel apresentou bandas na altura de 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 17 kDa e 10 kDa.



**Figura 7 - Perfil eletroforético do veneno bruto de *Avicularia juruensis* (11,2 mg/mL) em SDS-PAGE a 15%: (A) gel em condições não redutoras; (B) gel em condições redutoras. Foram aplicados 100µg de veneno.**

### 1.3 – Atividade Gelatinolítica

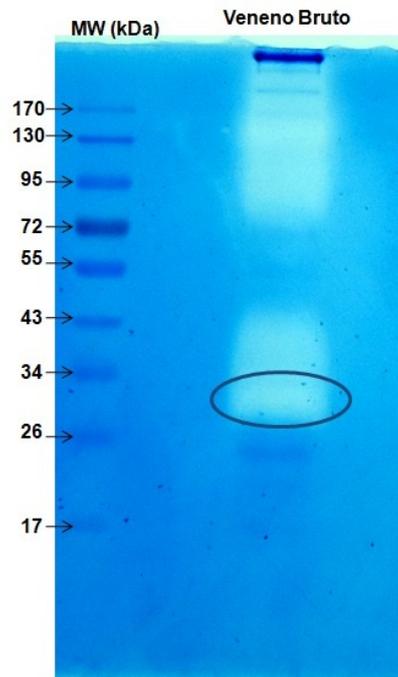
A verificação da presença de proteases no veneno se dá através da habilidade desse veneno em degradar a gelatina na zimografia. Foi possível evidenciar a presença de proteases com atividade gelatinolítica (Figura 8), principalmente na faixa de massa molecular entre 95 kDa e 130 kDa e 55 kDa a 43 kDa. O resultado obtido no gel pode indicar uma possível presença de metaloproteases no veneno de *Avicularia juruensis*.



**Figura 8 – Perfil eletroforético de atividade gelatinolítica em SDS-PAGE 12,5% do veneno bruto de *Avicularia juruensis* (11,2mg/mL).** As bandas em branco indicam uma possível atividade proteolítica do veneno sobre a gelatina incorporado ao gel na faixa de 72 kDa. Foram aplicados 100µg do veneno.

#### 1.4 – Atividade Caseinolítica

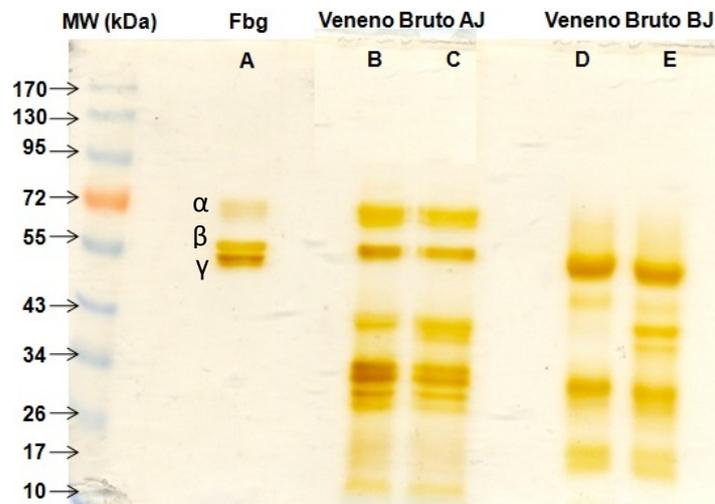
O veneno de *Avicularia juruensis* apresentou atividade proteolítica sobre a caseína (Figura 9). Podemos ver bandas evidenciando a atividade na faixa de massa molecular de 130 kDa, com atividade mais evidenciada entre as faixas de 34 kDa e 26 kDa.



**Figura 9 – Perfil eletroforético de atividade caseinolítica em SDS-PAGE 10% do veneno bruto de *Avicularia juruensis* (11,2mg/mL).** As bandas em branco evidenciam a atividade proteolítica do veneno sobre a caseína incorporada ao gel na faixa entre 34 e 26 kDa. Foram aplicados 100µg do veneno.

## 1.5 – Atividade Fibrinogenolítica

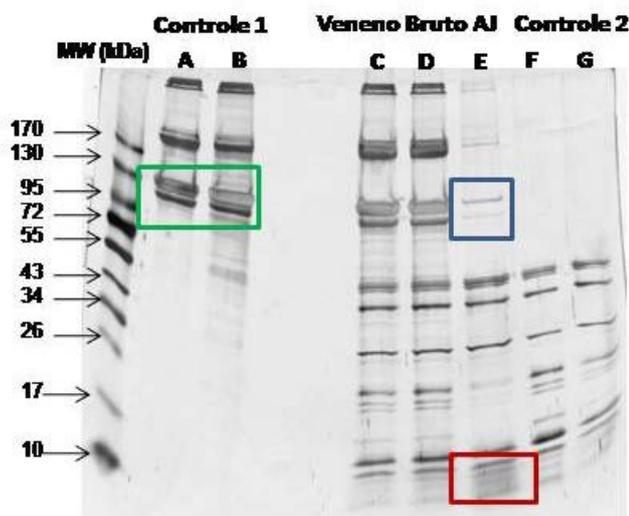
O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática heterotrimérica, composta por três cadeias polipeptídicas,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , e de massa molecular de 66.500 Da, 56.000 Da e 47.000 Da, respectivamente (Mckee et al., 1966). Analisando o perfil eletroforético de atividade fibrinogenolítica (Figura 10), podemos notar que ao compararmos o perfil do padrão de fibrinogênio (em que é possível visualizar suas 3 cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) com o do veneno bruto de *Avicularia juruensis*, este promoveu a hidrólise somente da cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio. Para este experimento utilizamos o veneno de *Bothrops jararaca* como controle, já que este apresenta uma forte atividade sobre o fibrinogênio, degradando as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , como evidenciado na Figura 10 (E).



**Figura 10 – Perfil eletroforético de atividade fibrinogenolítica em SDS-PAGE 10% do veneno bruto de *Avicularia juruensis* (11,2mg/mL). (A)** Perfil do padrão de fibrinogênio, com suas 3 cadeias ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ); **(B)** perfil do veneno bruto de *Avicularia juruensis*; **(C)** perfil do veneno bruto de *Avicularia juruensis* incubado com fibrinogênio; **(D)** perfil do veneno bruto de *Bothrops jararaca* (5mg/mL); **(E)** perfil do veneno bruto de *Bothrops jararaca* incubado com fibrinogênio usado como controle de atividade. Foram aplicados 33,6 $\mu$ g do veneno de *Avicularia juruensis* e 15 $\mu$ g do veneno de *Bothrops jararaca*.

## 1.6 – Hidrólise do Colágeno I

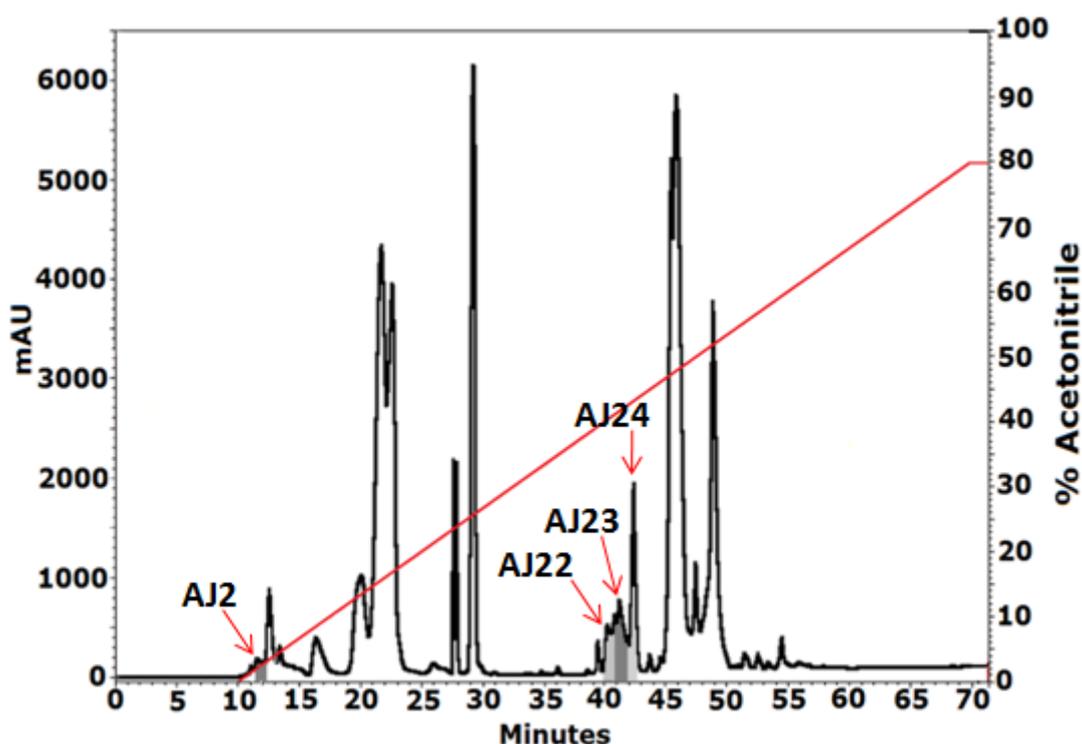
O colágeno I é o componente mais abundante da matriz extracelular, formado por duas cadeias  $\alpha 1$  e uma cadeia  $\alpha 2$  (destacadas em verde) de massas moleculares de 128 kDa e 116 kDa, respectivamente. Após a incubação do veneno bruto de *Avicularia juruensis* com o colágeno I no período de 18 horas podemos observar que as cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  diminuíram de intensidade (destacado em azul) em comparação com o controle. Notamos também que, após 18 horas de incubação com o veneno bruto, é possível observar produtos nítidos de hidrólise (destacado em vermelho). (Figura 11).



**Figura 11 – Perfil eletroforético de atividade sobre o colágeno I em SDS-PAGE em gradiente de 6-18% de poliacrilamida do veneno bruto de *Avicularia juruensis* (11,2mg/mL). (A) e (B) Perfil do padrão de colágeno I, com suas 2 cadeias ( $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , destacadas em verde), incubados por 0h e 18h respectivamente; (C), (D) e (E) Perfil do veneno bruto de *Avicularia juruensis* incubado com colágeno I por 1h, 3h e 18h respectivamente. Nota-se, em azul, que houve a hidrólise das cadeias do colágeno I, e, destacado em vermelho, um provável produto desta hidrólise; (F) e (G) Perfil do veneno bruto de *Avicularia juruensis* incubado com tampão por 0h e 18h respectivamente.**

## 2 – Purificação de Peptídeos Antimicrobianos

Para o isolamento dos peptídeos antimicrobianos, o “pool” de veneno da aranha caranguejeira *A. juruensis* obtido a partir da extração e concentrado em centrifuga a vácuo, foi ressuspendido em água acidificada (TFA 0,05%) e submetido à cromatografia líquida de fase reversa, utilizando-se uma coluna Júpiter semi-preparativa C18. Todas as frações obtidas foram analisadas quanto a atividade antimicrobiana utilizando-se os micro-organismos *M. luteus* A270, *E. coli* SBS363 e *C. albicans* MDM8. Das 34 frações obtidas apenas quatro apresentaram atividade antimicrobiana AJ2, AJ22, AJ23 e AJ24 (Figura 12 e Tabela 1).

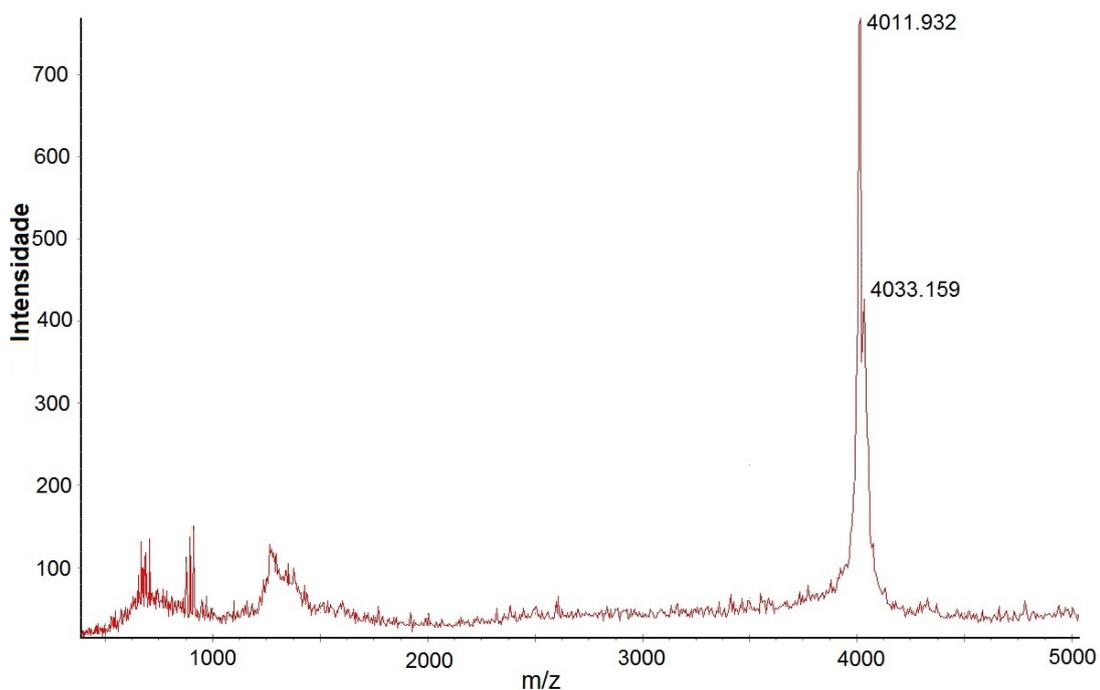


**Figura 12 – Primeira etapa de purificação de fatores antimicrobianos do veneno de *A. juruensis*.** Veneno de *A. juruensis* analisado por cromatografia líquida em coluna semipreparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 0 a 80% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min. Frações assinaladas apresentaram atividade antimicrobiana.

**Tabela 1: Massas moleculares e atividades antimicrobianas das frações encontradas no veneno de *A. juruensis*.**

<b>Fração</b>	<b><i>C. albicans</i></b>	<b><i>M. luteus</i></b>	<b><i>E.coli</i></b>	<b>m/z</b>
<b>AJ2</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>4011,9</b>
<b>Juruína (AJ22)</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>4005,9</b>
<b>AJ23</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>4005,4; 4321,4; 3599,9; 4254,3</b>
<b>AJ24</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>4253,8; 4321,4</b>

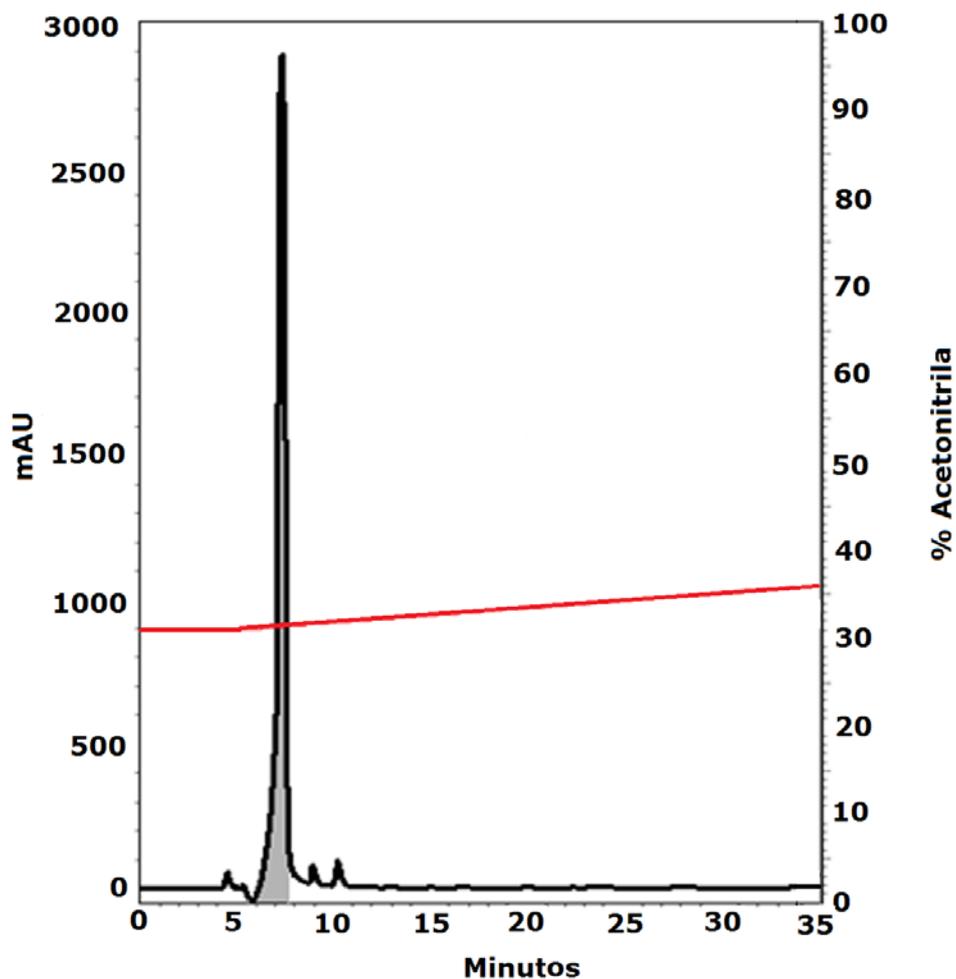
A fração AJ2 que apresentou atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos testados (*C. albicans*, *M. luteus* e *E. coli*) (Tabela 1), apresentou-se pura já nessa primeira etapa de purificação. Quando analisada por espectrometria de massa do tipo Maldi-TOF mostrou apenas um íon mono carregado de m/z igual a 4011,9 e um aduto de sódio com m/z 4033.159 (Figura 13). Devido à pequena quantidade de material obtido, não foi possível o sequenciamento dessa molécula de 4011Da. Maior quantidade de veneno será necessária para a completa caracterização desse peptídeo.



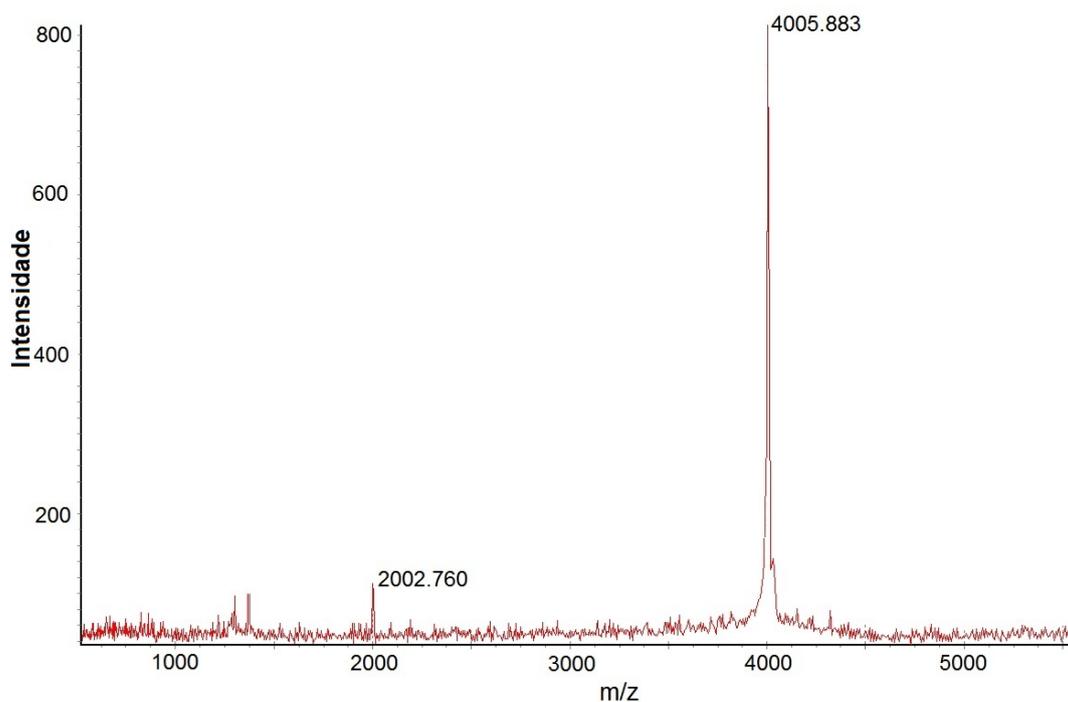
**Figura 13 - Espectro de massa (Maldi-TOF) da fração AJ2.** A análise da fração mostrou a presença de apenas um íon monocarregado de  $m/z$  igual a 4011,9 e um aduto de sódio com  $m/z$  4033.159.

A fração AJ22 que apresentou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* (Tabela 1) foi submetida a uma nova etapa de purificação por não se apresentar totalmente pura quando analisada por espectrometria de massa do tipo Maldi-TOF (resultado não mostrado).

A fração AJ22 foi repurificada por cromatografia líquida de fase reversa utilizando-se uma coluna Júpiter C18 analítica. Nessa repurificação obtivemos 1 fração principal (Figura 14), a AJ22-2, e esta apresentou atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. (Tabela 1). Esta fração, quando analisada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF, mostrou-se pura com um íon mono carregado de  $m/z$  igual a 4005,9 e um íon duplamente carregado de  $m/z$  igual a 2002,8 (Figura 15) revelando uma massa de 4005 Da.

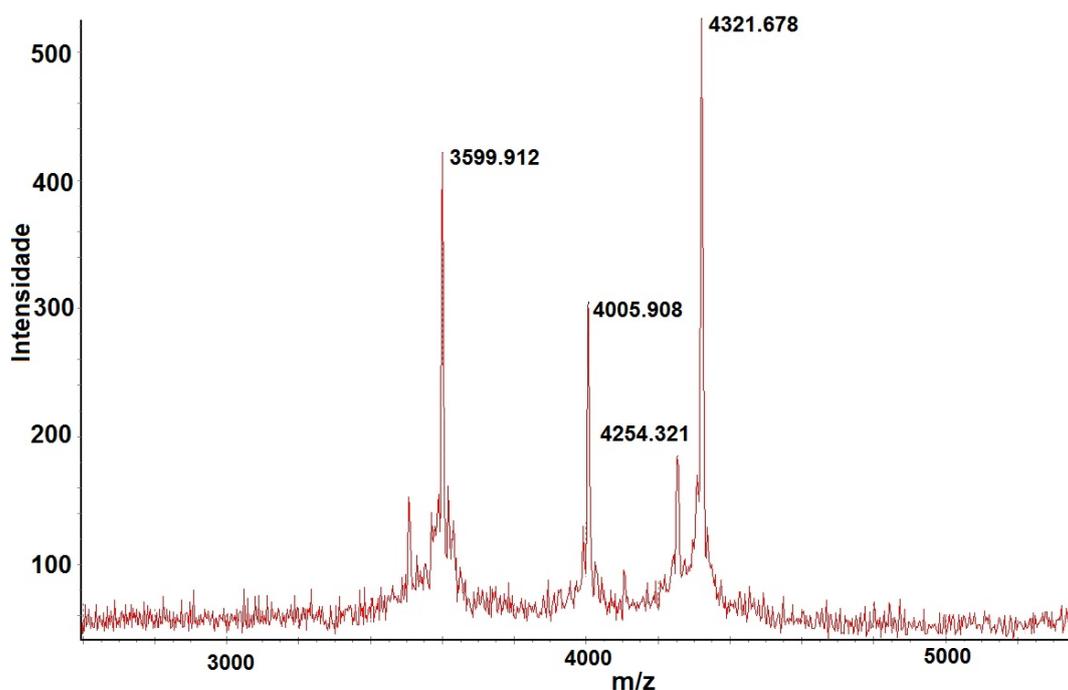


**Figura 14 – Segunda etapa de purificação da fração AJ22.** A fração contendo AJ22 (Figura 12) foi submetida a uma segunda etapa de purificação por cromatografia líquida utilizando-se uma coluna de fase reversa analítica do tipo Júpiter C18 em um gradiente linear bifásico de 2 a 31% (5min.) e de 31 a 41% (60 min.) de acetonitrila em água acidificada, sob um fluxo de 1 mL/min. O material eluído no pico majoritário apresentou atividade contra *C. albicans*.



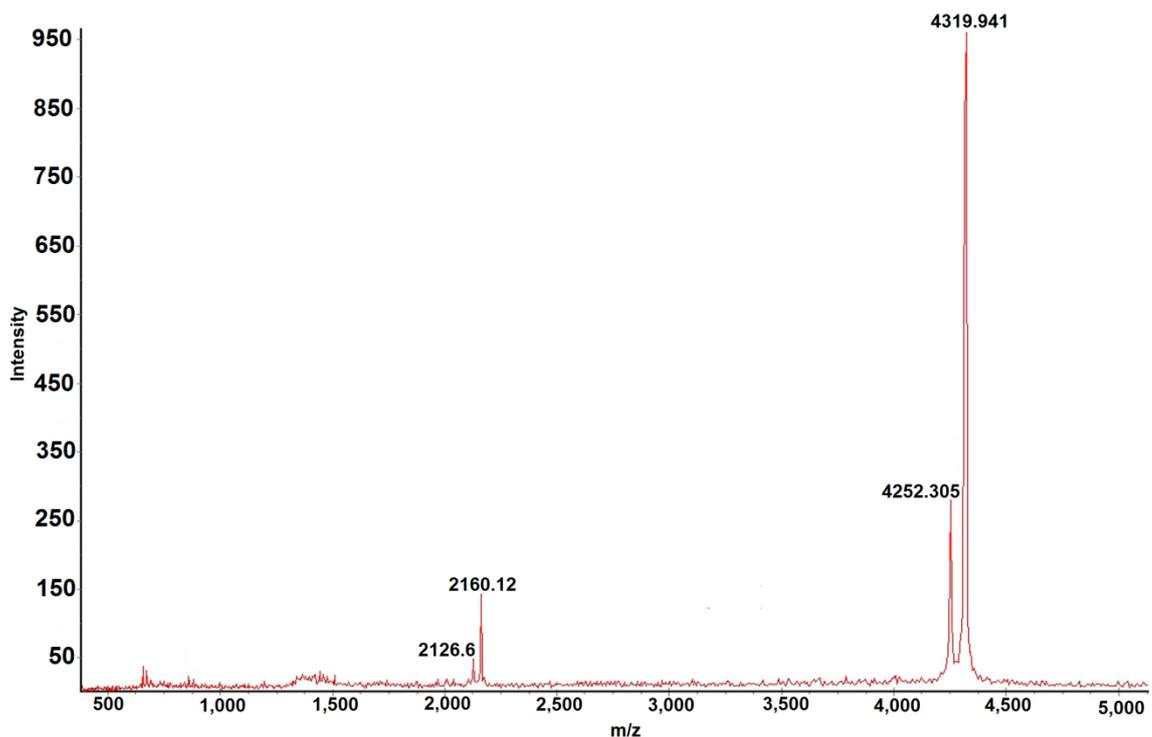
**Figura 15 - Espectro de massa (Maldi-TOF) fração AJ22-2.** A análise da fração AJ22-2 mostrou um íon mono carregado de  $m/z$  igual a 4005,9 e um íon duplamente carregado de  $m/z$  igual a 2002,8 revelando uma massa de 4005Da.

A fração AJ23 (Figura 12), que apresentou atividade antimicrobiana contra os micro-organismos *C. albicans* e *E. coli* (Tabela 1), quando analisada por espectrometria de massa do tipo Maldi-TOF (Figura 16) mostrou  $m/z$  de valores 3599.912, 4005,9 (AJ22-2) e 4321,6 (AJ24). Talvez sua atividade antimicrobiana se deva a presença de parte das frações AJ22-2 e AJ24, por isso mais estudos serão necessários para verificar se a atividade é por conta dessa presença ou se há alguma outra molécula responsável por essa atividade.



**Figura 16 - Espectro de massa (Maldi-TOF) fração AJ23.** A análise da fração AJ23 mostrou uma molécula de m/z igual a 3599,9, uma molécula com valor de m/z igual a 4005,9 (possível presença da fração AJ22-2), uma de valor m/z igual a 4254,3 e uma molécula de m/z igual a 4321,6 (possível presença da fração AJ24).

A análise da fração AJ24 (Figura 12), que apresentou atividade antimicrobiana contra o microrganismo *C. albicans* (Tabela 1), mostrou a presença de duas moléculas de massa 4.253Da e 4.320Da. No espectrograma (Figura 17) podemos ver os íons duplamente carregados de m/z igual a 2.126,6 e 2.160,12 e mono carregados de m/z igual a 4.252,305 e 4.319,941 da primeira e segunda moléculas respectivamente.

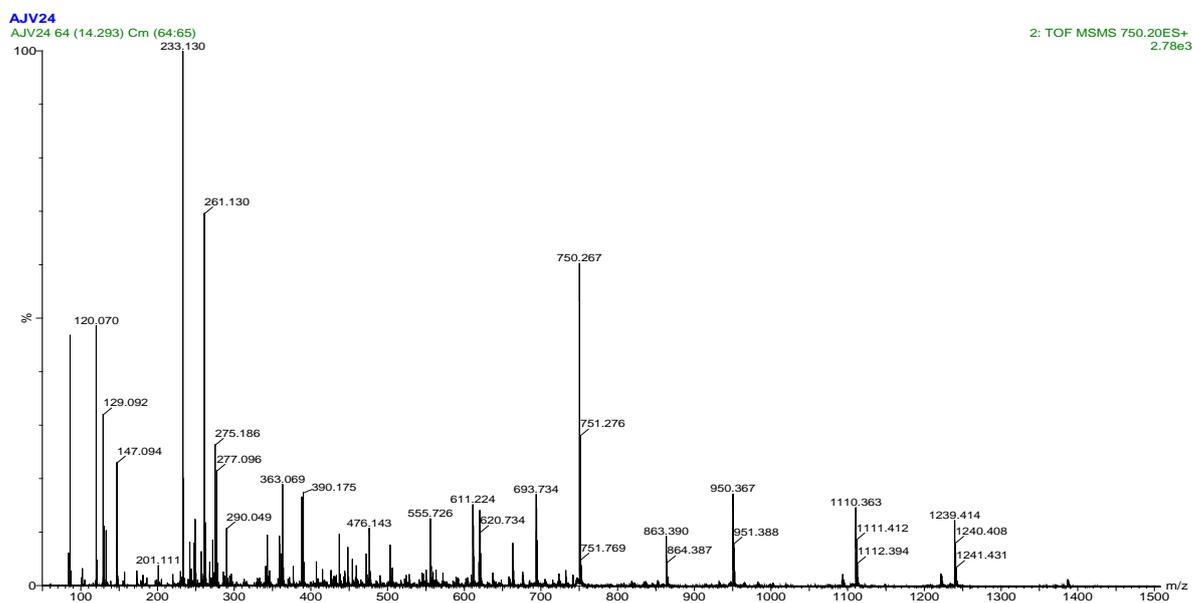


**Figura 17 - Espectro de massa (Maldi-TOF) fração AJ24.** A análise da fração AJ24 (Figura 12) mostrou a presença de duas moléculas de massa 4.252Da e 4.319Da. No espectrograma podemos ver os íons duplamente carregados de m/z igual a 2.126,6 e 2.160,12 e mono carregados de m/z igual a 4.252,305 e 4.319,941.

Apesar de não se apresentar totalmente pura, AJ24 foi reduzida e alquilada e depois fragmentada com a utilização de tripsina e então submetida ao sequenciamento “De Novo”. Dessa forma, conseguimos sequenciar parcialmente dois fragmentos da fração AJ24, obtendo assim uma provável seqüência com estrutura primaria **XFECXSXCXENKFNXC**VVK (Figuras 18 e 19). Esta seqüência, depois de submetida ao banco de dados BLAST, apresentou 35% de identidade com HNTX-II-15, peptídeo encontrado no veneno da aranha caranguejeira chinesa *Selenocosmia (Ornithoctonus) huwena* (Figura 20), cujos dados do trabalho ainda não foram publicados, mas podem ser vistos nesse endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=protein&dopt=G>

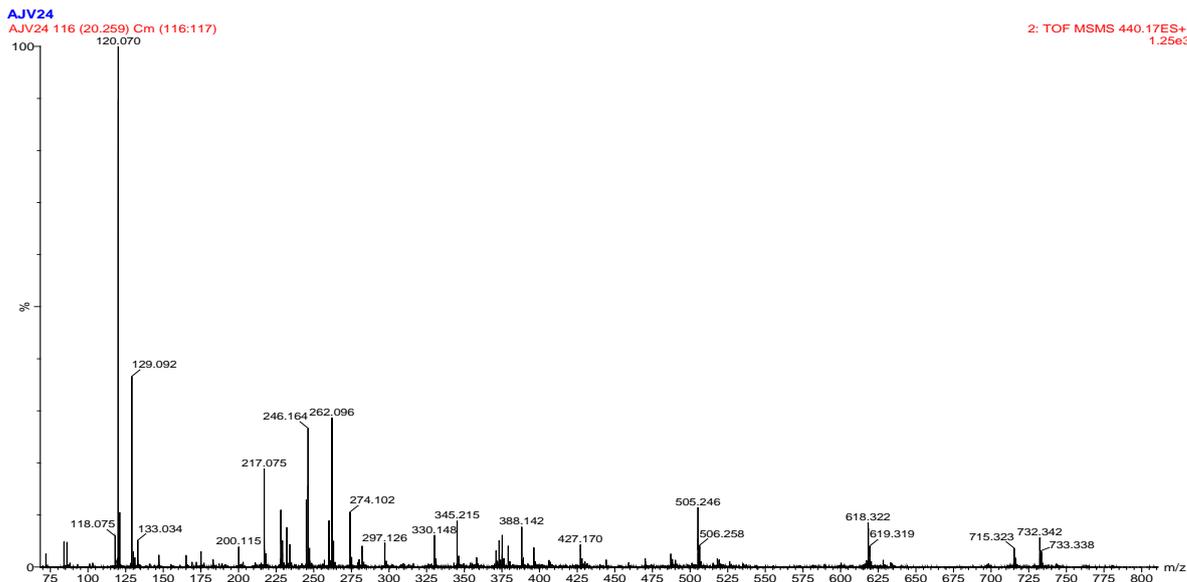
[enPept&RID=SD25389J011&log\\$=protalign&blast\\_rank=2&list\\_uids=283980](#)

141.



AJV24, 750, 20<sup>2+</sup>, XFECXSXCXENK

**Figura 18 – Sequenciamento “De Novo” de um fragmento da fração AJ24 (XFECXSXCXENK).**



AJV24, 440,  $17^{2+}$ , **FNXCVVK**

**Figura 19 – Sequenciamento “De Novo” de outro fragmento da fração AJ24 (FNXCVVK).**

```
>|gb|ADB56719.1| HNTX-II-15 precursor [Ornithoctonus hainana]
Length=85

Score = 29.1 bits (61), Expect = 62
Identities = 12/34 (35%), Positives = 13/34 (38%), Gaps = 18/34 (52%)

Query 2  FECSXSC---XEN-----KFNXCV 17
        FECS SC    E+                KFN CV
Sbjct  50  FECSVSCEIEKEDNKDCCKKKCKGGWKCKFNMCV 83
```

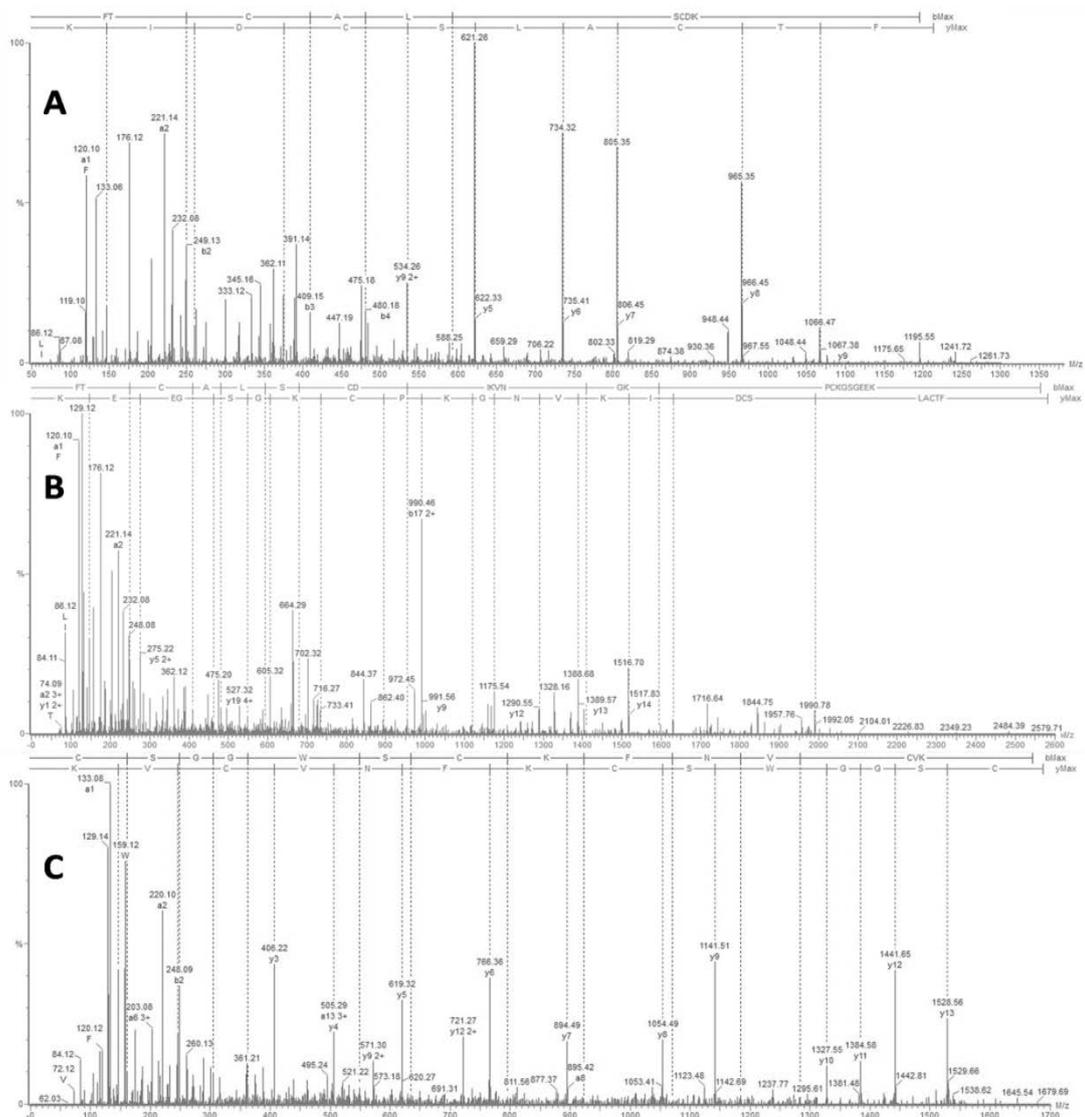
**Figura 20: Comparação da seqüência encontrada na fração AJ24 com o banco de dados BLAST.**

Como a fração AJ24 é composta de duas moléculas e também devido a pouca quantidade de material recuperado após as etapas de purificação não foi possível o seu completo sequenciamento e total identificação da

molécula ativa. Será necessária a obtenção de mais veneno e novas estratégias de purificação para a total caracterização dessas moléculas.

### **3 – Caracterização da Fração AJ22-2**

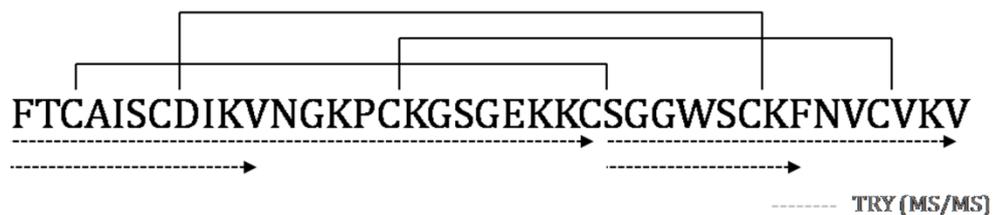
A fração AJ22-2 foi submetida à redução, alquilação e tripsinização. Os fragmentos gerados do peptídeo foram submetidos ao sequenciamento “de novo” (Figura 21) e teve sua provável estrutura primária elucidada como: **FTCAISCDIKVNGKPKGSGEKKCSGGWSCKFNVCVKV** (Figura 22). A sequência foi depositada no banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>), sob o nº de acesso ID: B3EWQ0. O peptídeo encontrado na fração AJ22-2 foi denominado juruína, em homenagem a espécie da aranha estudada, *Avicularia juruensis*.



**Figura 21. Análise por espectrometria de massas do peptídeo AJ22-2 (juruína). A)** Espectro de dissociação por colisão induzida do fragmento de valor de massa/carga ( $m/z$ ) 1.211,3, gerado por digestão por tripsina após a análise por LC/MS, mostrando o fragmento dominante FTCAI com uma  $m/z$  de 621,26, que corresponde ao segmento N-terminal. **B)** Espectro de dissociação por colisão induzida do fragmento de valor de massa/carga ( $m/z$ ) 2.579,8, mostrando as séries de íons b e y que correspondem ao sequenciamento parcial do peptídeo tríptico entre os resíduos Phe1 a Lys30, o qual permitiu a atribuição de quatro cisteínas Cys3, Cys7, Cys24 e Cys30, assim como a região rica em Lisina Lys22-Lys23. **C)** Espectro MS/MS do íon

precursor de  $m/z$  1.679,69, que corresponde à região C-terminal do peptídeo juruína, sem uma valina amidada no final.

A sequência de aminoácidos da juruína foi determinada por fragmentação por MS/MS. Os três principais fragmentos foram obtidos após hidrólise enzimática com tripsina (Figura 21). O fragmento correspondente às posições Phe<sup>1</sup> a Lys<sup>10</sup> foram sequenciados (Figura 21A) e mais tarde alinhados com vários peptídeos obtidos por hidrólise enzimática, após a fragmentação de suas massas (MS/MS). O segundo fragmento, correspondente às posições Phe<sup>1</sup> a Lys<sup>23</sup>, foi sequenciado (Figura 21B), posicionado e alinhado corretamente com o fragmento do peptídeo anterior. O último segmento, um peptídeo correspondente às posições Cys<sup>24</sup> a Lys<sup>37</sup>, foi sequenciado (Figura 21C) e posicionado corretamente na sequência como derivado dos resultados da sobreposição das sequências obtidas por fragmentação de massas, como indicado. Essa sequência também foi confirmada pela análise de outro peptídeo, correspondente aos resíduos entre Cys<sup>24</sup> a Lys<sup>31</sup> (dados não mostrados). O fato do peptídeo na posição Phe<sup>1</sup> a Lys<sup>37</sup> ter sua massa molecular de 3.910,83 indica que há um resíduo faltando na porção C-terminal. Considerando uma diferença na massa molecular de 97,03Da entre a massa calculada e a massa observada por MALDI-TOF/MS, sugere duas possibilidades: um resíduo de prolina na porção C-terminal ou um resíduo de valina C-amidada. A confirmação da sequência foi feita comparando-se a sequência da juruína com 91 peptídeos que apresentam o motivo ICK depositadas no banco de dados ArachnoServer 2.0 (Herzig *et al.*, 2011). Dentro da família Toxin-20 (Pfam ID: PF08089), as identidades chegam a mais de 70% em relação a qualquer das toxinas consideradas. Esta alta identidade de sequências sugere que a juruína tem uma estrutura altamente conservada dentre as toxinas de aranha. Embora nenhuma delas apresente uma prolina na porção C-terminal, em várias toxinas a estrutura se apresenta com uma valina na porção C-terminal (Liang, 2004). Portanto, esses resultados sugerem que a juruína também pode ter uma valina amidada na porção C-terminal.



**Figura 22 – Estrutura covalente da juruína.** A sequência completa da juruína foi obtida por fragmentação de espectrometria de massas de vários peptídeos obtidos através da hidrólise enzimática da juruína, assim como indicados pelos segmentos sublinhados por linhas pontilhadas. As linhas íntegras ligam os resíduos de cisteína, indicando as pontes de dissulfeto nas posições Cys<sup>3</sup> a Cys<sup>24</sup>, Cys<sup>7</sup> a Cys<sup>30</sup> e Cys<sup>15</sup> a Cys<sup>35</sup>. A fenilalanina N-terminal e a valina amidada na porção C-terminal foram determinadas por fragmentação de espectrometria de massas (MS/MS).

Após comparar essa seqüência com o banco de dados BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), esta mostrou 82% de identidade com uma “cystine knot toxin” (nó de cistina) encontrada em uma fração do veneno de uma aranha caranguejeira chinesa *Chilobrachys jingzhao* (Figura 23). Comparando as massas moleculares encontradas em AJ22-2 com outras encontradas em toxinas de aranhas identificadas anteriormente, estas sugerem que este peptídeo contém o motivo ICK (nó de cistina). As “cystine knot toxins” (nós de cistina) são moléculas com estruturas que contém um “nó” de cistina, o qual um anel é formado por duas pontes de dissulfeto, e esse anel é atravessado por uma terceira ponte de dissulfeto, garantindo assim uma grande estabilidade na conformação da molécula que o contém e, portanto, oferece um alto potencial em aplicações na engenharia de proteínas.

```

>|sp|B1P1A6.1|JZT8A_CHIJ| RecName: Full=U3-theraphotoxin-Cj1a; Short=U3-TRTX-Cj1a; AltName:
Full=Jingzhaotoxin-8; Short=JZTX-8; AltName: Full=Jingzhaotoxin-VIII;
Short=JZTX-VIII; AltName: Full=Peptide F7-12.17;
Flags: Precursor
|gb|ABY71656.1| cystine knot toxin [Chilobrachys quangxiensis]
Length=83

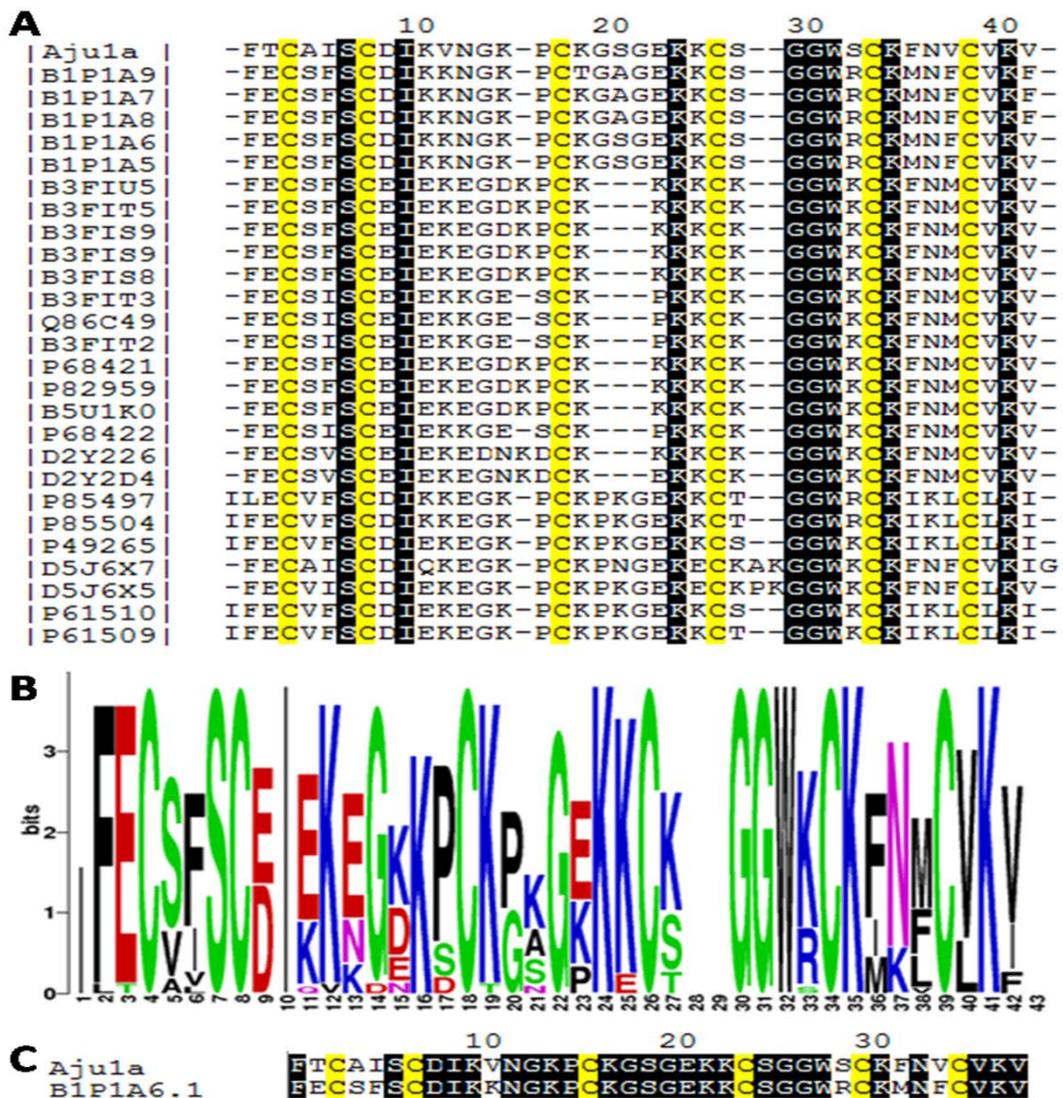
Score = 66.2 bits (160), Expect = 2e-13, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 31/38 (82%), Positives = 32/38 (84%), Gaps = 0/38 (0%)

Query 1 FTCAISCDIKVNGKPCKGSGEKKCSGGWSCKFNVCVKV 38
      F C+ SCDIK NGKPCKGSGEKKCSGGW CK N CVKV
Sbjct 46 FECSFSCDIKKNKPKCKGSGEKKCSGGWRCKMNFVCVKV 83

```

**Figura 23: Comparação da sequência encontrada na fração AJ22-2 com o banco de dados BLAST.**

O alinhamento da sequência com vinte e seis toxinas demonstra um padrão equivalente das pontes de dissulfeto, com o pareamento ocorrendo entre as cisteínas que ocupam a mesma posição relativa (Figura 24). As posições das pontes de dissulfeto são: uma entre as cisteínas 3 e 24 (Cys<sup>3</sup> e Cys<sup>24</sup>), outra entre as cisteínas 7 e 35 (Cys<sup>7</sup> e Cys<sup>30</sup>) e a terceira entre as cisteínas 16 e 35 (Cys<sup>16</sup> e Cys<sup>35</sup>). O esperado teoricamente e as massas moleculares experimentalmente encontrados são semelhantes (PM calculado: 4.008,2, PM observado: 4.007,8).

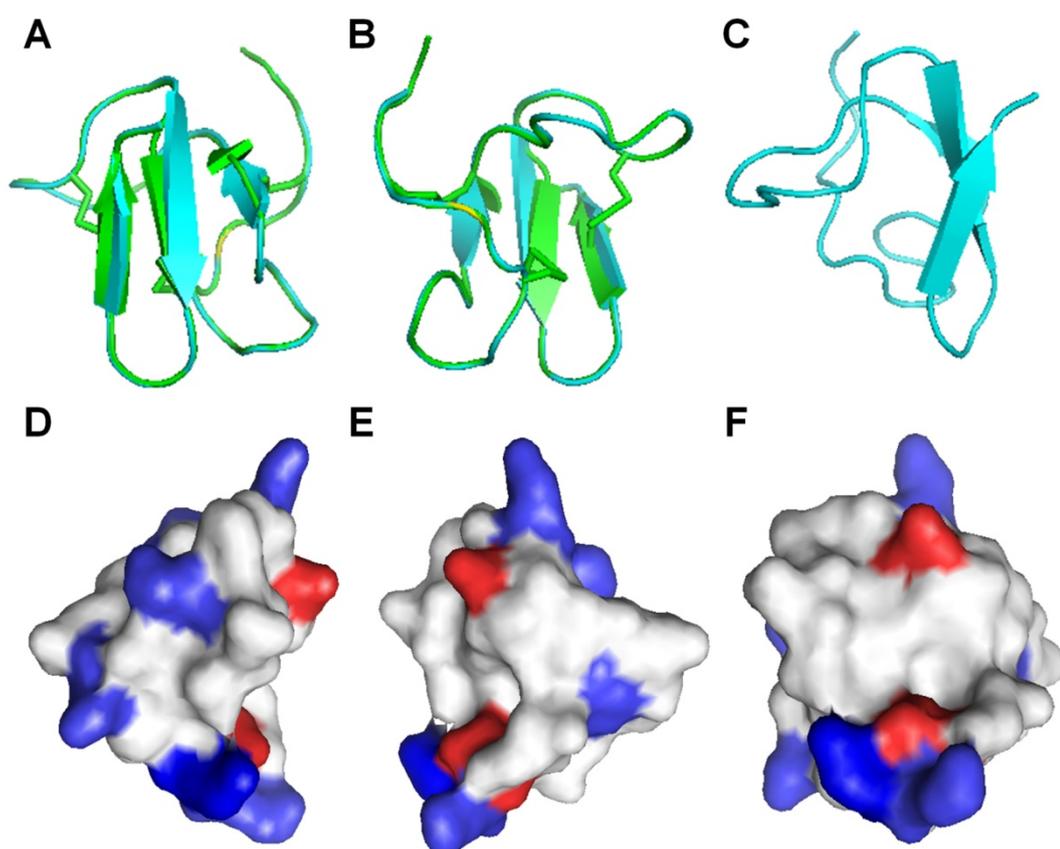


**Figura 24: Comparação da sequência de aminoácidos da juruína (Aju1a) com outras moléculas que contém o nó de cistina (ICK).** **A)** Alinhamento de múltiplas sequências de toxinas com a juruína. As sequências das toxinas foram retiradas de bancos de dados públicos e alinhadas com Muscle (Edgar, 2004). As cisteínas estão em amarelo. Todas as sequências estão identificadas pelo seu número de acesso na UNI-PROT (<http://www.uniprot.org/>). U3-theraphotoxin-Cj1a (B1P1A5), U3-theraphotoxin-Cj1a (B1P1A6), U3-theraphotoxin-Cj1b (B1P1A8), U3-theraphotoxin-Cj1b (B1P1A7), U3-theraphotoxin-Cj1c (B1P1A9) de *Chilobrachys jingzhao*. U1-theraphotoxin-Ba1b (P85504), U1-theraphotoxin-Ba1a (P85497) de *Brachypelma ruhnaui*. U1-theraphotoxin-Bs1a (P49265) de *Brachypelma*

*smithi*. U1-theraphotoxin-Asp1b (P61510), U1-theraphotoxin-Asp1a (P61509) de *Aphonopelma californicum*. Putative mature sequence toxin-like RFEC (D5J6X7), putative mature peptide toxin-like LFEC (D5J6X5) de *Pelinobius muticus*. U1-theraphotoxin-Lp1b (P61506) de *Lasiadora parahybana*. Hainantoxin-II-17 (D2Y2D4), Hainantoxin-II-15 (D2Y226) de *Haplopelma hainanum*. Huwentoxin-7 (P68421), U1-theraphotoxin-Hh1a (P82959), HWTX-VIII (B5U1K0), HWTX-II (B3FIU5), HWTX-VIIIa (B3FIT5), HWTX-IIb (B3FIS9), HWTX-IIa (B3FIS8), U1-theraphotoxin-Hh1f (P68422), Huwentoxin-2a (Q86C49), HWTX-VIIb (B3FIT3), HWTX-VIIa (B3FIT2) de *Haplopelma schimidti*. **B)** Ocorrência de aminoácidos entre as toxinas selecionadas. **C)** Identidade estrutural da juruína com a U3-theraphotoxin-Cj1a, da aranha chinesa *Chilobrachys jingzhao*, com a qual a juruína apresenta 80% de identidade na sequência. Os resíduos conservados são mostrados na cor preta.

As pontes de dissulfeto são necessárias para a estabilização da molécula e para exercer a atividade biológica, assim como as propriedades antimicrobianas, nas  $\beta$ -defensinas (Yenugu *et al.*, 2003). Devido à falta de material, não conseguimos determinar a importância das pontes de dissulfeto na atividade antifúngica da juruína. Por isso, um modelo tridimensional foi feito utilizando-se uma estrutura já conhecida, a da U1-theraphotoxin-Ba1a (PDB ID: 2KGH), da aranha *Brachypelma ruhnaui* (Corzo *et al.*, 2009), pois essa molécula apresenta 70% de identidade com a juruína, além dos resíduos de cisteína conservados. O modelo de homologia da juruína pode ser visto na figura 25. A estrutura final apresentou ângulos  $\phi$  e  $\psi$  dentro da região permitida do mapa de Ramachandran e todas as ligações peptídicas foram *trans*. Um total de 15 resíduos (39,47%) estão na região permitida, 11 resíduos (28,95%) estão na região adicionalmente permitida, 9 resíduos (23,7%) estão na região generosamente permitida e apenas 3 resíduos (7,9%) estão na região externa. O modelo da juruína apresenta identidade com a estrutura da U1-theraphotoxin-Ba1a, que é uma molécula que apresenta o motivo inibitório de nó de cistina (ICK) com três pontes de dissulfeto. A estrutura apresenta 3 folhas  $\beta$ -pregueadas antiparalelas nos

resíduos 14 a 16, 27 a 31 e 34 a 37. A parte restante da molécula é estruturada em *loop* (Figuras 25A, B e C). A análise do potencial eletrostático da molécula revela que a distribuição de cargas é distinta, onde o segmento médio da molécula abriga a carga máxima de cargas positivas (Figura 25F), o que pode ser essencial para apresentar atividade antimicrobiana (Yin *et al.*, 2012). Essa região, entre as cisteínas Cys<sup>16</sup> a Cys<sup>24</sup> da juruína, apresenta 3 resíduos positivos dentre 9 resíduos (CKGSGEKKC).



**Figura 25. Modelagem por homologia da juruína.** Sobreposição da estrutura da juruína com a U1-theraphotoxin-Ba1a (PDB ID: 2KGH), da aranha *Brachypelma ruhnaui*. **A, B)** Juruína (em azul) e U1-theraphotoxin-Ba1a (em verde), evidenciando suas estruturas secundárias. Notar o motivo ICK composto por 3 folhas  $\beta$ -pregueadas anti-paralelas. **C)** Estrutura da juruína em uma rotação de 90°. **D, E)** Superfície da juruína evidenciando-se

os potenciais eletrostáticos positivos (azul), negativos (vermelho) e neutros (branco). **F)** A cor azul intensa mostra a localização do segmento Lys<sup>22</sup>-Lys<sup>23</sup>, o qual representa a maior concentração de cargas positivas.

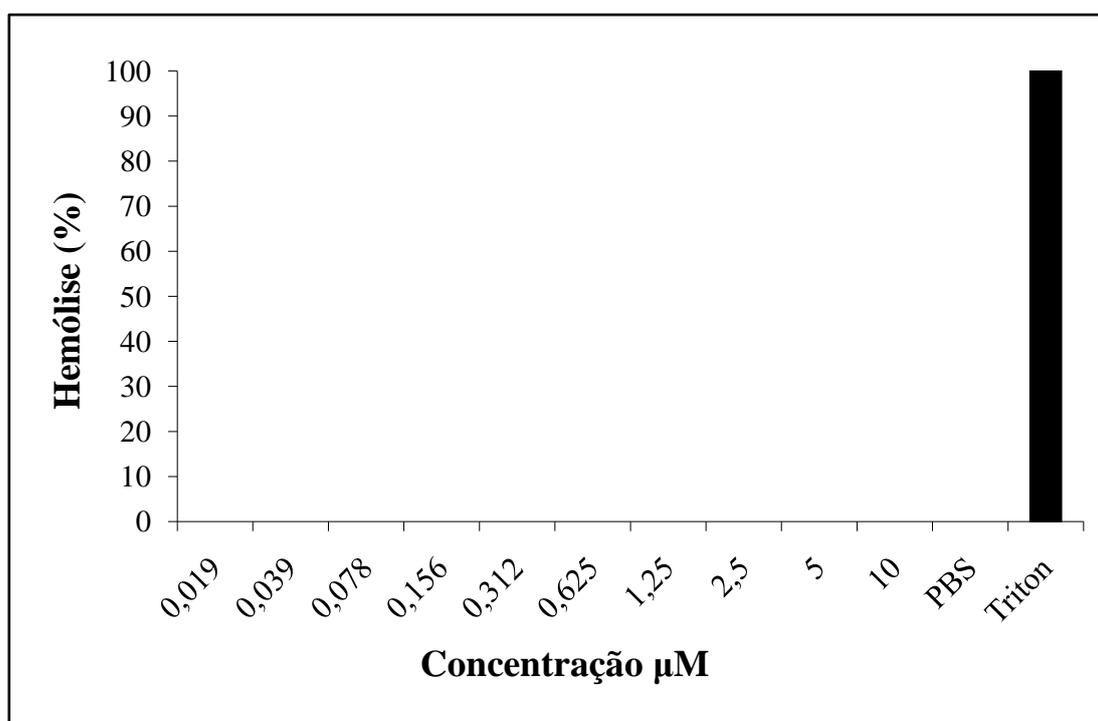
Como a maioria das toxinas que contém o motivo ICK são descritas como tendo atividade antimicrobiana, testamos a atividade antimicrobiana da juruína nativa através do Ensaio de Inibição de Crescimento em Meio Líquido contra patógenos, e comparamos os resultados com o antifúngico comercial Anfotericina B e a Gomesina (peptídeo antimicrobiano proveniente da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, identificado pelo nosso grupo) (Silva Jr. *et al.*, 2000).

A juruína apresentou alta atividade contra todas as leveduras e fungos filamentosos testados, exceto o fungo filamentoso *Beauveria bassiana*. A concentração inibitória mínima (CIM) da juruína contra *C. albicans* foi de 2.5–5µM. As cepas mais sensíveis foram as de *Candida* spp. O fungo filamentoso *Aspergillus niger* foi o que apresentou maior sensibilidade à juruína (CIM 10µM). No entanto, a juruína não apresentou atividade antimicrobiana contra as três bactérias Gram-positivas testadas (*M. luteus*, *S. epidermidis* e *S. aureus*), nem contra as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*, partindo da concentração de 10 µM. Talvez seja necessário o aumento da concentração do peptídeo para que a atividade apareça. A juruína apresentou atividades antifúngicas similares a outro peptídeo rico em cisteína, a Gomesina. Mas, quando comparada com a atividade da Anfotericina B, a concentração inibitória mínima (CIM) é até seis vezes menor do que a juruína (Tabela 2). Podemos notar que a juruína apresentou atividade contra 2 leveduras (*C. glabrata* e *C. albicans* IOC 45588) que não foram sensíveis a Anfotericina B, um antifúngico comercial amplamente utilizado no combate contra a candidíase. Talvez isso se deva ao fato de serem cepas altamente resistentes, podendo assim terem adquirido resistência contra a Anfotericina B.

**Tabela 2 - Espectro de Atividade Antimicrobiana do peptídeo rico em cisteína (juruína) comparado a Gomesina e ao antifúngico Anfotericina B.** A concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo nativo foi determinada pelo teste de inibição em meio líquido. A menor concentração que causa 100% da inibição do crescimento foi anotada. ND, atividade não detectada na faixa de concentração testada, NA, atividade não avaliada.

Micro-organismos	CIM [ $\mu$ ]		
	Juruína	Gomesina	Anfo B
<b>Bactérias Gram-positivas</b>			
<i>Micrococcus luteus</i> A270	ND	0.4	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	ND	1.2	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	ND	NA	ND
<b>Bactérias Gram-negativas</b>			
<i>Escherichia coli</i> SBS363	ND	0.4	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ND	0.9	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ND	5	ND
<b>Fungos Filamentosos</b>			
<i>Beauveria bassiana</i>	ND	NA	0.07-0.15
<i>Aspergillus Níger</i>	5-10	1.2	0.01-0.03
<b>Leveduras</b>			
<i>Candida albicans</i> MDM8	2.5-5	1.25-2.5	0.01-0.03
<i>Candida krusei</i> IOC 4559	2.5-5	2.5-5	0.07-0.15
<i>Candida glabrata</i> IOC 45658	2.5-5	>10	ND
<i>Candida albicans</i> IOC 45588	2.5-5	5-10	ND
<i>Candida parapsilosis</i> IOC 456416	2.5-5	2.5-5	0.07-0.15
<i>Candida tropicalis</i> IOC 45608	2.5-5	0.3-0.6	0.07-0.15
<i>Candida guilliermondii</i> IOC 455716	2.5-5	2.5-5	0.07-0.15

Para investigar se a juruína apresenta algum efeito sobre a membrana de células de mamíferos nas faixas de concentração de atividade antimicrobiana, sua atividade hemolítica foi testada. Após a incubação do peptídeo com eritrócitos humanos (doados pelo próprio orientado) com concentrações de até 10  $\mu\text{M}$ , não foi detectada hemólise, indicando que a juruína não causa a lise da membrana de eritrócitos humanos nas concentrações testadas (Figura 26).



**Figura 26 – Atividade da juruína sobre eritrócitos humanos.** A juruína foi incubada com eritrócitos humanos (1-10: em concentrações de 0,019; 0,039; 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10  $\mu\text{M}$ ) por 3 horas a 37°C. O percentual de hemólise foi expresso em relação a um controle de 0% de hemólise com PBS e 100% de lise com Triton X-100 a 0,05%.

## V- Discussão

### 1 - Caracterização do veneno bruto

Para esta espécie de aranha não há qualquer dado de acidentes, talvez por ser considerada uma aranha dócil, não agressiva e por serem arborícolas, pois assim seu contato com humanos é menor. Há casos de acidentes com outras espécies de aranhas caranguejeiras, mas de acordo com os dados, o veneno das aranhas caranguejeiras parece ser não efetivo para os humanos, sendo que a maioria das picadas resulta em dor local leve a intensa, coceira (que pode persistir por várias horas após a picada), edema, eritema, rigidez articular e membros inchados, ardência e cãibras. Em casos mais graves, fortes cãibras e espasmos musculares, que podem durar até várias horas. A dor após a picada pode ser devido a uma combinação da lesão mecânica (provocada pelas quelíceras), pelo baixo pH do veneno e pela ação de aminas bioativas (como serotonina e histamina) (Escoubas & Rash, 2004). Ao que sabemos, não há nenhum caso documentado de morte humana por picada de aranhas caranguejeiras. Em contraste, sete casos de acidentes fatais em cães por caranguejeiras australianas foram relatados (Isbister *et al.*, 2003), todos por espécies de aranha, que, no mesmo relatório de dados causaram apenas ligeiros efeitos em seres humanos. Portanto, esses venenos parecem afetar invertebrados e vertebrados de diferentes modos e intensidades, provavelmente por causa de seus hábitos alimentares naturais (Escoubas & Rash, 2004).

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida com redução (SDS-PAGE) do veneno de *A. juruensis* (Figuras 6 e 7) demonstra a presença de pelo menos sete bandas de proteínas visualizadas nos géis. Podemos observar no gel de 10% e no gel de 15% o perfil da peçonha com bandas de massas moleculares diversas: nas faixas de 72 kDa (só no de 10%), 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa e 17 kDa e 10 kDa (só no de 15%), demonstrando a variedade de componentes presentes no veneno analisado. Chama atenção a existência de várias bandas na faixa entre 72 kDa e 17 kDa, e a ausência de bandas maiores que 100 kDa, presentes no veneno de

outras aranhas caranguejeiras fossoriais (que vivem no solo). Já no perfil eletroforético sem redução, podemos observar a presença de bandas entre as faixas de 100 kDa e 170 kDa, diferentemente do perfil eletroforético com redução. Essa diferença pode ser atribuída à presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, que faz com que a proteína sofra uma desnaturação efetiva pelo rompimento das pontes dissulfeto, resultando em um aumento do tamanho aparente e diminuição da migração em relação a proteína sem  $\beta$ -mercaptoetanol (agente redutor).

De modo geral, nas peçonhas de aranhas, predominam os peptídeos, em detrimento de proteínas com massas moleculares mais altas. Montandon (2007), trabalhando com a peçonha de *Grammostola iheringi*, aranha caranguejeira da região do Sul do Brasil, mostrou perfil eletroforético com uma quantidade maior de bandas moleculares abaixo de 15 kDa. Herzing *et al*, 2004 e Richardson *et al*, 2006, verificaram a presença de massas moleculares abaixo de 15 kDa e acima de 50kDa para peçonha do gênero *Phoneutria*. Pretel *et al*, 2005 obtiveram resultados semelhantes para a peçonha de *Loxosceles* sp. Estes dados nos mostram que o veneno de *A. juruensis* apresenta um padrão semelhante de massas moleculares encontrados nas peçonhas de aranha, porém também apresenta algumas diferenças, como por exemplo, a ausência de bandas maiores de 100 kDa e menores de 10 kDa.

Podemos atribuir a essas diferenças, além de essa aranha ter o hábito arborícola e, assim, se alimentar de outros tipos de presas, como por exemplo, pequenos pássaros entre outros vertebrados, principalmente sua posição na árvore filogenética. A aranha caranguejeira *Avicularia juruensis* pertence à família Theraphosidae e subfamília Aviculariinae, diferentemente da maioria das outras espécies estudadas, que pertencem à subfamília Theraphosinae ou à família Araneomorphae.

A maioria dos venenos de aranhas caranguejeiras é descrito como sendo neurotóxicos. Diversos trabalhos sobre veneno de aranhas relataram a presença de enzimas proteolíticas, mas essa ação proteolítica é mais reconhecida para aranhas araneomorfas, como espécies do gênero

*Loxosceles*. Não há nada descrito na literatura sobre metaloproteinases em venenos de aranhas caranguejeiras. Apenas foram identificadas metaloproteinases no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, em espécies como *L. rufescens*, *L. gaucho*, *L. laeta*, *L. deserta* e *L. reclusa* (Chaim, et al., 2011). No veneno de *Loxosceles intermedia* foram isoladas e caracterizadas duas metaloproteinases de baixa massa molecular, denominadas Loxolisina A e Loxolisina B (Feitosa et al., 1998). A Loxolisina A apresenta uma massa molecular correspondente a 20-28 kDa, com atividade fibronectinolítica e fibrogenolítica, enquanto que, a Loxolisina B com massa molecular de 32-35 kDa é uma metaloproteinase gelanolítica (Devaraja et al., 2008; Feitosa et al., 1998).

Em um trabalho recente, Trevisan-Silva e colaboradores (2010) analisaram o perfil gelatinolítico para a peçonha de 3 espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*), verificando a presença de apenas 1 única banda na faixa de massa molecular de 29 kDa, indicando a presença de uma metaloproteinase do tipo “astacin-like”. Esses resultados divergem dos encontrados para o veneno de *A. juruensis*, onde podemos observar a presença de 2 bandas majoritárias, uma na faixa de massa molecular de 95 kDa e a outra entre 43 e 55kDa, podendo indicar a presença de outro tipo de metaloproteinase possivelmente presente nesse veneno. Não foi possível caracterizar qual o tipo de metaloproteinase presente no veneno de *A. juruensis*, pois ainda não foi possível avaliar as massas dos “spots”, por espectrometria de massas. Este procedimento consiste na digestão enzimática dos “spots” no gel e subsequente análise das massas por espectrometria de massas.

A ação de metaloproteinases de venenos de serpentes sobre os componentes da matriz extracelular já foi amplamente descrita (Serrano et al., 2007). Estas proteases exercem seu efeito altamente nocivo (acidentes hemorrágicos) pela degradação proteolítica de moléculas solúveis do plasma e da matriz extracelular, como o fibrinogênio e a fibronectina (Williams et al., 1983).

O domínio catalítico das metaloproteínas com atividade hemorrágica atua primordialmente promovendo a degradação da membrana basal dos capilares sanguíneos, e do estroma local, permitindo o extravasamento de sangue dos capilares (Baramova et al., 1989; Shannon et al., 1989; Gutiérrez e Rucavado, 2000). Essas enzimas são capazes de digerir proteínas da cascata da coagulação sanguínea, tais como fibrinogênio e fibrina (Kamiguti et al., 1994; Markland, 1998; Laing e Mourada-Silva, 2005; Serrano et al., 2007) e o domínio catalítico também pode estar envolvido na inibição da agregação plaquetária induzida pelo colágeno (Ivaska et al., 1999). Em vista do veneno de *A. juruensis* ter apresentado atividade sobre o fibrinogênio e sobre o colágeno do tipo I, é possível que este cause algum tipo de hemorragia.

As proteases exercem um papel importante na composição e atividades dos venenos de serpentes, sendo relacionadas a diversos processos fisiológicos que tem como papel principal auxiliar na digestão de uma presa “não-triturada” pela ação mecânica de dentes (Gans e Elliot, 1968; Thomas e Pough, 1979; Mackessy, 1993, Mackessy 2003), podendo ser essa também mais uma função dos venenos de aranha, já que estas são animais que fazem sua digestão extra corpórea.

## **2 – Purificação e caracterização de moléculas bioativas do veneno**

As frações encontradas apresentaram resultados interessantes, com atividades antimicrobianas principalmente contra fungos. Esta atividade específica contra fungos pode estar relacionada ao ambiente em que vivem. Por serem animais amazônicos, onde a umidade relativa pode chegar a 85% a maior parte do ano e com temperatura média variando de 25 a 29° C, o ambiente é propício para o crescimento de fungos, podendo contribuir assim para uma infecção maior por este tipo de microrganismo, principalmente os fungos mumificantes (como a *Beauveria bassiana*). Como esse peptídeo está presente no veneno e o envenenamento é prévio à ingestão, ao ingerir sua presa o animal estaria de certa forma se protegendo contra a ingestão destes fungos patogênicos.

A fração AJ24 foi parcialmente caracterizada, com uma molécula de massa de 4321 Da. Os resultados indicam uma identidade com a toxina HNTX-II-15 proveniente da aranha chinesa *Selenocosmia (Ornithoctonus) huwena*. Provavelmente, esse peptídeo é mais uma toxina com o motivo ICK, porém mais material e estudos serão necessários para conseguirmos caracterizá-la totalmente.

Os resultados encontrados trazem novas informações para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas. Nós descrevemos o isolamento e a determinação da estrutura covalente completa da juruína. Até onde sabemos, esse é o primeiro peptídeo isolado do veneno de *A. juruensis*, uma aranha migalomorfa que pertence à família Theraphosidae (Figura 2). Quando analisamos a estrutura da juruína no contexto do que se sabe sobre outras toxinas provenientes de aranhas (Liang, 2004, Escoubas & Rash, 2004, Kuhn-Nentwing *et al.*, 2004), fica claro que sua estrutura é altamente conservada. Contudo, pudemos identificar seis novos resíduos dentro uma estrutura altamente conservada do veneno de uma aranha caranguejeira arborícola (Figura 24C). Nossa hipótese é que esses resíduos podem ter sido selecionados positivamente durante a evolução, a fim de aumentar sua afinidade ao seu alvo receptor.

Quando comparada a outras toxinas de aranhas já conhecidas, a juruína apresenta identidade com outros peptídeos que contêm o motivo inibitório de nó de cistina (ICK motif), com massas moleculares na faixa de 3.0kDa a 7.5kDa (Escoubas & Rash, 2004). Os peptídeos que contêm o motivo ICK parecem ter evoluído das  $\beta$ -defensinas, ganhando novas funções durante os eventos evolutivos (Fry *et al.*, 2009). Portanto, mesmo toxinas altamente específicas têm sido apresentadas como tendo uma alta atividade antimicrobiana (Kuhn-Nentwig, 2003), e também os compostos antimicrobianos podem agir em sinergismo com neurotoxinas (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2004).

A juruína é um peptídeo composto por 38 resíduos de aminoácidos com três pontes de dissulfeto com conformação do motivo ICK, e uma valina amidada na porção terminal. As pontes de dissulfeto e a amidação da porção C-terminal certamente contribuí para a estabilidade do peptídeo frente às proteases presentes no veneno, ou quando é liberado para defesa ou contra uma presa (Silva Jr., 2000). A juruína é um peptídeo altamente catiônico, com sete resíduos carregados positivamente (sete Lisinas), com um pI (potencial isoelétrico) calculado em 9,08. O modelo estrutural e o alinhamento da sequência sugerem que os seis resíduos de cisteína presentes na juruína formam três pontes de dissulfeto, sendo elas nos resíduos de cisteína 3 e 24 (CI-CIV), 7 e 30 (CII-CV) e 16 e 35 (CIII-CVI) (Figura 20). Essa ordem das pontes de dissulfeto é idêntica para todas as toxinas de aranhas nas quais o motivo ICK está presente (Escoubas & Rash, 2004). Também podemos observar que a juruína apresenta um número igual de resíduos entre as pontes de dissulfeto, assim como em outras toxinas com o motivo ICK (Figura 24A).

Comparando-se a sequência da juruína com a U3-theraphotoxin-Cj1a, proveniente da aranha caranguejeira chinesa *Chilobrachys jingzhao*, com a qual a juruína apresenta 80% de identidade, podemos ver uma diferença de apenas 6 resíduos (Figura 24C). Ela tem mais de 70% de identidade da sua sequência com a família de peptídeos Toxin-20 (Pfam ID: PF08089), provenientes das aranhas *Selenocosmia (Ornithoctonus) huwena* (Liang, 2004; Yuan *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2010), *Chilobrachys jingzhao* (Liao *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008) e *Haplopelma hainanum* aranhas da China (Pan & Yu, 2010, Tang *et al.*, 2010), as quais são neurotoxinas com um amplo espectro de atividades biológicas, como inibição de canais de íons, atividade inseticida e inibição de tripsina (Liang, 2004). Enquanto os três resíduos entre as cisteínas 3 e 7 (Ala<sup>4</sup>, Ile<sup>5</sup>, Ser<sup>6</sup>) já foram identificados na sequência putativa madura da toxina RFEC, da aranha *Pelinobius muticus*, os resíduos Thr<sup>2</sup>, Val<sup>11</sup>, Ser<sup>29</sup>, Phe<sup>32</sup> e Val<sup>34</sup> (altamente hidrofóbicos) são resíduos novos dentre as estruturas dessa toxina. Quando comparada com mais de 91 toxinas, nenhuma delas apresenta esses resíduos nessas posições. É

provável que esses resíduos de aminoácidos sejam importantes para a bioatividade da juruína, sendo positivamente selecionados durante a evolução, ao invés de se originarem de mutações neutras. É interessante notarmos que a juruína é o único peptídeo pertencente à família Toxin-20 que apresenta uma Treonina (Thr<sup>2</sup>) na região N-terminal.

Ao contrário de todas as espécies que apresentam proteínas pertencentes à família Toxin-20, as quais são caranguejeiras de solo, *A. juruensis* é uma aranha caranguejeira arborícola da Amazônia, também conhecida como aranha-comedora-de-pássaros por se alimentar de pequenos vertebrados, como pássaros, pequenos lagartos e anfíbios. Portanto, uma alta toxicidade contra vertebrados, bem como atividades não usuais presentes no veneno de uma espécie arborícola, podem ter surgido a partir de padrões divergentes e seleção darwiniana positiva, a fim de aumentar a afinidade de ligação aos receptores de suas presas, como resultado de uma possível mudança de hábitos alimentares em comparação aos hábitos alimentares de aranhas caranguejeiras de solo. A serpente insular arborícola *Bothrops insularis* (Cogo, *et al.*, 1998) e a serpente marinha australiana *Aipysurus eydouxii* (Li *et al.*, 2005) apresentam variações na composição do veneno assim como padrões divergentes, que podem ser o resultado de uma alteração significativa do hábito alimentar e da seleção positiva darwiniana, causando um aumento ou uma diminuição na toxicidade veneno, respectivamente.

A juruína apresenta atividade antimicrobiana contra a maioria das leveduras e fungos filamentosos testados, com valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) entre 2.5-5µM para todos eles, exceto para o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, para o qual apresentou um valor de CIM entre 5-10 µM. Apesar dos peptídeos ricos em cisteína exercerem um papel importante do sistema imune das aranhas e frequentemente apresentarem um amplo espectro de atividades contra patógenos (Silva Jr. *et al.*, 2000), a juruína, um peptídeo antimicrobiano altamente enovelado e rico em cisteína, não apresentou atividade contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

testadas, assim como também não apresentou atividade contra o fungo filamentosso *Beauveria bassiana* (o qual causa o processo de “mumificação” em aranhas, paralisando-as e levando-as a morte). Por outro lado, apresentou uma forte atividade contra uma grande variedade de leveduras a uma concentração baixa, sendo a cepa mais resistente a da levedura *C. glabrata* (Tabela 2). Interessantemente, a juruína apresentou valores de CIM bem similares a da Gomesina, um potente peptídeo do sistema imune da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, identificado pelo nosso grupo (Silva Jr. *et al.*, 2000). A gomesina amidada apresenta um ligeiro aumento da atividade antimicrobiana quando comparada a forma não-amidada. A ausência do padrão de pontes de dissulfeto na Gomesina após a redução e alquilação produz uma diminuição da atividade antimicrobiana. Similarmente, o padrão de pontes de dissulfeto e as modificações pós-translacionais podem estar relacionados à atividade antimicrobiana e ao efeito neurotóxico da juruína. Ao compararmos os valores de CIM da juruína com os da Anfotericina B, podemos ver que esse antifúngico é efetivo contra a maioria das cepas testadas em valores até seis vezes menores do que o da juruína. Por outro lado, a juruína se mostrou efetiva contra cepas resistentes a Anfotericina B, como *C. albicans* IOC 45588 e a de importância médica *C. glabrata* (Krogh-Madsen *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2008). A resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento da candidíase. Este aumento pode ser decorrente do uso de terapias seletivas com doses inadequadas ou devido ao uso crescente desses fármacos na profilaxia de infecções fúngicas o que pode condicionar a seleção da resistência clínica (Galle & Gianinni, 2004).

Quanto à atividade hemolítica, a juruína foi testada quanto à toxicidade contra eritrócitos humanos apenas nas faixas de concentração com atividade antimicrobiana. A juruína não apresentou atividade hemolítica, mesmo quando testada na concentração mais alta, de 10 µM. Esses dados sugerem que o modo de ação da juruína não é pelo rompimento da membrana celular. Além disso, a presença de um grande número de

aminoácidos positivamente carregados desse peptídeo contribui para a alta especificidade do peptídeo para alvos negativamente carregados, como as células procarióticas (Nguyen *et al.*, 2011). Portanto, os resíduos positivamente carregados (Figura 24F) podem estar envolvidos no reconhecimento do receptor-alvo e na seletividade contra patógenos e presas.

A atividade antimicrobiana específica da juruína contra leveduras e fungos filamentosos nos dá novas evidências de que a origem das toxinas de aracnídeos vem das  $\beta$ -defensinas antifúngicas (Zhu *et al.*, 2005). Após um ou mais eventos de recrutamento, a duplicação da sequência das defensinas impulsionada pela seleção darwiniana positiva, pode ter ampliado essa classe de moléculas em novos grupos funcionais, provavelmente incluindo as toxinas que contém o motivo ICK (Fry *et al.*, 2009). Como é uma estrutura enovelada altamente versátil, o motivo ICK desenvolveu diversas funções biológicas ao longo da evolução, participando tanto da defesa como do comportamento predatório. A evidência da seleção darwiniana positiva na estrutura do motivo ICK entre as toxinas de aranhas sugere que os aminoácidos adaptativos que mudaram para uma estrutura mais conservada levaram a uma nova função emergencial. Portanto, esses padrões divergentes deveriam ser usados para o desenho de novas drogas oriundas de peptídeos (Zhu *et al.*, 2005, Zhu *et al.*, 2011). Assim, a identificação de novos resíduos dentre estruturas altamente conservadas oferecem um alto potencial para se estudar a evolução divergente das toxinas de *A. juruensis*, sendo a juruína um modelo natural para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas.

Isolamos, purificamos e caracterizamos um novo peptídeo antimicrobiano com o motivo ICK, o qual denominamos juruína (Aju1a). A notável semelhança a toxinas com outras atividades importantes, como a modulação de canais iônicos (Liang, 2004) e atividade antiparasítica (Pimentel, 2006), a estrutura primária altamente conservada da toxina, sua seletividade e sua potente inibição de crescimento de fungos patogênicos, a

ausência de atividade hemolítica contra eritrócitos humanos, junto com a resistência putativa contra proteases, faz da juruína um peptídeo farmacologicamente interessante e valioso para o “design” de novas drogas eficazes contra doenças causadas por fungos. Assim, a sequência única da juruína deve ser investigada como um novo protótipo para o desenvolvimento de novas drogas.

## VI - Conclusão

1. Quanto à caracterização do veneno, podemos dizer que este tem atividades proteolíticas, com uma possível presença de metaloproteinases entre outras proteases.
2. Nossos resultados indicam que o veneno da aranha *A. juruensis* é diferente dos venenos estudados de outras aranhas caranguejeiras do Brasil.
3. Neste trabalho, foram isoladas 2 moléculas provenientes do veneno da aranha amazônica *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae) com atividade antimicrobiana.
4. Duas moléculas tiveram sua seqüência de aminoácidos totalmente (AJ22-2) ou parcialmente (AJ24) elucidadas.
5. Comparando as sequencias obtidas para AJ22-2 e AJ24 em banco de dados (BLAST), observamos grande identidade com frações do veneno das aranhas caranguejeiras chinesas *Chilobrachys jingzhao* *Selenocosmia (Ornithoctonus) huwena* respectivamente.
6. AJ22-2, peptídeo que foi totalmente sequenciado, foi denominado juruína, em homenagem a espécie da aranha estudada.
7. A juruína é um peptídeo não hemolítico e especificamente ativo contra fungos composto por 38 resíduos de aminoácidos, que apresenta massa molecular de 4,005.86 Da e teve sua seqüência primária determinada em **FTCAISCDIKVNGKPKGSGEKKCSGGWSCKFNVCKV**.
8. As outras frações ainda precisam passar por novas etapas de purificação por não se encontrarem totalmente homogêneas.

## VII – Referências Bibliográficas

ADAMS, ME (2004) Agatoxins: ion channel specific toxins from the American funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Toxicon*, 43:509-525.

ANDREU, D. & RIVAS, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47 (6): 415-443.

ARNOLD K., BORDOLI L., KOPP J., SCHWEDE T. (2006) The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 22: 195-201.

AUVYNET, C. & ROSENSTEIN, Y. (2009) Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS Journal* 276; 6497–6508.

BACHÈRE, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 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*, v.198, p.149-170.

BARAMOVA, E. N.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. (1989) Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 275, p. 63-71.

BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (2010). “Protein blast”. Página consultada em 11 de agosto de 2010 e 20 de julho de 2012. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

BODE F, SACHS F, FRANZ MR. (2001) Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature*, 409:35-36.

BRADFORD, M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-54.

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

BUDNIK, B.A., OLSEN, J.V., EGOROV, T.A., ANISIMOVA, V.E., GALKINA, T.G., MUSOLYAMOV, A.K., GRISHIN, E.V., ZUBAREV, R.A. (2003) De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(2): 193-201.

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. *J. Biol. Chem.* 268(20): 14893--14897. (Export to RIS).

BULET, P., HETRU, C., DIMARCQ, J.L, HOFFMAN, D. (1999) Antimicrobial peptide in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 23 (4-5):329-44.

BULET, P., STOCKLIN, R. AND MENIN, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 2004. Vol. 198: 169-184.

CANTÚ, M. D., CARRILHO, E., WULFF, N. A., PALMA, M. S. (2008). Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*, v.31, p. 669-675.

CHAIMO. M, TREVISAN-SILVA D., CHAVES-MOREIRA D., WILLE A. C. M., FERRER V. P., MATSUBARA F. H. , . MANGILI O. C., SILVEIRA R. B., GREMSKI L. H., GREMSKI W., SENFF-RIBEIRO A., VEIGA S. S. (2011) Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. *Toxins* , 3(3), 309-344,

CHEN, J., DENG, M., HE, Q., MENG, E., JIANG, L., LIAO, Z., RONG, M., LIANG, S. (2008) Molecular diversity and evolution of cystine knot toxins of the tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Cell. Mol. Life Sci.* 15: 2431-2444.

CHEN, W., YANG, X., YANG, X., ZHAI, L., LU, Z., LIU, J., YU, H. (2008) Antimicrobial peptides from the venoms of *Vespa bicolor* Fabricius. *Peptides* (2008); 29: 1887 –1892.

COGO, J.C., PRADO-FRANCESCHI, J., GIGLIO, J.R., CORRADO, A.P., CRUZ-HÖFLING, M.A., DONATO, J.L., LEITE, G.B., RODRIGUES-SIMIONI, L. (1998) An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A2 fraction. *Toxicon*. 10: 1323-32.

COHEN, L., MORAN, Y., SHARON, A., SEGAL, D., GORDON, D., GUREVITZ, M. (2009) Drosomycin, an innate immunity peptide of *Drosophila melanogaster*, interacts with the fly voltage-gated sodium channel. *J. Biol. Chem.* 35: 23558-63.

CORZO, G. VILLEGAS, E., GOMEZ-LAGUNAS, F., POSSANI, L.D., BELOKONEVA, O.S., NAKAJIMA, T. (2002) Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2777: 23627-23637.

CORZO, G., BERNARD, C., CLEMENT, H., VILLEGAS, E., BOSMANS, F., TYTGAT, J., POSSANI, L.D., DARBON, H., ALAGON, A. (2009). Insecticidal peptides from the therapsid spider *Brachypelma albiceps*: an NMR-based model of Ba2. *Biochim. Biophys. Acta.* 8:1190-1196.

CORZO, G., ESCOUBAS, P. (2003). Pharmacologically active spider peptides toxins. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2409–2426.

CORZO, G., ESCOUBAS, P., VILLEGAS, E., BARNHAM, K.J., HE, W., NORTON, R. S., NAKAJIMA, T. (2001) Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. J.* (2001) 359, 35±45 (Printed in Great Britain).

CRAIK, DJ., DALY, NL., WAINE,C. (2001). The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* 39; 43-60.

DAFFRE, S., MIRANDA, A., MIRANDA, M.T.M., BULLETT, P., SILVA Jr., P.I., MACHADO, A., FOGAÇA, A.C., LORENZINI, D.M., PEREIRA, L.S., FAZIO, M.A., ESTEVES, E.V.S. & BURGIERMAN, M.R. (2001). Peptídeos antibióticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, IV (23), 48-55.

DAY., SHENG Z. , XU, X., LI, J., YANG, H., LIU, Z., REES H. H. AND LAI R. (2006). A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Peptides*,v. 27, Issue 1, January 2006, Pages 31-3.

DERARAJA, S., NAGARAJU, S.; MAHADESWARASWAMY, Y. H.; GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K.. (2008). A low molecular weight serino protease: Purification and characterization from *Hippasa agelenoides* (funnel web) spider venom gland extract. *Toxicon*, 52: 130-138.

DESTOUMIEUX, D., BULET, P., LOEW, D., VAN DORSSELAER, A., RODRIGUEZ, J., BACHERE, E. (1997) Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 272, No. 45, Issue of November 7, pp. 28398–28406.

DOYLE DA, MORAIS CABRAL J, PFUETZNER RA, KUO A, GULBIS JM, COHEN SL, CHAIT BT, MACKINNON R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. Apr 3;280(5360):69-77

EDGAR, R.C (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic. Acids. Res.* 32: 1792–1797.

EHRET-SABATIER, L., LOEW, D., GOYFFON, M., FEHLBAUM, P., HOFFMANN, J.A., DORSSELAER, A. V., BULET, P. (1996) Characterization of Novel Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 47, p. 29537-29544.

ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CORZO, G., (2000). Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie* 82, 893–907.

ESCOUBAS, P.; RASH, L. (2004). Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*. 43: 555–574.

ESCOUBAS,P. AND KING,G.F.(2009). Venomics as a drug discovery platform. *Expert.Rev.Proteomics* 6, 221–224.

ESTEVEES, E. , FOGAÇA, A.C., MALDONADO, R., SILVA, F.D. , MANSO, P.P.A. , PELAJO-MACHADO, M. , VALLE, D. , DAFFRE, S. (2009) Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 33, p. 913-919, 2009.

ESTRADA, G., VILLEGAS, E., CORZO, G. (2007) Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Natural Products Reports*, 24: 145-161.

FEITOSA, L. (1998). Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36(7): 1.039-1.051.

FITCHES E, EDWARDS MG, MEE C, GRISHIN E, GATEHOUSE AM, EDWARDS JP, GATEHOUSE JA. (2004) Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *J Insect Physiol*, 50:61-71.

FOGAÇA, A. C , LORENZINI, D. M. , KAKU, L. M. , ESTEVES, E. , BULET, P. , DAFFRE, S. (2004) Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization, and tissue expression profile. *Developmental and Comparative Immunology*, EUA, v. 28, p. 190-200.

FOGAÇA, A. C. , ALMEIDA, I. C. , EBERLIN, M. N. , TANAKA, A. S. , BULET, P. , DAFFRE, S. (2006) Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides* (New York), v. 27, n. 4, p. 667-674.

FOGAÇA, A. C. , SILVA JR., P. I. , MIRANDA, M. T. M. , BIANCHI, A. G. , MIRANDA, A. , RIBOLLA, P. E. M. , DAFFRE, S. (1999) Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. The Journal of Biological Chemistry , Estados Unidos, v. 274, n. 36, p. 25330-25334.

FRY, B.G., ROELANTS, K., CHAMPAGNE, D.E., SCHEIB, H., TYNDALL, J.D., KING, G.F., NEVALAINEN. T.J., NORMAN, J.A., LEWIS, R.J., NORTON, R.S., RENJIFO, C., DE LA VEGA, R.C. (2009) The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet 10: 483-511.

GALLE LC, GIANINNI MJSM. (2004) Prevalência e suscetibilidade de leveduras vaginais. Journ. Bras. Patol. Med. Labor.; 40:229-236.

GANS, C.; ELLIOT, W. B. (1968) Snake venoms: production, injection, action. Adv. Oral. Biol. 3: 45-81;

GAO B., TIAN C., ZHU S. (2007) Inducible antibacterial response of scorpion venom gland. Peptides, Dec;28(12):2299-305. Epub 2007 Oct 13.

GORDON, Y.J., ROMANOWSKI, E.G. & MCDERMOTT, A.M. (2005). A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. Curr. Eye Res. 30(7), 505-515.

GUHARAY F, SACHS F. (1984) Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. J Physiol.;352:685-701.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. (2000) Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie, v. 82, p. 841-850.

HAEBERLI, S., KUHN-NENTIWIG, L., SCHALLER, J., NENTIWIG, W. (2000) Characterization of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). Toxicon, 38: 373-380.

HAO, G., SHI, Y., TANG, Y. L., LE, G. W. (2009) The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. Peptides; 30(8): 1421-1427.

HERZIG, V., WOOD, D.L., NEWELL, F., CHAUMEIL, P.A., KAAS, Q., BINFORD, G.J., NICHOLSON, G.M., GORSE, D., KING, G.F. (2011). ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic. Acids. Res.* 39: 653-657.

HERZING, V.; WARD, R. J.; SANTOS, W. F. (2004) Ontogenetic changes in *Phoneutria nigriventer*(Araneae, Ctenidae) spider venom. *Toxicon*, v. 44, p. 635-640.

HOFFMANN, J.A., KAFATOS, F.C., JANEWAY, C.A. & EZEKOWITZ, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284, 1313-1318.

ISBISTER, G.K., SEYMOUR, J.E., GRAY, M.R., RAVEN, R.J. (2003) Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. *Toxicon* 41, 519–524.

ISBISTER, G.K., SEYMOUR, J.E., GRAY, M.R., RAVEN, R.J., (2003). Bites  
IVASKA, J.; KÄPYLÄ, J.; PENTIKÄINEN, O.; HOFFRÉN, A. M.; HERMONEN, J.; HUTTUNEN, P.; JOHNSON, M. S.; HEINO, J. (1999) A peptide inhibiting the collagen binding function of integrin alpha2I domain. *J. Biol. Chem.*, v. 274 (6), p. 3513-3521.

JACKSON, H. AND PARKS, N. T. (1989) SPIDER TOXINS: Recent Applications in Neurobiology. *Annual Review of Neuroscience*. 1989. 12:405-14.

JIANG, L., ZHANG, D., ZHANG, Y., PENG, L., CHEN, J., LIANG, S. (2010) Venomics of the spider *Ornithoctonus huwena* based on transcriptomic versus proteomic analysis. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*. 5: 81-88.

JOHNS, R., SONENSHINE, D. E. & HYNES, W. L. (1998) Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *J Med. Entomol.*, 35(4):458-464.

JUNG, E. H., LEE, K. S., HAN, J. H., JE, Y. H., CHANG, J. H., ROH, J. Y., SOHN, H. D. AND JIN, B. R. (2002) Molecular cloning of two cDNAs

encoding an insecticidal toxin from the spider, *Araneus ventricosus*, and construction of a recombinant baculovirus expressing a spider toxin. *Int. J. Indust. Entomol.* 4, 43–49.

KAMIGUTI, A. S.; SLUPSKY, J. R.; ZUZEL, M.; HAY, C. R. (1994) Properties of fibrinogen cleaved by jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Thromb. Haemost.*, v. 72, p. 224-249.

KHAN SA, ZAFAR Y, BRIDDON RW, MALIK KA, MUKHTAR Z. (2006) Spider venom toxin protects plants from insect attack. *Transgenic Res*, 15:349-357.

KHAN, Z.U., AHMAD, S., AL-OBAID, I., AL-SWEIH, N.A., JOSEPH, L., FARHAT, D. (2008) Emergence of resistance to amphotericin B and triazoles in *Candida glabrata* vaginal isolates in a case of recurrent vaginitis. *J. Chemother.* 4: 488-491.

KIEFER, F., ARNOLD, K., KÜNZLI M., BORDOLI, L., SCHWEDE, T. (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 37: 387-392.

KIRKPATRICK, D.L.; WATSON, S. AND ULHAQ, S. (1999). Structure-based drug design: combinatorial chemistry and molecular modeling. *Comb. Chem. High Throughput Screen* 4, 211–221.

KOZLOV, S.A., VASSILEVSKI, A.A., FEOFANOV, A.V., SUROVOY, A.Y., KARPUNIN, D.V., GRISHIN, E. V. (2006) Latarecins, antimicrobial and cytotoxic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarbaeivi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 20983-20992.

KROGH-MADSEN, M., ARENDRUP, M.C., HESLET, L., KNUDSEN, J.D. (2006) Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clin. Infect. Dis.* 7: 938-944.

KUHN-NENTWIG *et al.* (2011) *Advances in Insect Physiology.* 40: 1-86.

KUHN-NENTWIG L., BAUMANN T., KÄMPFER U., SCHÜRCH S., SCHALLER J., LARGIADÈR C., NENTWIG W. (2010) Ctenidins:

antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. Cellular and Molecular Life Sciences Volume 67, Number 16 , 2787-2798

KUHN-NENTWIG, L. (2003). Review: Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. Cell. Mol. Life Sci. 60, 2651–2668

KUHN-NENTWIG, L., SCHALLER, .J, NENTWIG, W. (2004). Biochemistry, toxicology and ecology of the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). Toxicon. 43: 543–553.

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

LAI, R., LOMAS, L. O., JONCZY J., TURNER, P. C. and REES, H. H. (2004) Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. Biochem. J. (2004) 379, 681–685

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. (2005) Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. Toxicon, v. 45, p. 987-996.

LEBER, T.M., BALKWILL, F. R., (1997) Zymography: A Single-Step Staining Method for Quantitation of Proteolytic Activity on Substrate Gels. Analytical Biochemistry, v 249, Issue 1, 15, Pages 24–28.

LI M, FRY BG, KINI R.M. (2005) Eggs-only diet: its implications for the toxin profile changes and ecology of the marbled sea snake (*Aipysurus eydouxii*). J. Mol. Evol. 60:81-9.

LIANG, S. (2004) An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)]. Toxicon. 43: 575–585.

LIAO, Z., CAO, J., LI, S., YAN, X., HU, W., HE, Q., CHEN, J., TANG, J., XIE, J., LIANG, S. (2007) Proteomic and peptidomic analysis of the venom from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. Proteomics. 7: 1892–1907.

MACKESSY, S. P. (1993) Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). Comp. Biochem. Physiol. 106 B (1), 181-189.

MACKESSY, S. P., WILLIAMS, K., ASHTON, KG. (2003) Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganos concolor*. A case of Venom Paedomorphosis? Copeia 4, 769-782;

MACKINNON R, COHEN SL, KUO A, LEE A, CHAIT BT. (1998) Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. Science, Apr 3;280(5360):106-9.

MARKLAND, F. S. (1998) Snake venoms and the hemostatic system. Toxicol, v. 36, p. 1749-800.

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

MARTIN, E.J.; BLANEY, J.M.; SIANI, M.A.; SPELLMEYER, D.C.; WONG, A.K. AND MOOS, W.H. (1995). Measuring diversity: experimental design of combinatorial libraries for drug discovery. J. Med. Chem. 38, 1431–1436.

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

MAZZUCA M, HEURTEAUX C, ALLOUI A, DIOCHOT S, BARON A, VOILLEY N, BLONDEAU N, ESCOUBAS P, GELOT A, CUPO A. (2007) A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. Nat Neuroscience, 10:943-945.

MCKEE, P. A.; ROGERS, L. A.; MARLER, E.; HILL, R. L. (1966) The subunit polypeptides of human fibrinogen. Arch. Biochem. Biophys., v. 116, p. 271-279.

MELLO-LEITÃO, C. (1923) Theraphosidae do Brasil. Revista do Museu Paulista, 1923.

MELO, M.N, FERRE, R., CASTANHO, M. A. R. B. (2009) Antimicrobial peptides linking oarition, activity and high membrane-bound concentration. Nature Reviews Microbiology; 7:245:250.

MONTANDON G. G.; SANTOS D. M.; FERRAZ, K. K. F.; BEMQUERER, M. P.; PIMENTA , A. M. C.; MONTENEGRO, F. C.; LUCAS, S. M.; CORDEIRO, M. N.; DE LIMA M.E.; DINIZ M.R.V. (2007) J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. v.13 no.1 Botucatu.

NGUYEN, L.T., HANEY, E.F., VOGEL, H.J. (2011) The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends Biotechnol. 9: 464-472.

NICHOLSON, GM (2006). "Spider Venom Peptides", in Abba J. Kastin (org), "Handbook of biologically active peptides". 369-379.

NUNES KP, COSTA-GONÇALVES A, LANZA LF, CORTES SF, CORDEIRO MN, RICHARDSON M, PIMENTA AM, WEBB RC, LEITE R, DE LIMA ME. (2008) Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function. Toxicon, 51:1197-1206.

ORIVEL, J., REDEKER, V., LE CAER, J.P., KRIERI, F., REVOL-JUNELLES, A.M., LONGEON, A., CHAFFOTTE, A., DEJEAN, A., ROSSIER, J. (2001) Ponericins, New Antibacterial and Insecticidal Peptides from the Venom of the Ant *Pachycondyla goeldii*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 276, no. 21, issue of May 25, pp. 17823–17829, 2001.

PAN, J.Y. AND YU, Z.Q. (2010) Isolation and characterization of Hainantoxin-II, a new neurotoxic peptide from the Chinese bird spider (*Haplopelma hainanum*). Dongwuxue Yanjiu. 6: 570-574.

PELEGRINI, P. B. & FRANCO, O. L. (2005). 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, 37, 2239-2253.

PEREIRA, L. S., SILVA JR., P. I., MIRANDA, M. T. M., ALMEIDA, I. C., NAOKI, H., KONNO, K., DAFFRE, S. (2007) Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352 953–959.

PIMENTA, M. C. A., DE LIMA, M. (2005). Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *J. Peptide Sci.* 11: 670–676.

PIMENTEL, C., CHOI, S.J., CHAGOT, B., GUETTE, C., CAMADRO, J.M., DARBON, H. (2006) Solution structure of PcFK1, a spider peptide active against *Plasmodium falciparum*. *Protein Sci.* 15: 628–634.

PRATES, M.V., BLOCH, C. (2000) Peptídeos antibióticos. *Biociência & Desenvolvimento*, IV (23), 30-6.

PRETEL, F.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; SILVA, M. E. R.; FERREIRA Jr., J. M. C.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. (2005) Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaida*, a Brazilian brown from karstic areas. *Toxicon*, n. 45, p. 449-458.

RASH, L.D. AND HODGSON, W.C. (2002) Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 40 (2002) 225-254

RATCLIFFE, N. A. & WHITTEN, M. M. A. (2004) Vector Immunity In: GILLESPIE, S. H.; *Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases*. Cambridge: Cambridge University Press. 240-71.

REDAELLI, E., CASSULINI, R.R., SILVA, D .F., CLEMENT, H., SCHIAVON, E., ZAMUDIO, F.Z., ODELL, G., ARCANGELI, A., CLARE, J.J., ALAGÓN, A., DE LA VEGA, R.C., POSSANI, L.D., WANKE, E. (2010) Target promiscuity and heterogeneous effects of tarantula venom peptides affecting Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ion channels. *J. Biol. Chem.* 285:4130-4142.

RICHARDSON, M.; PIMENTA, A.M.C.; BEMQUERER, M.P.; SANTORO, M.M.; BEIRÃO, P.S.L.; LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; BLOCH Jr, C.;

- VASCONCELOS, E.A.R.; CAMPOS, F.A.P.; GOMES, P.C.; CORDEIRO, M.N. (2006) Comparison of the partial proteomes of venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, parte C, n.142, p. 173-187.
- 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*, Volume 2, Pages 66–71.
- SAEZ, N.J.; SENFF, S.; JENSEN, J.E.; ER, S.Y.; HERZIG, V.; RASH, L.D. AND KING, G.F. (2010). Spider venom peptides as therapeutics. *Toxins* 12, 2851–2871.
- SEIDLER, J., ZINN, N., BOEHM, M. E., LEHMANN, W. D., (2010) De novo sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics*, v. 10, n. 4, p. 634-649.3
- SENGRUPTA, D., LEONTIADOU, H., MARK, A.E., MARRINK, S.-J. (2008) Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1778 (10), pp. 2308-2317.
- SERRANO, S. M.; WANG, D.; SHANNON, J. D.; PINTO, A. F.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K.; FOX, J. W. (2007) Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. *FEBS J.*, v. 274, p. 3611-3621.
- SHANNON, J. D.; BARAMOVA, E. N.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. (1989) Amino acid sequence of a *Crotalus artrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. *Journal Biol. Chem.*, v. 264, p. 11575-11583.
- SILVA Jr, P.I. (2000) Sistema Imune de Aracnídeos: Estrutura química e atividade de peptídeos antimicrobianos da Hemolinfa de *Acanthoscurria gomesiana*. São Paulo, Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP para obtenção do título de doutor em Ciências.

SILVA Jr., P.I., DAFFRE, S. & BULET, P. (2000) Isolation and full 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. Biochem. Chem. 275, 33464-33470.

SÖDERHÄLL, K. & CERENIUS, L. (1998) Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curren Opin in Immunol., 10: 23-28.

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

TANG, X., ZHANG, Y., HU, W., XU, D., TAO, H., YANG, X., LI, Y., JIANG, L., LIANG, S. (2010) Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses. J. Proteome Res. 5: 2550-64.

TEDFORD HW, SOLLOD BL, MAGGIO F, KING GF. (2004) Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. Toxicon, 43:601-618.

THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE DATABASE - <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>. Página consultada em julho de 2012.

THOMAS, R. G.; POUGH, F. H. (1979) The effects of rattlesnake venom on the digestion of prey. Toxicon 17, 221-228;

THOMMA, B. P. H. J., PENNINGCKX, I. A. M. A., BROEKAERT, W. F., CAMMUE, B. P. A. (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. Current Opinion in Immunology, 13:63-68. Toxicon 41, 519–524.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; SILVEIRA, R. B.; MEISSNER, G. O.; MANGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. (2010) Astacin-like metalloproteases

are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie*, v. 92, Issue 1, p. 21–32

USHKARYOV YA, VOLYNSKI KE, ASHTON AC. (2004) The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon*, 43:527-542

WENHUA, R.; SHUANGQUAN, Z.; DAXIANG, S.; KAIYA, Z.; GUANG, Y. (2006) Induction, purification and characterization of an antibacterial peptide scolopendrin I from the venom of centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. Vol. 43, April 2006. Pp 88-93.

WILLIAMS, W. J., BEUTLER, E., ERSLEV, A. J. AND LICHTMAN, M. A. (1983) *Hematology*, 3rd edn. New York.

XU K., JI Y. AND QU X. (1989) Purification and characterization of an antibacterial peptide from venom of *Lycosa singoriensis*. *Acta Zool. Sinica* 35: 300–305

YAN L., & ADAMS, M.E. (1998) Lycotoxins, Antimicrobial Peptides from Venom of the Wolf Spider *Lycosa carolinensis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2059–2066.

YENUGU, S., HAMIL, K. G., BIRSE, C. E., RUBEN, S. M., FRENCH, F. S. AND HALL, S. H. (2003) Antibacterial properties of the sperm binding proteins and peptides human epididymis 2 (HE2) family: salt sensitivity, structural dependence and their interaction with outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 372, 473–483.

YIN, L.M., EDWARDS, M.A., LI, J., YIP, C.M., DEBER, C.M. (2012) Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *J. Biol. Chem.* 10: 7738-45.

YUAN, C., JIN, Q., TANG, X., HU, W., CAO, R., YANG, S., XIONG, J., XIE, C., XIE, J., LIANG, S. (2007) Proteomic and peptidomic characterization of the venom from the Chinese bird spider, *Ornithoctonus huwena* Wang. *J. Proteome Res.* 6: 2792–2801.

ZHU, S., B. GAO AND TYTGAT, J. (2005) Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the C Salphabeta superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 2257-2269.

ZHU, S., PEIGNEUR, S., GAO, B., LUO, L., JIN, D., ZHAO, Y., TYTGAT, J. (2011) Molecular diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins. *Mol. Cell. Proteomics.* 10: M110.002832.



## Juruin: an antifungal peptide from the venom of the Amazonian Pink Toe spider, *Avicularia juruensis*, which contains the inhibitory cystine knot motif

Gabriela Ayroza<sup>1,2</sup>, Ivan L. C. Ferreira<sup>1</sup>, Raphael S. R. Sayegh<sup>1</sup>, Alexandre K. Tashima<sup>1,3</sup> and Pedro I. da Silva Junior<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, Brazil

### Edited by:

Fernando C. Bizzera, Federal University of São Paulo – UNIFESP, Brazil

### Reviewed by:

Nilton Lincopan, Universidade de São Paulo, Brazil  
Dmitri Debabov, NovaBay Pharmaceuticals, USA

### \*Correspondence:

Pedro I. da Silva Junior, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, (CAT/Cepid), Instituto Butantan, Av. Vital Brazil 1500, CEP-05503-900, São Paulo, Brazil.  
e-mail: pisjr@butantan.gov.br; pisjr@usp.br

The aim of this study was to screen the venom of the therapsid spider *Avicularia juruensis* for the identification of antimicrobial peptides (AMPs) which could be further used as prototypes for drug development. Eleven AMPs, named juruentoxins, with molecular weight ranging from 3.5 to 4.5 kDa, were identified by mass spectrometry after the soluble venom was separated by high performance liquid chromatography. Juruentoxins have a putative inhibitory cystine knot (ICK) motif, generally found in neurotoxins, which are also resistant to proteolysis. One juruentoxin that has 38 amino acid residues and three disulfide bonds were characterized, to which we proposed the name Juruin. Based on liquid growth inhibition assays, it has potent antifungal activity in the micromolar range. Importantly, Juruin lacks haemolytic activity on human erythrocytes at the antimicrobial concentrations. Based on the amino acid sequence, it is highly identical to the insecticidal peptides from the therapsid spiders *Selenocosmia huwena*, *Chilobrachys jingzhao*, and *Haplopelma schmidtii* from China, indicating they belong to a group of conserved toxins which are likely to inhibit voltage-gated ion channels. Juruin is a cationic AMP, and Lys22 and Lys23 show maximum positive charge localization that might be important for receptor recognition. Although it shows marked sequence similarity to neurotoxic peptides, Juruin is a novel exciting molecule with potent antifungal activity, which could be used as a novel template for development of drugs against clinical resistant fungi strains.

**Keywords:** Juruin, juruentoxins, *Avicularia juruensis*, inhibitory cystine knot motif, Theraphosidae venom, antimicrobial peptides