Rodrigo Caetano Belmonte da Silva

**Isolamento e caracterização de peptídeos
antimicrobianos derivados da digestão da
hemoglobina em *Rhipicephalus (Boophilus)*
*microplus***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo

2009

Rodrigo Caetano Belmonte da Silva

**Isolamento e caracterização de peptídeos
antimicrobianos derivados da digestão da
hemoglobina em *Rhipicephalus (Boophilus)*
*microplus***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof^a. Sirlei Daffre

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Belmonte, Rodrigo.

Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos produzidos durante a digestão da hemoglobina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* / Rodrigo Belmonte. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Sirlei Daffre.

(Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Bioquímica e imunologia de artópodes.

Versão do título para o inglês: Isolation and characterization of antimicrobial peptides produced during hemoglobin digestion in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Descritores: 1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 2. Peptídeos antimicrobianos 3. Sistema imune 4. Digestão da hemoglobina 5. Hemocidinas I. Daffre, Sirlei II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0238/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rodrigo Belmonte.

Título da Dissertação: Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos produzidos durante a digestão da hemoglobina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Orientador(a): Sirlei Daffre.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 268/08, referente ao projeto intitulado: *"Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos derivados da digestão da hemoglobina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*"* sob a responsabilidade de Rodrigo Caetano Belmonte da Silva, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de outubro de 2008.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Agradecimentos

Gostaria primeiramente, de agradecer aos meus avôs, que infelizmente não podem presenciar mais essa etapa da minha vida, mas certamente estariam orgulhosos das conquistas do netinho.

À minha mãe Pilar e ao meu pai Luis (pai mesmo), por todos os incentivos, broncas, ensinamentos e discussões enfim, por todo o apoio que tornou possível a minha empreitada de realizar o meu mestrado em uma cidade nova, desconhecida.

Aos membros de meu laboratório na UFRJ, em especial ao Prof. Ednildo, que foi o responsável pelo meu primeiro contato com a minha futura orientadora, e ao Marcelo, que me ensinou todas as bases necessárias para que me tornar-se um pesquisador.

Agradeço todos os membros do Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes, por me receberem de braços abertos, suportarem um carioca sempre reclamando de São Paulo (às vezes com razão), e por terem sempre participado na minha pesquisa, tanto nos seminários de resultados quanto nas conversas individuais.

Individualmente agradeço: À Prof^a. Sirlei Daffre, primeiro pela confiança em mim depositada, já que desde a nossa primeira conversa me incentivou a iniciar o mestrado sob a sua orientação, e também por todas as discussões científicas e ensinamentos. Acredito que amadureci muito, tanto pessoalmente como cientificamente, durante o meu período neste laboratório. À Andréa, pelas diversas discussões de resultados, dicas e revisão da minha dissertação. À Maria Fernanda, por sempre revisar quaisquer textos em inglês. Ao Carlos, por sempre estarmos discutindo os nossos resultados, já que nossos trabalhos são complementares. À Eliane, por todas as discussões, sugestões e pelo carinho que só uma mãe sabe dar. À Susana, por todo o trabalho de manter o nosso laboratório funcionando. À Cláudia pelas horas de análises no Espectrômetro de Massas. Ao Diego, pela amizade verdadeira e por ter se tornado praticamente meu irmão paulista.

Também gostaria de agradecer aos nossos colaboradores da UFRGS, Prof. Itabajara Vaz, Prof. Carlos Termignoni e aos membros de seus laboratórios, pois sem eles não teríamos carrapatos.

Gostaria de agradecer à Heloisa, minha namorada, pelo companheirismo e dedicação, pela amizade e pelo amor que a gente construiu, e por incrivelmente já me deixar com saudades de São Paulo.

Por último agradeço às agências financiadoras, CNPq, pela bolsa de mestrado, e FAPESP, pelo financiamento ao laboratório.

Resumo

BELMONTE, R. Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos produzidos durante a digestão da hemoglobina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 85 f. Dissertação – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A atividade antimicrobiana de fragmentos da hemoglobina vem sendo relatada em vários animais, tendo sido denominadas hemocidinas os peptídeos antimicrobianos derivados de proteínas que possuem o grupo prostético heme. O carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um artrópode hematófago, capaz de adquirir e processar grandes quantidades de sangue para seu metabolismo. Neste trabalho, identificamos e caracterizamos as hemocidinas produzidas no tubo digestório do carrapato. Através de técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho e espectrometria de massas, identificamos 10 fragmentos da hemoglobina bovina que possuem atividade antimicrobiana contra o fungo *Candida albicans*. Estes fragmentos se originam de diversas regiões da cadeia α da hemoglobina bovina (Hb α 1-94, 3-94, 1-87, 93-141, 102-141, 103-141, 107-141, 104-141 e 98-114) tendo sido encontrado apenas um fragmento pertencente à cadeia β (Hb β 127-145). Através da análise da estrutura primária *in silico*, determinamos que todos estes peptídeos apresentam um alto conteúdo de aminoácidos básicos, além de uma estrutura secundária na conformação de α -hélice, características similares a outros peptídeos antimicrobianos já descritos. A produção dessas hemocidinas depende da ação de proteases específicas presentes no tubo digestório do carrapato, visto que nenhum fragmento da hemoglobina com atividade antimicrobiana foi identificada em purificações de sangue bovino. Verificamos que as duas principais proteases que atuam na produção das hemocidinassão uma cisteíno-proteinase e uma aspártico-proteinase. A identificação de diversos peptídeos com atividade antimicrobiana, no tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus* indica uma possível participação das hemocidinas na proteção contra microorganismos, podendo agir em sinergismo com outros componentes do sistema imune do invertebrado.

Palavras chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Peptídeos antimicrobianos, Sistema imune, Digestão da hemoglobina, Hemocidinas.

Abstract

BELMONTE, R. **Isolation and characterization of antimicrobial peptides produced during hemoglobin digestion on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 85 p. 2009. Master Thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The antimicrobial activity of hemoglobin fragments has been reported in diverse models, being denominated hemocidins all antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins. The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a blood-sucking arthropod that is capable of processing large amounts of blood to its own metabolism. In this present work, we aimed to identify and characterize the hemocidins that are produced in the tick gut during the hemoglobin's digestion. Using high performance liquid chromatography purification procedures and mass spectrometry, we were able to identify 10 fragments of bovine hemoglobin that presents antimicrobial activity towards the fungus *Candida albicans*. Nine of these fragments are originated from various regions of the α -chain of bovine hemoglobin (Hb α 1-94, 3-94, 1-87, 93-141, 102-141, 103-141, 107-141, 104-141 and 98-114) and only one fragment from the β -chain (Hb β 127-145). Using *in silico* modeling, we were able to determine that all these peptides presents an α -helix conformation as secondary structure and a high content of basic amino acids, characteristics that are similar to others antimicrobial peptides already described. These hemocidins are products of specific proteases that are found inside the tick's gut as no hemocidins were found when the same purification procedure was used to process bovine blood. Through the comparison of these peptides with the hemoglobin cleavage sites, by the tick digestive enzymes, we were able to identify the two main proteases that act on the production of the hemocidins: A cysteine-proteinase (BmCL1) and an aspartic-protease (BmAP). The identification of several hemocidins in the gut of *R. (Boophilus) microplus* suggests these antimicrobial peptides may play a role on the defense against microorganisms that infects the digestive tract, possibly acting in synergism with others components of the tick immune system.

Keywords: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Antimicrobial peptides, Immune system, Hemoglobin digestion, Hemocidins.

Lista de Abreviaturas

ABS: Absorbância

ACN: Acetonitrila

AMP(s): Peptídeo(s) antimicrobiano(s)

DTT: Dithiothreitol

E-64: Trans-epoxysucciny-L-leucyl-amido-4-guanidino-butano

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ESI-MS: Espectrometria de massas por eletrospray

Hb: Hemoglobina

HPLC: Cromatografia líquida de alto desempenho

LC-MS/MS: Espectrometria de massas *in tandem* acoplado à HPLC

LPS: Lipopolissacarídeo

PB: Meio de peptona para cultura cultivo de bactérias

PBS: Tampão fosfato salino

PDB: Potato Dextrose Broth para cultivo de leveduras

PMSF: Fenilmetanosufonilfluoreto

RP-HPLC: Cromatografia líquida de alto desempenho de fase Reversa

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TFA: Ácido trifluoroacético

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida do carrapato <i>R. (Boophilus) microplus</i>	16
Figura 2: Purificação por RP-HPLC da fração 5% de ACN	42
Figura 3: Purificação por RP-HPLC da fração 40% de ACN	44
Figura 4: Purificação por RP-HPLC da fração 80% de ACN	45
Figura 5: Purificação por RP-HPLC da fração 40% de ACN filtrada	46
Figura 6: Perfil de ESI-MS das frações antimicrobianas após a primeira RP-HPLC	48
Figura 7: Hemocidinas identificadas por LC-MS/MS	52
Figura 8: Perfil de RP-HPLC da fração C ₁₈₀ e série de íons das frações da segunda RP-HPLC	53
Figura 9: Perfil de RP-HPLC da fração C ₁₉₂ e série de íons das frações da segunda RP-HPLC	55
Figura 10: Perfil de RP-HPLC da fração C ₁₉₃ e série de íons das frações da segunda RP-HPLC	56
Figura 11: Perfil de RP-HPLC da fração C ₁₉₄ e série de íons das frações da segunda RP-HPLC	58
Figura 12: Atividade proteásica de extratos de tubo digestório de <i>R. (Boophilus) microplus</i>	60
Figura 13: Purificação por RP-HPLC da fração peptídica com inibidores de proteases	61
Figura 14: Perfil de ESI-MS das frações antimicrobianas da purificação da fração peptídica com inibidores de proteases	62
Figura 15: Perfil de RP-HPLC da fração C ₃₇₃ e série de íons da fração C ₃₇₃ C ₄₄₁	64
Figura 16: Perfil de RP-HPLC da fração peptídica do sangue bovino	66
Figura 17: Sítios de clivagem das cadeias da hemoglobina	75

Sumário

1 Introdução	15
<u>1.1 Estratégias para o controle de carrapatos</u>	16
<u>1.2 Sistema immune de artópodes</u>	17
<u>1.3 Peptídeos antimicrobianos de carrapatos</u>	18
<u>1.4 Digestão do repasto sanguíneo em carrapatos</u>	20
<u>1.5 Peptídeos antimicrobianos derivados da hemoglobina (hemocidinas)</u>	22
2 Objetivos	31
3 Material e Métodos	32
<u>3.1 Carrapatos</u>	32
<u>3.2 Dissecção dos tubos digestórios</u>	32
<u>3.3 Sangue bovino</u>	33
<u>3.4 Determinação da concentração de proteínas</u>	33
<u>3.5 Obtenção das amostras</u>	34
<u>3.5.1 Homogeneização dos tubos digestório sem inibidores de proteases</u>	33
<u>3.5.2 Homogeneização dos tubos digestório com inibidores de proteases</u>	34
<u>3.5.3 Homogeneização do sangue bovino sem inibidores de proteases</u>	35
<u>3.6 Pré-purificação dos peptídeos antimicrobianos</u>	35
<u>3.6.1 Pré-purificação dos peptídeos antimicrobianos dos tubos digestórios de carrapatos homogeneizados sem inibidores de proteases</u>	35
<u>3.6.2 Pré-purificação dos peptídeos dos tubos digestórios de carrapatos homogeneizados na presença de inibidores de proteases e do sangue bovino</u>	36
<u>3.7 Purificação dos peptídeos antimicrobianos</u>	36
<u>3.8 Ensaios de atividade antimicrobiana</u>	37
<u>3.9 Espectrometria de massas por eletrospray (ESI-MS)</u>	38
<u>3.9.1 Determinação das massas moleculares dos peptídeos</u>	38

<u>3.9.2 Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas <i>in tandem</i> acoplado à HPLC (LC-MS/MS)</u>	39
<u>3.10 Ensaio de atividade proteolítica do tubo digestório</u>	39
<u>3.11 Análise das características físico-químicas dos peptídeos</u>	40
<u>3.12 Análise estatística</u>	41
4 Resultados	42
<u>4.1 Detecção e purificação da atividade antimicrobiana dos tubos digestivos homogeneizados sem inibidores de protease</u>	42
<u>4.1.1 Frações 5, 40 e 80% de ACN do extrato de 26 fêmeas</u>	42
<u>4.1.2 Fração de 40% de ACN filtrada do extrato de 40 fêmeas</u>	46
<u>4.2 Purificação e identificação dos peptídeos antimicrobianos do tubo digestório de carrapatos homogeneizados na presença de inibidores de proteases</u>	59
<u>4.3 Purificação e identificação dos peptídeos antimicrobianos presentes no sangue bovino</u>	65
<u>4.4 Análise da estrutura primária e secundária das hemocidinas</u>	66
5 Discussão	68
6 Conclusões	76
Referências Bibliográficas	77

1 Introdução

Os carrapatos são artrópodes hematófagos da classe Arachnida, ordem Ixodida (superfamílias Ixodidae e Agarsidae) que dependem do ectoparasitismo de vertebrados para sua sobrevivência, sendo encontrados em diversas regiões do globo. São considerados um dos principais vetores na transmissão de doenças humanas e veterinárias, podendo ser causadas por uma diversidade de agentes etiológicos, como fungos, vírus, bactérias e protozoários (KAUFMAN, 1989).

Dentre as várias espécies de carrapatos vetores de doenças veterinárias, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é uma das mais importantes. Pertencente à família Ixodidae, esta espécie parasita o gado bovino, transmitindo doenças severas como a anaplasmosse e a babesiose. Estima-se que *R. (Boophilus) microplus* cause prejuízos de cerca de um bilhão de dólares anuais à pecuária do Brasil (EMBRAPA, 2000) em decorrência de danos diretos ao gado, que envolvem: a desvalorização do couro e a redução da produtividade de carne e de leite (EVANS *et al.*, 2000; JONSSON, 2006).

O ciclo de vida de *R. (Boophilus) microplus* é denominado monóxeno, pois somente um hospedeiro é necessário para o total desenvolvimento do artrópode, ou seja, a partir do momento em que ocorre a fixação das larvas no couro do bovino, estas ali permanecem até a fase adulta (**Figura 1**). Após a fixação, as larvas realizam um repasto sanguíneo e, em seguida, sofrem o processo de muda para ninfas, as quais, por sua vez, também sofrem muda após uma nova alimentação sanguínea tornando-se adultos. As fêmeas (denominadas partenóginas) novamente se fixam ao hospedeiro enquanto os machos permanecem móveis, em busca das fêmeas para realizar a cópula. Logo após a cópula, a fêmea teleógina inicia um período de ingurgitamento acelerado, e após atingir a repleção, desprende-se do couro do hospedeiro, caindo ao solo, onde então realiza a postura de seus ovos. O período de desenvolvimento, após a fixação das larvas até a queda das fêmeas ingurgitadas leva cerca de 21 dias (ROBERTS, 1968). Uma vez no solo, os ovos se desenvolvem até a eclosão das larvas que buscam um novo hospedeiro para reiniciar o ciclo, com duração aproximada de 6 semanas em condições favoráveis (SONENSHINE, 1991).

Figura 1: Ciclo de vida do carrapato *R. (Boophilus) microplus*: 1 – Fixação da larva no hospedeiro seguido da alimentação sanguínea, muda para ninfa, nova alimentação sanguínea e muda para adulto; 2 – Fêmea adulta não copulada (partenógena) permanece fixada no couro do bovino; 3 – Fêmea adulta copulada e ingurgitada (teleógena) realiza a alimentação sanguínea acelerada até a repleção e desprende-se do hospedeiro; 4 – Fêmea teleógena no solo iniciando a postura dos ovos; 5 – Ovos desenvolvendo-se no solo; 6 – Eclosão das larvas e busca por um novo hospedeiro.

1.1 Estratégias para o controle de carrapatos

Diversas estratégias têm sido utilizadas para o controle de carrapatos, dentre as quais a utilização de acaricidas é uma das mais empregadas devido a sua alta eficiência. Apesar da eficiência, os acaricidas rapidamente selecionam linhagens de carrapatos resistentes, sendo necessário o desenvolvimento constante de novos agentes químicos (CHEVILLON *et al.*, 2007). Além disso, a contaminação da carne e do leite pelos acaricidas é praticamente inevitável, trazendo preocupações com relação aos seus efeitos sobre a saúde humana (DE LA FUENTE *et al.*, 1999). Como consequência dos pontos negativos da utilização de acaricidas, o controle biológico surge como uma alternativa mais barata e mais segura. Vários trabalhos recentes

têm relatado uma eficácia parcial dessa estratégia de controle, como, por exemplo, a utilização de bactérias (MANGOLD *et al.*, 1993), de fungos (ZHIOUA *et al.*, 1997; FRAZZON *et al.*, 2000), e de metabólitos secundários fúngicos, como o *Spinosad* produzido por *Saccharopolyspora spinosa* (DAVEY *et al.*, 2001).

Outra estratégia de controle que tem se mostrado eficiente é a vacinação do hospedeiro bovino com antígenos ocultos, isto é, antígenos ao qual o hospedeiro não entra em contato durante o parasitismo. No caso de *R. (Boophilus) microplus*, duas vacinas que usam uma proteína presente em células digestivas (Bm86) como antígeno oculto já são comercializadas na Austrália e Cuba, revisto por de La Fuente *et al.* (1999). A inoculação deste antígeno no bovino promove a produção de anticorpos, que, ao serem ingeridos juntamente com o repasto sanguíneo, causam a destruição das células do epitélio digestivo do carrapato, ocasionado como consequência a mortalidade ou diminuição da capacidade reprodutiva dos carrapatos. Essa vacina promove a redução de 55 a 100% no número de carrapatos infestando o bovino (DE LA FUENTE *et al.*, 1999). Porém, no Brasil, a utilização dessas vacinas não oferece uma proteção tão eficiente do rebanho, sendo a redução no número de carrapatos de 45 a 60 % (RODRIGUEZ *et al.*, 1995) ou 46 a 49 % (ANDREOTTI, 2006).

Em decorrência do sucesso desta estratégia de controle, vários estudos vem buscando identificar novos alvos para a produção de vacinas, os quais sejam mais eficientes na eliciação da resposta imune do bovino e cujos anticorpos específicos ataquem alvos vitais do carrapato (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998).

1.2 Sistema imune dos artrópodes

O sistema imune dos artrópodes assemelha-se à resposta inata do sistema imune de vertebrados, conservada ao longo do reino animal servindo como modelo para o estudo da imunidade inata (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007). O sistema imune dos artrópodes, apesar de só contar com a resposta inata, é eficiente na eliminação de patógenos, sendo constituído por reações humorais e celulares complexas (RATCLIFFE E WHITTEN, 2004). Dentro das reações humorais, destaca-se a síntese de moléculas com atividade antimicrobiana. Vários locais já

foram descritos como produtores dessas moléculas: corpo gorduroso (órgão biossintético análogo ao fígado de vertebrados); hemócitos (células presentes na hemolinfa com funções de defesa e armazenamento); tubo digestório; órgãos reprodutores; glândulas salivares; e sistema nervoso. Dentre as moléculas antimicrobianas produzidas, grande parte corresponde a peptídeos antimicrobianos (AMPs), os quais podem ter sua síntese induzida pela detecção de microorganismos invasores ou ser constitutiva, encontrando-se armazenados em grânulos do citoplasma dos hemócitos, sendo liberados em decorrência da invasão (RATCLIFFE, 2004).

Os AMPs possuem atividade microbicida em concentrações micromolares contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra fungos, apresentando geralmente baixa toxicidade às células de eucariotos, possuindo, dessa forma, alto potencial biotecnológico como novos antibióticos (BULET *et al.*, 2004). A grande maioria dos peptídeos antimicrobianos dos invertebrados descritos até o momento foi isolada de insetos, sendo pequeno o número de peptídeos antimicrobianos caracterizados em aracnídeos <<http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag5.htm>>.

1.3 Peptídeos antimicrobianos de carrapatos

Diversos componentes da resposta humoral de carrapatos já foram foco de estudos, pela sua possível participação na interação com patógenos transmitidos por esses artrópodes. Já foram descritas moléculas antimicrobianas do tipo lisozima, cistatina, defensinas, fragmentos de hemoglobina e peptídeos antimicrobianos sem similaridades com outras moléculas, como a microplusina e a hebraína (TAYLOR, 2006).

Em *R. (Boophilus) microplus* já foram caracterizados quatro peptídeos antimicrobianos:

- Microplusina: com massa molecular de 10.204 Da e seis resíduos de cisteína, foi purificado da hemolinfa livre de células (FOGACA *et al.*, 2004) e de ovos (ESTEVES *et al.*, 2009). A microplusina apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e

fungos (SILVA *et al.*, 2009), e é expressa na forma de pré-peptídeo com um peptídeo sinal composto por 20 aminoácidos (FOGACA *et al.*, 2004). Sua expressão foi demonstrada no corpo gorduroso, hemócitos, ovários, e também ovos. A localização deste peptídeo em diversas regiões do sistema reprodutivo feminino (como tubo conectivo e ovários), assim como nos ovos, sugere uma participação importante no mecanismo de defesa dos ovos e embriões em desenvolvimento (ESTEVES *et al.*, 2009).

- Defensina (FOGACA *et al.*, 2004): com massa molecular de 4.285 Da e seis resíduos de cisteína, foi isolado dos hemócitos e apresenta similaridade com defensinas de outros invertebrados. A análise de sua sequência genética demonstrou que este peptídeo antimicrobiano é expresso na forma de pré-pró-peptídeo assim como as defensinas de insetos. Sua expressão gênica é pronunciada no corpo gorduroso e nos hemócitos, além de também ser observada nos ovários.
- Ixodidina (FOGACA *et al.*, 2006): com massa molecular de 7.103 Da e dez resíduos de cisteína, foi isolado dos hemócitos. Este peptídeo antimicrobiano é capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*. Sua estrutura primária não apresenta nenhuma similaridade com outros AMPs descritos, porém é similar a inibidores de serina-proteases e se mostrou capaz de inibir a atividade hidrolítica de quimotripsina e de elastase.
- Hb 33-61 (FOGACA *et al.*, 1999): este peptídeo de massa molecular de 3.205 Da foi purificado do tubo digestório de fêmeas ingurgitadas, e foi identificado como sendo um fragmento da cadeia α da hemoglobina bovina. Exibe atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos, sendo produzido por ação de enzimas digestivas específicas do carrapato.

A existência de diversos peptídeos antimicrobianos localizados em diferentes órgãos do carrapato *R. (Boophilus) microplus* sugere a importância destes no controle de microorganismos invasores, agindo de forma local ou sistêmica.

1.4 Digestão do repasto sanguíneo em carrapatos

A hematofagia é um hábito alimentar de extrema importância para diversas espécies de artrópodes ectoparasitas, incluindo dípteros, pulgas e carrapatos. Estes animais obtêm do hospedeiro os nutrientes necessários para sua sobrevivência e para a produção de ovos, sendo em muitos casos a fonte exclusiva de nutrição (RIBEIRO, 1995).

A digestão do repasto sanguíneo por insetos hematófagos, como mosquitos, ocorre extracelularmente, no lúmen do tubo digestivo, e depende da ação de proteases alcalinas, principalmente da classe das serina-proteases (BRIEGEL e LEA, 1975). Além disso, não ocorre o contato direto entre o alimento e o epitélio do tubo digestivo, uma vez que a membrana peritrófica forma uma barreira física, protegendo o epitélio de danos físicos e dificultando a entrada dos patógenos no epitélio digestivo (SIEBER *et al.*, 1991; BEIER, 1998; TERRA, 2001). Já em carrapatos, a digestão do repasto sanguíneo ocorre majoritariamente em ambiente intracelular, em lisossomos das células digestivas (SONENSHINE, 1991; LARA *et al.*, 2005).

Não existem evidências da existência de membrana peritrófica em carrapatos (BALASHOV IU e RAIKHEL, 1976; SONENSHINE, 1991; LARA *et al.*, 2005). Sendo assim, as células digestivas permanecem em contato direto com o alimento ingerido. A ausência dessa membrana pode facilitar a interação entre o agente infeccioso e as células do epitélio digestivo do carrapato, permitindo a penetração do mesmo para a hemocele (TERRA, 2001).

Diversas enzimas digestivas de carrapatos já foram estudadas com o objetivo de elucidar o processo proteolítico envolvido na hidrólise das proteínas obtidas no repasto sanguíneo. Em *R. (Boophilus) microplus* já foram identificadas enzimas pertencentes às classes aspártico e cisteína proteinases (MENDIOLA *et al.*, 1996; RENARD *et al.*, 2000; MENDIOLA *et al.*, 2001; RENARD *et al.*, 2002), além de uma carboxi-peptidase denominada Bm86 (JARMEY *et al.*, 1995), que havia sido previamente identificada como um possível antígeno para a formulação de uma vacina (RIDING *et al.*, 1994). Também foi descrita a atividade de uma protease

neutra, inibida por fenilmetanosufonilfluoreto (PMSF) e ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (HERNANDEZ ALVAREZ *et al.*, 2000).(LARA *et al.*, 2005)

Em *Haemaphysalis longicornis*, já foram identificadas enzimas digestivas pertencentes às classes das aspártico (BOLDBAATAR *et al.*, 2006), cisteína (MULENGA *et al.*, 1999) e serina proteinases (MULENGA *et al.*, 2001; MIYOSHI *et al.*, 2004; MIYOSHI *et al.*, 2007). Outra cisteína proteinase (asparaginil endopeptidase) também foi caracterizada no carrapato *Ixodes ricinus* (SOJKA *et al.*, 2007). A caracterização das enzimas responsáveis pela degradação da hemoglobina (Hb) é necessária para o entendimento da rede de hidrolases que processam as proteínas obtidas no repasto sanguíneo. Identificar as enzimas nesse sistema podem torná-las possíveis alvos para vacinas.

O primeiro passo para a digestão do repasto sanguíneo em carrapatos corresponde à lise dos eritrócitos (hemólise), tornando a Hb disponível às células digestivas. Embora o processo ainda não seja completamente elucidado, sabe-se que a hemólise ocorre no lúmen do tubo digestivo do carrapato (BALASHOV IU *et al.*, 1972), sendo uma serina proteinase apontada como a possível enzima envolvida na lise das hemácias (MIYOSHI *et al.*, 2007). Em seguida, dá-se início ao processo de aquisição das proteínas contidas no repasto sanguíneo, majoritariamente hemoglobina e albumina. Essas proteínas são internalizadas por células digestivas e, no caso da hemoglobina, a endocitose é mediada por receptores específicos (LARA *et al.*, 2005). A albumina é adquirida pelas células digestivas através de endocitose não específica da fase fluida do bolo alimentar (pinocitose). Após a endocitose, estas proteínas são acumuladas em pequenas vesículas ácidas no citoplasma. Uma vez dentro das vesículas ácidas, essas proteínas sofrem a ação de enzimas lisossomais hidrolíticas, como cisteína proteinases (SOJKA *et al.*, 2007) que irão degradá-las. Neste momento do processo digestivo ocorre a liberação de grandes quantidades de heme, a fração porfirínica da hemoglobina (LARA *et al.*, 2003). O grupamento heme livre possui efeito tóxico para diversos componentes celulares como fragmentação do DNA (AFT e MUELLER, 1983), oxidação ou formação de ligações cruzadas entre proteínas (VINCENT *et al.*, 1988), além de participar na produção de espécies reativas de oxigênio, as quais, por sua vez, causam a oxidação de diversos lipídeos celulares (SCHMITT *et al.*, 1993; PAIVA-SILVA *et al.*, 2006). A

liberação de grandes quantidades de heme constitui um desafio para o animal, que deve superar o estresse oxidativo causado por essa molécula. Dois destinos para esse grupamento em *R. (Boophilus) microplus* já foram descritos: (i) o transporte para a hemocele do carrapato (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2000), podendo ser utilizado para a síntese de heme-proteínas, já que o carrapato não é capaz de sintetizar essa molécula (BRAZ *et al.*, 1999); e (ii) a formação de agregados denominados hemossomos, que estão envolvidos na sua destoxificação (LARA *et al.*, 2003). Várias células digestivas, contendo hemossomos e outros produtos da digestão da hemoglobina se desprendem da camada epitelial, podendo permanecer intactas ou romper-se no lúmen, através da autólise, liberando o conteúdo citoplasmático no lúmen do tubo digestório (BALASHOV IU e RAIKHEL, 1976; AGBEDE e KEMP, 1985; WALKER e FLETCHER, 1987; KOH *et al.*, 1991).

1.5 Peptídeos antimicrobianos derivados da hemoglobina (hemocidinas)

A Hb, principal carreador de oxigênio presente nos eritrócitos de vertebrados, pode também ser fonte de diversos peptídeos biologicamente ativos, podendo estes agirem como opióides, analgésicos, hemopoiéticos, vasos-constritores e antigonadotrópicos (KARELIN *et al.*, 1995; PETROV *et al.*, 1997; IVANOV *et al.*, 2005). Além dessas diversas atividades biológicas, recentemente a hemoglobina também tem sido descrita como fonte de diversos peptídeos antimicrobianos (MAK *et al.*, 2000).

A primeira descrição da atividade antimicrobiana da Hb contra bactérias Gram-negativas data de 1958 (HODSON e HIRSCH, 1958). Essa atividade existia somente em condições ácidas de baixa força iônica e era completamente abolida pela ligação entre Hb e haptoglobina (proteína ligadora de hemoglobina) ou na presença de cátions divalentes.

Seguindo a investigação da atividade antimicrobiana da Hb, em 2000 foi demonstrado que para que exista a atividade antimicrobiana da hemoglobina humana, e também da mioglobina humana, estas proteínas precisavam estar desprovidas do grupamento heme (MAK *et al.*, 2000). Tanto a cadeia α quanto a β

apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra a levedura *Candida albicans*, assim como seus respectivos fragmentos purificados após a digestão *in vitro* com brometo de cianogênio (**Tabela 1**). Foi então proposta a denominação dos peptídeos antimicrobianos derivados de hemeproteínas como hemocidinas.

O trabalho de (PARISH *et al.*, 2001) demonstrou a atividade antimicrobiana das cadeias α e β de Hb desprovidas do heme de humanos, cavalos, cobras e

Tabela 1 – Principais hemocidinas descritas na literatura.

Sequência	Organismo	Atividade contra			Origem	Referências
		Gram (+)	Gram (-)	Fungos		
α 1-23	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(FROIDEVAUX <i>et al.</i> , 2001; NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 1-27	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 1-28	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 1-29	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 1-32	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 33-45	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 33-46	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 33-61	Bovino	+	-	+	Tubo digestório de <i>R. (Boophilus) microplus</i>	(FOGACA <i>et al.</i> , 1999)
α 33-66	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 33-83	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 33-97	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 33-98	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 34-46	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 34-66	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 34-83	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)

(Continua)

Tabela 1 (Continuação)

Sequência	Organismo	Atividade contra			Origem	Referências
		Gram (+)	Gram (-)	Fungos		
α 34–98	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 36–45	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 36–97	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 37–46	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 37–98	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 107–133	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 107-136	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(DAOUD <i>et al.</i> , 2005)
α 107-141	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2006)
α 133-141	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2006)
α 137–141	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
β 1–13	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
β 1–30	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
β 114–145	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
β 121–145	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
β 126–145	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
β 140–145	Bovino	+	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(NEDJAR-ARROUME <i>et al.</i> , 2008)
α 1-31	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000)
α 1-32	Coelho	+	ND	ND	Tubo digestório de <i>O. moubata</i>	(NAKAJIMA <i>et al.</i> , 2003)
α 3-32	Coelho	+	ND	ND	Tubo digestório de <i>O. moubata</i>	(NAKAJIMA <i>et al.</i> , 2003)
Hemoglobina	Aligator	-	+	-	Proteólise <i>in vitro</i>	(PARISH <i>et al.</i> , 2001)
	Cavalo	-	+	+		
	Humano	-	+	+		
	Cobra	+	+	+		
Cadeia α	Humano	+	+	+	Separação <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000; PARISH <i>et al.</i> , 2001)
α 1–20	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 1–25	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)

(Continua)

Tabela 1 (Continuação)

Sequência	Organismo	Atividade contra			Origem	Referências
		Gram (+)	Gram (-)	Fungos		
α 1–26	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 1–27	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 1–28	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 1–29	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 1–31	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 1–32	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i> e sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2000; MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 1-76	Humano	-	+	-	Proteólise <i>in vitro</i>	(PARISH <i>et al.</i> , 2001)
α 10–141	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 16–30	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 17–31	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 18–44	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 32-92	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000)
α 33-76	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000)
α 33-93	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(DENG <i>et al.</i> , 2009)
α 35–56	Humano	+	+	-	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 35–58	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 35–60	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 35–72	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 35–77	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 35–78	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 35–80	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 35–90	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 46–64	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 77-141	Humano	-	-	+	Proteólise <i>in vitro</i>	(PARISH <i>et al.</i> , 2001)
α 77-141	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000)
α 93-141	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000)
α 106–141	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)

Tabela 1 (Continuação)

Sequência	Organismo	Atividade contra			Origem	Referências
		Gram (+)	Gram (-)	Fungos		
α 107–140	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 107–141	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
α 110–141	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
Cadeia β	Humano	+	+	+	Separação <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000; PARISH <i>et al.</i> , 2001)
β 1-30	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i> e sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2000; MAK <i>et al.</i> , 2004)
β 1-55	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000)
β 31-40	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000)
β 41-104	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000)
β 56-72	Humano	-	+	-	Proteólise <i>in vitro</i>	(PARISH <i>et al.</i> , 2001)
β 56-146	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000)
β 105-146	Humano	ND	+	ND	Proteólise <i>in vitro</i>	(MAK <i>et al.</i> , 2000)
β 111-146	Humano	+	+	+	Placenta	(LIEPKE <i>et al.</i> , 2003)
β 113-146	Humano	ND	+	ND	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
β 115-146	Humano	+	+	-	Sangue menstrual	(MAK <i>et al.</i> , 2004)
β 116-146	Humano	+	+	+	Proteólise <i>in vitro</i>	(PARISH <i>et al.</i> , 2001)
γ 130-146	Humano	+	+	+	Placenta	(LIEPKE <i>et al.</i> , 2003)

aligátres, além dos fragmentos produzidos *in vitro* após a digestão com brometo de cianogênio (**Tabela 1**), o que confirmou os dados obtidos por (MAK *et al.*, 2000). Porém, (PARISH *et al.*, 2001) também detectaram atividade antimicrobiana dos tetrâmeros intactos da Hb, ainda ligados ao grupamento heme.

Ainda em 2001 foi descrita outra hemocidina produzida pela digestão *in vitro* da Hb bovina, utilizando-se a pepsina de porco (FROIDEVAUX *et al.*, 2001). O fragmento corresponde aos aminoácidos 1 até 23 da cadeia α da Hb bovina e

apresentou atividade contra *M. luteus* (**Tabela 1**). Também foi demonstrada a atividade hemolítica desse peptídeo contra eritrócitos bovinos, sendo essa atividade detectada quando concentrações maiores que 2 mM da hemocidina era empregada, valor este três vezes maior que a concentração necessária para inibir completamente o crescimento da bactéria. Essa hemocidina também interage com lipossomos provocando a permeabilização da membrana. Ensaios utilizando espectroscopia infra-vermelha detectaram a presença de 20% de α -hélice nesse peptídeo quando em água.

Em 2005, foi descrita mais uma hemocidina derivada da digestão *in vitro* da Hb bovina por pepsina (DAOUD *et al.*, 2005). Esse fragmento, correspondente aos aminoácidos 107 até 136 da cadeia α da hemoglobina bovina, apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (**Tabela 1**). Não foi detectada a atividade hemolítica desse peptídeo até a concentração de 380 μ M contra eritrócitos bovinos, valor este cinco vezes superior a concentração que inibe 100% do crescimento de *M. luteus*.

Recentemente, quatro novas hemocidinas foram geradas quando pela incubação da hemoglobina bovina com pepsina (NEDJAR-ARROUME *et al.*, 2006). Essas hemocidinas compreendem os aminoácidos 107 até 141; 137 até 141 e 133 até 141 da cadeia α e também os aminoácidos 126 até 145 da cadeia β (**Tabela 1**). Esses peptídeos apresentam atividade contra diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e não apresentam atividade hemolítica em eritrócitos bovinos em concentrações em até cinco vezes maiores que a concentração necessária para sua atividade antimicrobiana. Análises utilizando predições de estrutura secundária demonstraram que três dos peptídeos encontrados apresentavam elevado conteúdo de α -hélices.

Novamente, utilizando a estratégia de digestão enzimática por pepsina, foram descritos 24 peptídeos derivados da cadeia α e seis da cadeia β da Hb bovina (**Tabela 1**) (NEDJAR-ARROUME *et al.*, 2008). Todos os peptídeos apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Listeria innocua* e *M. luteus*) e Gram-negativas (*Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*). A predição da estrutura secundária dos peptídeos demonstrou que a maioria dos peptídeos (19 dos

30 peptídeos) apresenta estruturação em α -hélices, com até 75% da molécula envolvida neste tipo de estrutura.

Em 1999 foi relatado pela primeira vez um fragmento da Hb, isolado de um órgão, apresentando atividade antimicrobiana. Ele foi isolado no tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus* e corresponde a um peptídeo pertencente à cadeia α da hemoglobina bovina, compreendendo os aminoácidos 33 até 61 (**Tabela 1**) (FOGACA *et al.*, 1999). Sua forma sintética com a carboxila amidada apresentou atividade antimicrobiana contra diversas bactérias Gram-positivas e fungos.

Posteriormente foi isolado do tubo digestivo do carrapato *Ornithodoros moubata* dois fragmentos da cadeia α da Hb de coelho com atividade antimicrobiana (**Tabela 1**) (NAKAJIMA *et al.*, 2003). Foi demonstrado que esses dois fragmentos, que envolvem os aminoácidos 1 a 32 e 3 a 32, possuem atividade contra *Staphylococcus aureus*. A descrição de hemocidinas no tubo digestivo de espécies pertencentes às duas famílias de carrapatos (Ixodidae e Argasidae) sugere uma importante participação desses peptídeos na defesa do trato digestivo desses organismos (NAKAJIMA *et al.*, 2003).

O primeiro trabalho a relatar a presença de hemocidinas no organismo humano foi publicado em 2003, utilizando peptídeos produzidos na placenta (LIEPKE *et al.*, 2003). Neste trabalho foram isolados dois peptídeos provenientes da cadeia β da Hb (111-146) e γ da Hb fetal (130-146) com atividade contra diversas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (**Tabela 1**). O fragmento da cadeia β ainda foi capaz de se ligar ao lipopolissacarídeo (LPS), sugerindo uma capacidade de reduzir a quantidade de endotoxinas liberadas durante a destruição de microorganismos.

Logo em seguida foram encontradas hemocidinas no sistema reprodutivo feminino, mais especificamente no sangue menstrual (MAK *et al.*, 2004). O conceito por trás dessa iniciativa inusitada foi a busca por um local no organismo humano que apresentasse as condições ideais para a produção de hemocidinas e também sofresse o ataque de microorganismos. O trato reprodutivo feminino, especialmente a vagina, sofre descargas de grandes quantidades de Hb durante o período menstrual, além de apresentar pH ácido, que proporciona a dissociação das cadeias da Hb, facilitando a ação de proteinases. Além disso, esse é um local sob constante risco de

infecções. Foram isoladas 44 hemocidinas, 37 destas pertencentes à cadeia α da Hb e o restante da cadeia β , e todas apresentando atividade contra *E. coli* (**Tabela 1**).

Em 2005 também foram descritas novas hemocidinas no tubo digestivo de carrapatos, desta vez da espécie *Dermacentor variabilis* (SONENSHINE *et al.*, 2005). Neste trabalho foram parcialmente purificados peptídeos derivados das cadeias α e β com atividade contra *M. luteus*, porém sua sequência não foi determinada.

Na literatura há poucas descrições do mecanismo de ação das hemocidinas. O fragmento 33 até 61 da cadeia α da Hb bovina, isolado do tubo digestório do carrapato *R. (Boophilus) microplus* foi alvo de um estudo realizado para correlacionar a estrutura com a função antimicrobiana do peptídeo (SFORCA *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2007). Foi descrito que essa hemocidina apresenta a capacidade de permeabilizar a membrana de *M. luteus* e de *C. albicans*. Além disso, foi demonstrado que esse peptídeo apresenta uma conformação aleatória quando em água, não interagindo com membranas zwitteriônicas (neutras). Essa hemocidina foi capaz de interagir com membranas de dodecil sulfato de sódio (SDS) carregadas negativamente, adquirindo uma estrutura organizada em α -hélices, com sua região N-terminal permanecendo na face externa da micela, exposta ao solvente, enquanto a região C-terminal fica inserida na micela de SDS.

Outro trabalho buscando elucidar o mecanismo de ação das hemocidinas foi realizado com o fragmento 115 a 146 da cadeia β da Hb humana, isolado previamente do fluxo menstrual (MAK *et al.*, 2007). Essa hemocidina foi capaz de causar a permeabilização da membrana de *E. coli* em pH 4,4, mantendo sua atividade na presença de 0,15 M de NaCl, além de potencializar a ação de defensina, cathelicidina e lisozima humanas. No entanto, a atividade antimicrobiana foi inibida na presença de cátions divalentes (Mg^{+2} e Ca^{+2}), o que é característico para peptídeos antimicrobianos catiônicos (POWERS e HANCOCK, 2003).

Recentemente foi isolado um peptídeo correspondente aos aminoácidos 33 até 93 da cadeia α da Hb presente no trato reprodutivo feminino (**Tabela 1**). Esse peptídeo foi ativo contra *E. coli* e apresentou estruturação em α -hélice. Essa hemocidina foi empregada para o tratamento de infecção vaginal em camundongos por *E. coli*. O grupo tratado com o peptídeo apresentou uma menor inflamação do tecido epitelial, refletindo uma redução na colonização pela bactéria (DENG *et al.*, 2009).

Os dados da literatura nos permitem correlacionar a atividade antimicrobiana das hemocidinas com o seu conteúdo de aminoácidos básicos e hidrofóbicos e a capacidade desses peptídeos formarem estruturas do tipo alfa α -hélice, sugerindo que o mecanismo de ação dessas moléculas seja a desestabilização de membranas lipídicas (MAK *et al.*, 2000; SFORCA *et al.*, 2005; NEDJAR-ARROUME *et al.*, 2008). Em todos os casos, a atividade antimicrobiana das hemocidinas tem se mostrado eficaz na faixa de concentrações micromolares contra diversos microrganismos, com toxicidade reduzida às células eucarióticas, sugerindo uma participação desses compostos na resposta inata de diversos organismos (LIEPKE *et al.*, 2003).

Nos carrapatos, o fato de fragmentos oriundos da digestão da hemoglobina apresentarem atividade antimicrobiana sugere uma importante participação dessas moléculas na resposta imune do tubo digestivo. Em artrópodes, a resposta local do tubo digestivo ao ataque de patógenos tem se mostrado o principal mecanismo de defesa contra patógenos que utilizam a rota oral como via para a infecção (LIEHL *et al.*, 2006).

2 Objetivos

Como foi apresentado, a hemoglobina é uma rica fonte de peptídeos com atividade antimicrobiana. No intuito de demonstrar que esses peptídeos antimicrobianos estão presentes no tubo digestório do carrapato *R. (Boophilus) microplus*, com possível participação na defesa contra microorganismos, traçamos os seguintes objetivos:

1. Purificar e identificar hemocidinas presentes no tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus*.
2. Identificar as classes das proteases digestivas de *R. (Boophilus) microplus* responsáveis pela geração das hemocidinas purificadas.

3 Material e métodos

3.1 Carrapatos

Os carrapatos *R. (Boophilus) microplus* utilizados nos experimentos foram provenientes da linhagem Porto Alegre (RS), a qual é livre de *Babesia spp.* Os carrapatos foram alimentados em bezerros da raça Holstein-Friesian. As fêmeas teleóginas ingurgitadas, com cerca de dois a sete dias após a queda do hospedeiro, foram utilizadas para a dissecação dos tubos digestórios.

3.2 Dissecação dos tubos digestórios

Para a obtenção do tubo digestório, primeiramente cada exemplar de *R. (Boophilus) microplus* foi pressionado na região anterior com o auxílio de uma pinça. A cutícula anterior foi cuidadosamente cortada, evitando-se dessa forma o rompimento dos órgãos internos. O animal então foi imerso em tampão fosfato salino estéril (PBS, 8 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mM de KH_2PO_4 , 137 mM de NaCl e 2,7 mM de KCl, pH 7,2) e os órgãos foram empurrados para fora com o auxílio de uma pinça. Em seguida, o tubo digestório foi separado dos demais órgãos internos e transferido para tubos de microcentrifuga contendo ácido acético 1,6 M (item 3.5.1) ou tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 contendo um coquetel de inibidores de proteases (item 3.5.2) e mantidos em banho de gelo. Após a finalização da dissecação, os tubos digestórios foram armazenados a -20°C até serem processados.

3.3 Sangue bovino

A coleta do sangue bovino foi gentilmente realizada por veterinários da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

O sangue foi coletado por punção jugular em tubo à vácuo sem adição de anticoagulantes. O sangue foi rapidamente diluído em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 (1:2, v/v) e armazenado a -20°C até a sua utilização.

3.4 Determinação da concentração de proteínas

A concentração das proteínas presentes nas amostras de tubo digestório e de sangue foi determinada por Comassie Blue G seguindo o protocolo de (BRADFORD, 1976).

Resumidamente, 190 µL do reagente de Bradford (Sigma) foram incubados com 10 µL de água destilada (controle) ou com 10 µL de diluições seriadas de uma solução de albumina bovina (1; 0,8; 0,4; 0,2 mg/mL, Sigma) para a construção de uma curva-padrão. Após 5 minutos de incubação, a absorbância a 595 nm foi mensurada em um leitor de ELISA (Labsystems iEMS Analyzer). As amostras de tubo digestório e de sangue foram submetidas ao mesmo procedimento e a concentração protéica das amostras calculada a partir da equação da reta da curva-padrão. Todas as amostra foram analisadas em quadruplicata.

3.5 Obtenção das amostras

3.5.1 Homogeneização dos tubos digestórios sem inibidores de proteases

Duas preparações foram realizadas, a primeira contendo os tubos digestórios de 26 fêmeas, e a segunda, 40. Os tubos digestórios, ainda contendo o repasto sanguíneo, foram dissecados e a estes foram adicionados 15 e 30 mL de ácido acético 1,6 M gelado, respectivamente. Em seguida, as preparações foram homogeneizadas em um vórtex e acidificadas até pH 3,5 com ácido acético absoluto. Para rompimento dos tecidos e das células, os extratos foram processados em um homogeneizador Dounce mantido no gelo. Os extratos ácidos de tubo digestórios foram submetidos à sonicação utilizando 3 ciclos de 30 segundos cada (30% de amplitude) em um sonicador (Sonics and Materials Inc., modelo Vibracell). Os sobrenadantes obtidos pela centrifugação a 5.000 x g por 30 minutos a 4 °C foi utilizado para a purificação dos peptídeos antimicrobianos.

3.5.2 Homogeneização dos tubos digestórios com inibidores de proteases

Os tubos digestórios de 51 fêmeas, ainda contendo o repasto sanguíneo, foram dissecados e acondicionados três a três em tubos de microcentrífuga contendo 500 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 gelado e os inibidores de proteases, pepstatina (10 µM), trans-epoxysuccinyl-L-leucyl-amido-4-guanidinobutano (E-64, 10 µM) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 50 µM). As amostras foram mantidas a -20 °C até o processamento.

Para a extração dos peptídeos, primeiramente os tubos digestórios foram homogeneizados com o auxílio de um pistilo de poliestireno. Em seguida o extrato foi transferido para um homogeneizador Dounce mantido no gelo e novamente homogeneizado. O extrato foi então submetido à sonicação, como descrito no item 3.5.1.

3.5.3 Homogeneizacão do sangue bovino sem inibidores de proteases

O equivalente a 5 mL de sangue bovino previamente diluído em tampão acetato de sódio (item 3.3), foi homogeneizado em um homogeneizador Dounce mantido no gelo e submetido à sonicação como anteriormente descrito. O sobrenadante obtido foi então incubado por 1h a 37 °C para promover ação das proteases *in vitro*. O extrato foi em seguida centrifugado a 5.000 x g por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante resultante foi utilizado para a pré-purificação dos peptídeos (item 3.6.2).

3.6 Pré-purificação dos peptídeos antimicrobianos

3.6.1 Pré-purificação dos peptídeos antimicrobianos dos tubos digestórios de carrapatos homogeneizados sem inibidores de proteases

Aos dois extratos ácidos obtidos, conforme descrito no item 3.5.1, foi adicionado ácido trifluoracético (TFA) para a concentração final de 0.046% atingindo um pH equivalente a 2,5. Os extratos foram pré-purificados em três colunas Sep-Pak C18 (360 mg, Waters) acopladas e previamente equilibradas em água acidificada (TFA 0,046%). A eluição dos peptídeos e das proteínas foi realizada com soluções de acetonitrila (ACN) a 5%, 40% e 80% em água acidificada (ácido trifluoroacético 0.046%).

As frações eluídas com 5%, 40% e 80% de ACN em água acidificada, provenientes do extrato obtido de 26 tubos digestórios foram concentradas em uma centrifuga a vácuo (Savant) para remover o solvente orgânico. Essas três frações foram reconstituídas em 6 mL de água ultrapura acidificada e armazenadas a -20 °C até serem utilizadas para a purificação dos peptídeos antimicrobianos (item 3.7)

A partir do extrato obtido de 40 tubos digestórios, somente a fração eluída com 40% de ACN foi concentrada em uma centrifuga a vácuo (Savant), reconstituída

em 10 mL de água ultrapura e então processada em um ultrafiltro com *cut off* de 10.000 Da (Millipore). A fração peptídica (filtrada) foi concentrada em uma centrífuga a vácuo (Savant), reconstituída em água ultrapura acidificada e armazenada a -20 °C até ser utilizada para a purificação dos peptídeos antimicrobianos (item 3.7).

3.6.2 Pré-purificação dos peptídeos dos tubos digestórios de carrapatos homogeneizados na presença de inibidores de proteases e do sangue bovino

Primeiramente, foi determinada a concentração protéica das amostras obtidas em 3.5.2 e 3.5.3 como descrito no item 3.4, diluídas em água ultrapura para a concentração de 20 mg/mL e mantidas a 4 °C durante todo o processo de purificação.

As amostras foram, então, processadas em um ultrafiltro com *cut off* de 10.000 Da (Millipore) e as frações peptídicas (filtradas) foram concentradas em uma centrífuga a vácuo (Savant). Após reconstituição das amostras em água ultrapura acidificada, as mesmas foram estocadas a -20 °C até serem utilizadas para a purificação dos peptídeos antimicrobianos (item 3.7).

3.7 Purificação dos peptídeos antimicrobianos

As amostras obtidas como descrito no item 3.6 foram submetidas à cromatografia de fase reversa em um cromatógrafo líquido de alto desempenho (RP-HPLC) (LC 10, Shimadzu) utilizando uma coluna semi-preparativa C18 (5 µm, 10 mm x 250 mm, Vydac). Para a eluição dos peptídeos foi utilizado um gradiente linear de 2% a 60% de ACN em água acidificada, em 120 minutos, sob um fluxo de 1,5 mL/min, exceto para a fração de 80% de ACN (item 3.6.1), cujo gradiente foi de 20 a 80% de ACN, com os mesmos parâmetros descritos. A absorbância do eluente foi monitorada a 225 nm. As frações coletadas foram concentradas em uma centrífuga

à vácuo (Savant), ressuspendidas em 100 µL de água ultra pura e estocadas a -20 °C até sua utilização.

O segundo passo de purificação foi realizado no mesmo equipamento, sendo utilizada uma coluna analítica C18 (5 µm, 10 mm x 250 mm, Vydac). Para a eluição dos peptídeos foram utilizados gradientes lineares de ACN em água acidificada adequados para cada um dos peptídeos a serem isolados. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min e a absorbância do eluente foi monitorada à 225 nm.

3.8 Ensaios de atividade antimicrobiana

Os microorganismos usados nos ensaios de atividade antimicrobiana foram: a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (cepa SBS363, cedida pelo Dr. Philippe Bulet do CNRS, Estratsburgo, França); a bactéria gram-positiva *Micrococcus luteus* (obtida da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo); e a levedura *Candida albicans* (cepa MDM8 obtida do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

Para o ensaio contra bactérias, 10 µL de cada uma das frações cromatográficas foram adicionados a 90 µL de uma suspensão de 10^7 células/mL diluída 400 vezes em meio de cultura PB (0,5% NaCl, 1% peptona, Sigma), colocados em poços de uma placa de 96 poços. Como controle, as bactérias foram incubadas com 10 µL de água estéril. Após 18 horas de incubação a 30 °C sob agitação, a densidade óptica a 595 nm foi determinada em um leitor de ELISA (Labsystems iEMS Analyzer).

Para o ensaio contra leveduras, 20 µL de cada uma das frações cromatográficas foram adicionados a 80 µL de uma suspensão de 10^7 células/mL de *C. albicans*, diluída 400 vezes em meio de cultura PDB (0,012 g/mL, pH 5,1, Sigma) colocados em poços de uma placa de 96 poços. Como controle, as leveduras foram incubadas com 20 µL de água estéril. Após 18 horas de incubação a 30 °C em câmara úmida, a densidade óptica a 595 nm foi determinada em um leitor de ELISA (Labsystems iEMS Analyzer).

Em ambos os ensaios, uma amostra foi considerada como tendo atividade antimicrobiana quando apresentou um valor de densidade óptica pelo menos metade do valor da absorbância (ABS) do controle

3.9 Espectrometria de massas por eletrospray (ESI-MS)

As análises de massa molecular foram realizadas por espectrometria de massas do tipo *spray* de elétrons, utilizando-se o aparelho da Thermo Finnigan, modelo LCQ Duo™ (ThermoQuest). A calibração do equipamento foi realizada com soluções de cafeína ($m/z = 192,5$) e MRFA ($m/z = 524,3$) e Ultramark (m/z com valores de 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822 e 1922). Todas as amostras foram previamente solubilizadas em solução A (5% de ACN contendo 0,2% de ácido fórmico) e analisadas em modo positivo (capilar de 1,8 KV e cone de 76v). A coleta de dados foi realizada no modo *full scan* (m/z de 300 a 2000) com o programa Xcalibur (versão 2.0, Thermo Electron Corp.).

3.9.1 Determinação das massas moleculares dos peptídeos

Um μL de cada uma das frações cromatográficas (item 3.7) foi diluído em 10 μL de solução A e aplicadas diretamente no espectrômetro de massas. Após a coleta de dados, estes foram analisados no programa BioWorks Browser (versão 3.3, Thermo Electron Corp.) para a determinação as massas moleculares dos peptídeos presentes na amostra.

3.9.2 Seqüenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas *in tandem* acoplado à HPLC (LC-MS/MS)

Para o seqüenciamento dos peptídeos, primeiramente estes foram submetidos à redução de suas pontes de dissulfeto com 9 mM de dithiothreitol (DTT) e 4 M de uréia, alquilados com 30 mM de iodoacetoamida e digeridos com tripsina (E.C. 3.4.21.4, Sigma, 1,25 µg) a 37° por 12 horas (STONE e WILLIAMS, 1996). Para a dessalinização, as amostras foram processadas em uma micro-coluna (*Zip-tip*) montada em nosso laboratório com a resina C18 (5 µm, Vydac), sendo utilizada ACN 80% em água acidificada para a eluição dos fragmentos trípticos (ASSUNÇÃO, 2005).

Para a remoção do solvente orgânico, as amostras foram concentradas em uma centrífuga à vácuo (Savant) e reconstituídas em solução A. Os peptídeos foram analisados no espectrômetro de massas descrito anteriormente, acoplado à um nano-HPLC (UltiMate, LC Pakings) utilizando-se uma coluna capilar (0.1 mm x 150 mm) montada em nosso laboratório com a resina C18 (5 µm, Vydac) seguindo a metodologia descrita por (ASSUNÇÃO, 2005).

O gradiente utilizado para a eluição dos peptídeos foi de 5-80% de ACN em ácido fórmico 0,2% em 60 min, com fluxo de 250 µL/min. Todas as análises dos dados de espectrometria de massas foram realizadas utilizando o programa Bioworks Browser versão 3.3 (Thermo Electron Corp.) e a ferramenta de busca por similaridade SEQUEST[®] contra o banco de dados públicos do NCBI (nr_protein).

3.10 Ensaio de atividade proteolítica do tubo digestório

Tubos digestórios foram dissecados como descrito no item 3.2 e individualmente coletados em tubos de microcentrífuga contendo 100 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5. Os tubos digestórios foram homogeneizados com um pistilo de poliestireno. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 14 000 x g a 4 °C por 10 min. Alíquotas de 4 µL do sobrenadante foram retiradas e diluídas em 1 mL

de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5. Todo esse procedimento foi realizado mantendo as amostras no gelo.

Para mensurar a atividade proteolítica, foram utilizadas soluções a 10 μ M dos substratos fluorogênicos ZFR-AMC (Sigma), específico para cisteíno-proteinases, e SF-29-35 (ABZ-LERMFLSQ-EDDnp), que contém os aminoácidos 29 a 35 da cadeia alfa da hemoglobina bovina. Este substrato é clivado por uma aspártico proteinase digestiva de *R. (Boophilus) microplus* (CRUZ, 2009). As fluorescências das reações foram determinadas em um fluorímetro (Labsystems, Fluorskan Ascent FL) em intervalos de 5 min durante 50 min a 30 °C. O comprimento de onda de excitação foi de 330 nm e o comprimento de onda de emissão foi de 420 nm. As leituras foram realizadas em quadruplicata e em três amostras biológicas. Para o cálculo da atividade proteolítica, foi utilizado o valor de inclinação da reta, produto da regressão linear das leituras das emissões ao longo do tempo, com valor de confiança acima de 0,95.

Foram utilizados os inibidores de proteases pepstatina e E-64 na concentração final de 10 μ M e EDTA na concentração final de 50 μ M.

3.11 Análise das características físico-químicas dos peptídeos

Foram utilizadas ferramentas de bioinformática para a determinação de alguns parâmetros físico-químicos das hemocidinas. Os parâmetros escolhidos foram a massa molecular teórica, a porcentagem de resíduos hidrofóbicos e o ponto isoelétrico, utilizando o programa ProtParam (ExPASy) (WILKINS *et al.*, 1999). Também foi determinada a porcentagem de resíduos envolvidos na formação da alfa hélices através do servidor Network Protein Sequence Analysis (NPSA) do Pôle BioInformatique Lyonnais (PBIL) (COMBET *et al.*, 2000), utilizando a predição consenso dos diferentes algoritmos disponíveis (SOPM, SOPMA, HNN, MLRC, DPM, DSC, GOR I, GOR II, GOR IV, PHD, PREDATOR e SIMPA96).

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas através do programa GraphPad Prism[®] para Windows usando One-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Utilizou-se o valor de significância de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Detecção e purificação da atividade antimicrobiana dos tubos digestivos homogeneizados sem inibidores de protease

4.1.1 Frações 5, 40 e 80% de ACN do extrato de 26 fêmeas

O extrato dos tubos digestórios de 26 fêmeas foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana contra *M. luteus*, *E. coli* e *C. albicans*. Este extrato, após ser pré-purificado em colunas Sep-Pak, produziu as frações de 5, 40 e 80% de ACN. Estas frações foram submetidas à HPLC, e todas as frações cromatográficas foram testadas contra esses três microorganismos.

A cromatografia da fração de 5% apresentou um perfil com poucos picos (**Figura 2**). Não foi detectada a atividade antimicrobiana contra os três microorganismos testados em nenhuma das frações cromatográficas.

Figura 2: Purificação por RP-HPLC da fração eluída com 5% de ACN da Sep-Pak, proveniente do extrato de tubo digestório de 26 fêmeas de *R. (Boophilus) microplus*. Gradiente de 2% a 60% de ACN em 120 minutos em coluna semi-preparativa C18. Nenhuma fração apresentou atividade antimicrobiana.

Após a cromatografia da fração de 40% (**Figura 3**), foi detectada a atividade antimicrobiana contra *C. albicans* em diversas das frações eluídas acima da concentração de 30% de ACN (**Figura 3A**). Algumas dessas frações também apresentaram atividade contra *E. coli* (**Figura 3B**), porém nenhuma fração apresentou inibição o crescimento de *M. luteus*.

Após cromatografia da fração de 80%, (**Figura 4**) várias frações apresentaram atividade contra *C. albicans* (**Figura 4A**), e alguma destas também inibiram o crescimento de *E. coli* (**Figura 4B**), também não sendo detectada atividade contra *M. luteus*.

Diversas frações com atividade antimicrobiana, eluídas da cromatografia da fração 40%, foram submetidas à análise de ESI-MS. O perfil de íons obtido foi muito complexo (dados não apresentados), mostrando que as frações coletadas apresentavam um baixo grau de pureza. Além disso, algumas frações foram selecionadas e submetidas a um segundo passo de purificação em HPLC, em coluna analítica, e novamente as frações cromatográficas com atividade antimicrobiana foram analisadas por ESI-MS (dados não mostrados). O perfil de íons obtido mostrou-se muito similar ao perfil das frações antes da segunda HPLC (dados não mostrados). Foi então elaborado um protocolo de purificação das hemocididinas introduzindo uma etapa de filtração antes da cromatografia de fase reversa. Os resultados estão apresentados a seguir.

Figura 3: Purificação por RP-HPLC da fração eluída com 40% de ACN da Sep-Pak, proveniente do extrato de tubo digestório de 26 fêmeas de *R. (Boophilus) microplus*. Gradiente de 2% a 60% de ACN em 120 minutos em coluna semi-preparativa C18. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans* (A) ou *E. coli* (B).

Figura 4: Purificação por RP-HPLC da fração eluída com 80% de ACN da Sep-Pak, proveniente do extrato de tubo digestório de 26 fêmeas de *R. (Boophilus) microplus*. Gradiente de 20% a 80% de ACN em 120 minutos em coluna semi-preparativa C18. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans* (A) ou *E. coli* (B).

4.1.2 Fração de 40% de ACN filtrada do extrato de 40 fêmeas

A cromatografia de fase reversa realizada para a separação dos peptídeos do homogeneizado de tubos digestórios de *R. (Boophilus) microplus* dissecados na ausência de inibidores de proteases resultou em um cromatograma complexo, apresentando diversas frações com atividade anti-*Candida albicans* (**Figura 5**). As frações ativas, eluídas da coluna semi-preparativa em concentrações de ACN superiores a 30%, foram analisadas por espectrometria de massas (**Tabela 2**).

Figura 5: Purificação por RP-HPLC da fração eluída com 40% de ACN da Sep-Pak e filtrada em 10.000 Da, proveniente do extrato de tubo digestório de 40 fêmeas de *R. (Boophilus) microplus*. Gradiente de 2% a 60% de ACN em 120 minutos em coluna semi-preparativa C18. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. Números representam o tempo de retenção das frações de onde peptídeos foram identificados.

Tabela 2: Massas moleculares, obtidas por ESI-MS, das frações da RP-HPLC que apresentaram atividade antimicrobiana (**Figura 5**), proveniente do extrato de tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus* processado sem inibidores de proteases.

Fração	Massa molecular
C ₁₇₅	2.323 Da, 3.404 Da, 4.178 Da
C ₁₇₇	2.480 Da
C ₁₇₈	2.907 Da, 4.919 Da
C ₁₈₀	3.518 Da, 2.068 Da, 2.114 Da
C ₁₈₄	4.864 Da, 5.348 Da, 5.981 Da
C ₁₈₅	6.317 Da, 6.759 Da, 7.101 Da
C ₁₈₆	6.617 Da, 6.759 Da, 7.101 Da
C ₁₈₇	6.973 Da, 6.617 Da, 6.162 Da
C ₁₈₉	5.088 Da, 4.788 Da, 5.480 Da
C ₁₉₀	8.419 Da, 5.288 Da, 6.805 Da
C ₁₉₂	3.587 Da, 8.478 Da, 5.201 Da
C ₁₉₃	9.721 Da, 9.934 Da, 10.762 Da
C ₁₉₄	10.834 Da, 9.114 Da, 10.746 Da
C ₁₉₅	11.285 Da, 11.485 Da
C ₁₁₀₁	4.238 Da
C ₁₁₀₂	4.326 Da
C ₁₁₀₇	15.054 Da
C ₁₁₁₁	5.352 Da

Através da análise dos espectrogramas das frações anti-*C. albicans*, denominadas C₁101, C₁102, C₁107 e C₁111, foram determinadas as massas moleculares de 4.238 Da (**Figura 6A**), 4.326 Da (**Figura 6B**), 15.054 Da (**Figura 6C**) e 5.352 Da (**Figura 6D**), respectivamente.

Figura 6: Perfil de ESI-MS das frações antimicrobianas isoladas do conteúdo intestinal de *R. (Boophilus) microplus* após a primeira RP-HPLC: **(A)** C₁101; **(B)** C₁102; **(C)** C₁107; **(D)** C₁111.

(Continua)

Figura 6: Perfil de ESI-MS das frações antimicrobianas isoladas do conteúdo intestinal de *R. (Boophilus) microplus* após a primeira RP-HPLC: **(B)** C₁₀₂; **(C)** C₁₀₇.

(Continua)

Figura 6: Perfil de ESI-MS das frações antimicrobianas isoladas do conteúdo intestinal de *R. (Boophilus) microplus* após a primeira RP-HPLC: **(D)** C₁₁₁.

Os peptídeos contidos nas frações C₁₁₀₁, C₁₁₀₂, e C₁₁₁₁ também foram submetidos ao seqüenciamento de aminoácidos por LC-MS/MS. As seqüências obtidas correspondem a fragmentos da cadeia α da hemoglobina bovina: o peptídeo de massa molecular de 4.238 Da (fração C₁₁₀₁) compreende aos aminoácidos 103 a 141; o peptídeo de massa 4.326 Da (fração C₁₁₀₂) compreende aos aminoácidos 102 a 141; o peptídeo de massa 5.352 Da (fração C₁₁₁₁) compreende aos aminoácidos 93 a 141 (**Figura 7A**). O peptídeo contido na fração C₁₁₀₇, com massa molecular de 15.054 Da (**Figura 6C**), corresponde à cadeia α da hemoglobina bovina, conforme dados obtidos pelo seqüenciamento desse peptídeo por LC-MS/MS.

As frações C₁₈₀, C₁₉₂, C₁₉₃ e C₁₉₄ (**Figura 5**) não estavam satisfatoriamente puras para o seqüenciamento (**Tabela 2**), e foram submetidas a um segundo passo de purificação em RP-HPLC em coluna analítica.

O cromatograma resultante da separação dos peptídeos da fração C₁₈₀ apresentou dois picos majoritários, sendo detectada atividade antimicrobiana

somente na fração C₁₈₀C₂₃₈ (**Figura 8A**). A análise dessa fração por espectrometria de massas revelou a presença de duas moléculas de massas 2.068 Da e 2.114 Da (**Figura 8B e 8C**). Como a análise da fração não ativa, denominada C₁₈₀C₂₃₉, revelou a presença de um único peptídeo de massa molecular de 2.114 Da (**Figura 8D**), foi possível concluir que o peptídeo com massa molecular de 2.068 Da era o responsável pela atividade antimicrobiana. O íon correspondente a esse peptídeo foi processado para o seqüenciamento de aminoácidos e a análise da seqüência revelou se tratar do fragmento 127 a 145 da cadeia α da hemoglobina bovina (**Figura 7B**).

O segundo passo da purificação por HPLC da fração C₁₉₂ produziu um cromatograma com três picos majoritários, com atividade antimicrobiana detectada nas frações correspondentes aos picos (**Figura 9A**). As frações foram analisadas por ESI-MS, sendo que a análise da fração C₁₉₂C₂₃₈ revelou a presença de uma molécula com massa molecular de 3.587 Da (**Figura 9B**) satisfatoriamente pura para o seqüenciamento. A seqüência obtida corresponde aos aminoácidos 109 ao 142 da cadeia α da hemoglobina bovina (**Figura 7A**).

O segundo passo de purificação em HPLC da fração C₁₉₃ produziu um cromatograma com um pico de absorbância (C₁₉₃C₂₄₃) bem definido, com atividade contra *C. albicans* (**Figura 10A**). A análise desta fração por espectrometria de massas revelou a presença de duas moléculas de massas moleculares de 9.722 Da e 9.935 Da (**Figura 10B e 10C**). O processamento para o seqüenciamento desta fração resultou em duas seqüências, a primeira correspondendo aos aminoácidos 3 a 94 e a segunda correspondendo aos aminoácidos 1 a 94 da cadeia alfa da hemoglobina bovina (**Figura 7A**).

A	Hbα (15.054 Da)	V L S A A D K G N V K A A W G K V G G H A A E Y G A E A L E R M F L S F P T T K T Y F P H F D L S H G S A Q V K G H G A K V A A A L T K A V
	1-94 (9.934 Da)	V L S A A D K G N V K A A W G K V G G H A A E Y G A E A L E R M F L S F P T T K T Y F P H F D L S H G S A Q V K G H G A K V A A A L T K A V
	1-87 (9.114 Da)	V L S A A D K G N V K A A W G K V G G H A A E Y G A E A L E R M F L S F P T T K T Y F P H F D L S H G S A Q V K G H G A K V A A A L T K A V
	3-94 (9.721)	S A A D K G N V K A A W G K V G G H A A E Y G A E A L E R M F L S F P T T K T Y F P H F D L S H G S A Q V K G H G A K V A A A L T K A V
	Hbα (15.054 Da)	E H L D D L P G A L S E L S D L H A H K L R V D P V N F K L L S H S L L V T L A S H L P S D F T P A V H A S L D K F L A N V S T V L T S K Y R
	1-94 (9.934 Da)	E H L D D L P G A L S E L S D L H A H K L R V D
	1-87 (9.114 Da)	E H L D D L P G A L S E L S D L H
	3-94 (9.721)	E H L D D L P G A L S E L S D L H A H K L R V D
		98-114 (1.876 Da) <u>F K L L S H S L L V T L A S H L P S</u>
	93-141 (5.352 Da)	V D P V N F K L L S H S L L V T L A S H L P S D F T P A V H A S L D K F L A N V S T V L T S K Y R
B		102-141 (4.326 Da) S H S L L V T L A S H L P S D F T P A V H A S L D K F L A N V S T V L T S K Y R
		103-141 (4.238 Da) H S L L V T L A S H L P S D F T P A V H A S L D K F L A N V S T V L T S K Y R
		107-141 (3.787 Da) V T L A S H L P S D F T P A V H A S L D K F L A N V S T V L T S K Y R
		109-141 (3.587 Da) L A S H L P S D F T P A V H A S L D K F L A N V S T V L T S K Y R
	Hbβ (15.954 Da)	M L T A E E K A A V T A F W G K V K V D E V G G E A L G R L L V V Y P W T Q R F F E S F G D L S T A D A V M N N P K V K A H G K K V L D S F S N
	Hbβ (15.954 Da)	G M K H L D D L K G T F A A L S E L H C D K L H V D P E N F K L L G N V L V V L A R N F G K E F T P V L Q A D F Q K V V A G V A N A L A H R Y
		127-145 (2.068 Da) A D F Q K V V A G V A N A L A H R Y

Figura 7: Hemocidinas identificadas por LC-MS/MS provenientes da digestão da cadeia α **(A)** e β **(B)** da hemoglobina bovina. Em sublinhado o peptídeo identificado a partir da purificação de tubos digestórios homogeneizados na presença de inibidores de proteases.

Figura 8: (A) Perfil de RP-HPLC da fração C₁₈₀. Gradiente de 30% a 40% de ACN em 60 minutos em coluna analítica C18. Em sombreado, frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. (B) Série de íons do peptídeo de massa molecular 2.068 Da presente na fração C₁₈₀C₂₃₈. (C) Série de íons do peptídeo de massa molecular 2.114 Da presente na fração C₁₈₀C₂₃₈. (D) Série de íons do peptídeo de massa molecular 2.114 Da presente na fração C₁₈₀C₂₃₉.

(Continua)

Figura 8: (C) Série de íons do peptídeo de massa molecular 2.114 Da presente na fração C₁80C₂38. **(D)** Série de íons do peptídeo de massa molecular 2.114 Da presente na fração C₁80C₂39.

Figura 9: (A) Perfil de RP-HPLC da Fração C_{192} . Gradiente de 38% a 45% de ACN em 60 minutos em coluna analítica C18. Em sombreado frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. **(B)** Perfil de ESI-MS da fração $C_{192}C_{238}$.

Figura 10: (A) Perfil de RP-HPLC da fração C_{193} . Gradiente de 35% a 45% de ACN em 60 minutos em coluna analítica C18. Em sombreado frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. (B) Série de íons do peptídeo de massa molecular de 9.722 Da presente na fração $C_{193}C_{243}$. (C) Série de íons do peptídeo de massa molecular de 9.935 Da presente na fração $C_{193}C_{243}$.

(Continua)

Figura 10: (C) Série de íons do peptídeo de massa molecular de 9.935 Da presente na fração C₁93C₂43.

O segundo passo de purificação em HPLC da fração C₁94 por HPLC produziu um cromatograma com dois picos majoritários, com atividade detectada nas frações C₁94C₂37 e C₁94C₂38 (**Figura 11A**). A análise destas frações por espectrometria de massas revelou a presença de massas moleculares 9.114 Da (**Figura 11B**) e 3.787 Da (**Figura 11C**), respectivamente. A sequência do peptídeo de 9.114 Da foi identificada como compreendendo os aminoácidos 1 a 87 da cadeia alfa da hemoglobina bovina (**Figura 7A**), enquanto a sequência do peptídeo de 3.787 Da foi identificado como compreendendo os aminoácidos 107 a 141, também da cadeia alfa (**Figura 7A**).

Figura 11: **(A)** Perfil da segunda RP-HPLC da fração C_{194} . Gradiente de 38% a 45% de ACN em 60 minutos em coluna analítica C18. Em sombreado frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. **(B)** Perfil de ESI-MS da fração $C_{194}C_{237}$. **(C)** Perfil de ESI-MS da fração $C_{194}C_{238}$.

(Continua)

Figura 11: (C) Perfil de ESI-MS da fração C₁₉₄C₂₃₈.

4.2 Purificação e identificação dos peptídeos antimicrobianos do tubo digestório de carrapatos homogeneizados na presença de inibidores de proteases

Para a purificação das hemocidinas processadas fisiologicamente no tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus*, ou seja, hemocidinas produzidas *in vivo*, foi necessário determinar primeiro em que condições as atividades das proteases eram inibidas.

O ensaio de atividade enzimática com substratos para a aspártico proteases e para cisteíno-proteinases, demonstrou uma inibição significativa dessas atividades quanto utilizados os inibidores pepstatina (10 μ M), E-64 (10 μ M) e EDTA (50 μ M) **(Figura 12)**. Esses inibidores foram então utilizados para a inibição das proteases do tubo digestório dos carrapatos, durante o processo de purificação da hemocidinas.

Figura 12: Atividade proteásica de extratos do tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus* utilizando os substratos fluorogênicos SF 29-35 e ZFR-AMC em tampão acetato de sódio pH 4,5, na ausência e na presença dos inibidores: pepstatina e E-64 na concentração final de 10 μ M e EDTA na concentração final de 50 μ M.

* Diferença estatística para os ensaios sem inibidores, $p < 0,05$ One-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni.

A cromatografia de fase reversa do homogeneizado de tubos digestórios homogeneizados na presença dos inibidores de proteases resultou em um perfil com três frações apresentando atividade antimicrobiana contra *C. albicans* (**Figura 13**). As frações ativas foram eluídas acima da concentração de 25% de ACN. As frações C₃₇₃, C₃₉₃ e C₃₁₀₁ foram então submetidas à análise por espectrometria de massas para a identificação das massas moleculares dos peptídeos.

Figura 13: Purificação por RP-HPLC da fração peptídica (filtrada em 10.000 Da) proveniente do extrato de tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus* homogeneizado na presença de Pepstatina (10 μ M), E-64 (10 μ M) e EDTA (50 μ M). Gradiente de 2% a 60% de ACN em 120 minutos em coluna semi-preparativa C18. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. Números representam o tempo de retenção das frações de onde peptídeos foram identificados.

A fração C₃73 apresentou um peptídeo majoritário de massa molecular de 1.876 Da. (**Figura 14A**). Esta fração foi então submetida a um segundo passo de purificação por RP-HPLC no gradiente de 35 a 45% de ACN em água acidificada, em 60 minutos (**Figura 15A**). A análise da atividade anti- *C. albicans* das frações cromatográficas revelou que as frações eluídas entre 41 e 44 % de ACN eram ativas. Todas as frações ativas foram analisadas por espectrometria de massas, resultando em uma massa molecular de 1.876 Da (dados não mostrados). A fração C₃73C₄41 se mostrou satisfatoriamente pura (**Figura 15B**) e então foi processada para o seqüenciamento. O seqüenciamento do peptídeo de 1.876 Da foi identificado como compreendendo os aminoácidos 98 ao 114 da cadeia alfa da hemoglobina bovina (**Figura 7**).

A fração C₃93 apresentou um peptídeo de massa molecular 15.054 Da (**Figura 14B**), idêntica a massa molecular da cadeia α da hemoglobina bovina. A fração C₃101 apresentou a massa molecular de 15.954 (**Figura 14C**), idêntica à

massa molecular da cadeia β da hemoglobina bovina. A confirmação da identidade das duas cadeias foi posteriormente feita pelo seqüenciamento.

Figura 14: Perfil de ESI-MS das frações antimicrobianas da RP-HPLC da fração peptídica (filtrada em 10.000 Da) proveniente do extrato de tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus* homogeneizado na presença de Pepstatina (10 μ M), E-64 (10 μ M) e EDTA (50 μ M): **(A)** C₃73; **(B)** C₃93; **(C)** C₃101.

(Continua)

Figura 14: Perfil de ESI-MS das frações antimicrobianas da RP-HPLC da fração peptídica (filtrada em 10.000 Da) proveniente do extrato de tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus* homogeneizado na presença de Pepstatina (10 μ M), E-64 (10 μ M) e EDTA (50 μ M): **(B)** C₃93; **(C)** C₃101.

Figura 15: (A) Purificação por RP-HPLC da fração C_373 Gradiente de 35% a 45% de ACN em 60 minutos em coluna analítica C18. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. (B) Perfil de ESI-MS da fração C_373C_41 .

4.3 Purificação e identificação dos peptídeos antimicrobianos presentes no sangue bovino

O mesmo protocolo de purificação utilizado na identificação dos peptídeos purificados do extrato de tubos digestórios com inibidores de proteases foi utilizado para identificar as hemocidinas que poderiam estar presentes no sangue bovino.

O perfil cromatográfico obtido apresentou uma complexidade bem menor que os obtidos pela separação dos peptídeos dos tubos digestórios dos carrapatos, com apenas uma fração apresentando atividade antimicrobiana (**Figura 16A**). A fração ativa foi analisada por espectrometria de massas. Esta fração apresentou a massa molecular de 15.054 Da (**Figura 16B**), idêntica à massa molecular da cadeia alfa da hemoglobina bovina, posteriormente confirmada pelo seqüenciamento.

Figura 16: (A) Purificação por RP-HPLC da fração peptídica (filtrada em 10.000 Da) proveniente do sangue bovino. Gradiente de 2% a 60% de ACN em 120 minutos em coluna semi-preparativa C18. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. (B) Perfil de ESI-MS da fração C₅103.

(Continua)

B

Figura 16: (B) Perfil de ESI-MS da fração C₅103.

4.4 Análise da estrutura primária e secundária das hemocidinas

A partir das seqüências primárias obtidas foram avaliados alguns parâmetros físico-químicos das hemocidinas identificadas (**Tabela 3**). Os diversos peptídeos encontrados apresentaram valores de massa molecular entre 1.876 Da e 9.934 Da, sendo nove destes pertencentes a cadeia alfa da hemoglobina e somente um pertencente a cadeia beta.

A porcentagem de resíduos hidrofóbicos nas hemocidinas descritas variou entre 43,8 % e 58,9 %. O ponto isoelétrico dos peptídeos variou entre 6,3 e 8,8, a maioria sendo catiônicos em pH 7,0 (7 peptídeos).

A partir da predição da estrutura secundária feita *in silico*, todos os peptídeos antimicrobianos encontrados podem estar estruturados em α -hélice, sendo a menor estruturação em alfa-hélice foi de 39,5% (Hb α 103-141) e a maior de 79,0% (Hb β 127-145).

Tabela 3: Análise da estrutura primária e secundária dos peptídeos antimicrobianos isolados do conteúdo intestinal de *R. (Boophilus) microplus*. Sublinhado o peptídeo identificado a partir da purificação de tubos digestórios homogeneizados na presença de inibidores de proteases.

Fração	Fragmento	Número de aminoácidos	Massa molecular*	Porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos*	Ponto isoeletrico	Porcentagem de α -hélice+
C₁93C₂43	α 1-94	94	9.934 Da	55,4	6,7	62,8
C₁93C₂43	α 3-94	92	9.721 Da	54,4	6,6	62,0
C₁94C₂37	α 1-87	87	9.114 Da	56,0	6,3	64,4
C₁111	α 93-141	49	5.352 Da	51,0	8,4	67,4
C₁102	α 102-141	40	4.326 Da	47,5	8,3	46,2
C₁101	α 103-141	39	4.238 Da	48,7	8,5	39,5
C₁94C₂38	α 107-141	35	3.787 Da	48,5	8,5	41,2
C₁92C₂38	α 109-141	33	3.587 Da	43,8	8,5	54,5
C₁80C₂39	β 127-145	19	2.068 Da	58,0	8,7	79,0
<u>C₃73C₄41</u>	<u>α 98-114</u>	<u>17</u>	<u>1.876 Da</u>	<u>58,9</u>	<u>8,8</u>	<u>70,6</u>

* calculados utilizando ProtParam disponível no ExPASy <<http://www.expasy.ch/>>.

+ calculados utilizando o servidor NPSA de predição consenso de estruturas secundárias de peptídeos <<http://pbil.univ-lyon1.fr/>>.

5 Discussão

A hemoglobina é uma proteína com alto potencial para a produção de peptídeos com atividade antimicrobiana. Diversos fragmentos das cadeias α e β já foram identificados como possuindo atividade contra bactérias e/ou fungos (**Tabela 3**). As hemocidinas já foram encontradas sendo produzidas por organismos vertebrados (placenta e sangue menstrual humano), invertebrados (tubo digestório de carrapatos) além de terem sido produzidas *in vitro* por hidrólise química ou enzimática (**Tabela 1**). Os artrópodes hematófagos são capazes de adquirir e processar grandes quantidades de hemoglobina, sendo a hidrólise dessa proteína um passo importante para a aquisição de nutrientes.

O carrapato *R. (Boophilus) microplus* é um exemplo de aracnídeo hematófago, extremamente adaptado ao ectoparasitismo e à hematofagia (SONENSHINE, 1991; PAIVA-SILVA *et al.*, 2006). Com o objetivo de avaliar a capacidade do carrapato em produzir hemocidinas durante a digestão da hemoglobina, delineamos uma série de experimentos com o objetivo de detectar a atividade antimicrobiana de extratos de tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus*, e identificar as moléculas responsáveis por esta atividade. Formulamos a hipótese de que durante a digestão da hemoglobina, no tubo digestório do carrapato, fragmentos com atividade antimicrobiana estão sendo produzidos, e estes fragmentos teriam participação importante no controle de microorganismos adquiridos durante o repasto sanguíneo (STEINHAUS, 1942; RUDOLF *et al.*, 2009).

A atividade antimicrobiana de extratos de tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus* já havia sido documentada anteriormente por nosso grupo de pesquisa (FOGACA *et al.*, 1999; FOGACA, 2003), quando foi purificado o fragmento Hb 33-61 da cadeia α . Este fragmento apresenta atividade contra bactérias Gram (+) e fungos. Neste trabalho, foi utilizado um passo de aquecimento do extrato de tubo digestivo à 80°C, com o intuito de desnaturar e precipitar a hemoglobina. Este procedimento possibilitou a obtenção um perfil cromatográfico com um único pico apresentando atividade antimicrobiana (FOGACA *et al.*, 1999; FOGACA, 2003) porém, o processo de desnaturação térmica poderia estar provocado também a precipitação de moléculas com atividade antimicrobiana. No trabalho aqui apresentado, elegemos

um protocolo diferente para a pré-purificação das hemocidinas do extrato do tubo digestório. A partir da purificação por HPLC das frações 5, 40 e 80% de ACN, obtidas da Sep-Pak, fomos capazes de detectar atividade antimicrobiana contra *C. albicans* e *E. coli*, em diversas frações cromatográficas das amostras eluídas com 40 e 80% de ACN. Em seguida, diversas frações cromatográficas da amostra de 40% da Sep-pak foram escolhidas para a análise por ESI-MS. Todas as frações apresentaram um perfil extremamente complexo, não sendo possível determinar as massas moleculares dos peptídeos presentes nas frações, mesmo após um segundo passo de HPLC (dados não apresentados). Estes resultados nos indicaram que os passos de purificação em Sep-pak e HPLC não foram suficientes para uma separação efetiva das hemocidinas presentes no extrato de tubo digestório.

Foi introduzido então um passo de filtração antes da HPLC, para podermos enriquecer a amostra com moléculas menores que 10.000 Da para a cromatografia. Este passo de filtração possibilitou a obtenção de um cromatograma com diversos picos bem definidos, vários destes apresentando atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. Com essa metodologia, identificamos nove peptídeos antimicrobianos derivados da hemoglobina bovina, a partir do extrato de tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus* (**Figura 7**). Oito destas hemocidinas pertencem à cadeia α e uma pertence à cadeia β . Durante a purificação destes peptídeos não foi utilizado nenhum inibidor de protease, o que nos levou a questionar se as hemocidinas estariam sendo produzidas durante os passos de purificação, por ação de proteases ainda ativas *in vitro*.

Repetimos a metodologia da purificação anterior, adicionando os inibidores para aspártico-proteases (pepstatina), cisteíno-proteinases B (E-64) e metaloproteases (EDTA), que são capazes de inibir a atividade proteolítica no extrato de tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus*. As principais enzimas digestivas deste carrapato pertencem à classe das aspártico-proteases (MENDIOLA *et al.*, 1996; MENDIOLA *et al.*, 2001; CRUZ, 2009), cisteíno-proteinases (RENARD *et al.*, 2000; RENARD *et al.*, 2002; CRUZ, 2009) e metaloproteases (MENDIOLA *et al.*, 1996), atuando em pH ácido, com capacidade de degradar a hemoglobina bovina. O extrato com inibidores foi submetido à Sep-pak, sendo a fração de 40% de ACN filtrada em 10.000 Da, e submetida à HPLC. O perfil de HPLC desta purificação apresentou um número reduzido de picos de baixa absorbância, comparado com a

purificação sem inibidores de proteases, não sendo detectada a atividade antimicrobiana em nenhuma fração, indicando escassez de material protéico (dados não apresentados).

Para obtermos uma amostra com uma concentração protéica maior, elaboramos outro protocolo de purificação, retirando o passo de purificação em Sep-pak. A partir da amostra processada seguindo este protocolo, conseguimos um perfil de HPLC com picos bem definidos, com frações apresentando atividade contra *C. albicans*. Desta cromatografia, conseguimos identificar um peptídeo de massa molecular 1.876 Da, correspondente aos aminoácidos 98 ao 114 da cadeia α da hemoglobina bovina. As condições utilizadas durante a purificação sugerem que este peptídeo está sendo produzido dentro do tubo digestório do carrapato, durante a digestão da hemoglobina.

Ao compararmos a purificação do extrato de tubo digestório processado sem inibidores de proteases (Figura 5) com a purificação com inibidores (Figura 13), podemos observar que o número de picos e de frações ativas é claramente menor na purificação com inibidores. Baseados nestas observações podemos concluir que os nove peptídeos identificados na preparação sem inibidores foram produzidos *in vitro*. No entanto, pode-se afirmar que essas hemocidinas foram produzidas pelas proteases digestivas de *R. (Boophilus) microplus*, pois nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada, além da pertencente à cadeia α da hemoglobina, na purificação dos peptídeos do sangue bovino (**Figura 16**). Essas informações nos levam a concluir que a hemoglobinose e a produção de hemocidinas depende da ação de enzimas digestivas do carrapato.

Nas purificações de tubo digestório de carrapato e de sangue bovino, foi identificada atividade anti-*Candida* das cadeias da hemoglobina. A atividade antimicrobiana das cadeias da hemoglobina já foi descrita por diversos grupos, que demonstraram que as cadeias α e β possuem atividade antimicrobiana na mesma faixa de concentração micromolar que seus fragmentos (HODSON e HIRSCH, 1958; MAK *et al.*, 2000; PARISH *et al.*, 2001). Estas cadeias podem se encontrar ativas, dentro dos lisossomos das células digestivas no tubo digestório do carrapato, uma vez que o pH ácido já é o suficiente para provocar a dissociação das cadeias (GUIDOTTI *et al.*, 1963).

Dos 10 peptídeos encontrados (**Figura 6**), nove tiveram como origem a cadeia α da hemoglobina, e apenas um a cadeia β . Esses nove peptídeos podem ser divididos em três grupos, usando como parâmetro a região de origem da cadeia. Há um grupo formado por 3 peptídeos derivados da porção N-terminal da cadeia (Hb α 1-94, 3-94, 1-87); o grupo formado por 5 peptídeos da região C-terminal (Hb α 93-141, 102-141, 103-141, 107-141, 109-141); e o terceiro grupo formado por somente um peptídeo da região central da cadeia (Hb α 98-114). O peptídeo da cadeia β pertence à região C-terminal (Hb β 127-145).

Dos fragmentos aqui descritos, apenas o Hb α 107-141 já havia sido previamente identificado (**Tabela 3**), (NEDJAR-ARROUME *et al.*, 2008). Esse peptídeo foi produzido a partir da hemoglobina bovina digerida *in vitro* com pepsina suína (E. C. 3.4.23.1). Ensaios antimicrobianos para a determinação da concentração mínima inibitória (MIC), foram realizados contra diversas bactérias, sendo obtidos os valores de 87 μ M contra *Salmonella enteritidis*, *E. coli* e *M. luteus*; e o valor de 43 μ M contra *Listeria innocua*.

Além do Hb α 107-141, outras 3 hemocidinas originadas da região C-terminal da cadeia α , foram identificadas: Hb α 93-141, 102-141, 103-141. Estas quatro hemocidinas possuem, além da região 107-141 que apresenta atividade contra *C. albicans*, duas regiões com atividade antibacteriana, formadas pelos resíduos 107-136 e 137-141 (**Tabela 1**), que são ativos contra as bactérias *S. Enteritidis*, *E. coli*, *M. luteus* e *L. innocua*, com MIC também na faixa de 38 à 76 μ M para o 107-136 e 1 à 9 μ M para o 137-141 (NEDJAR-ARROUME *et al.*, 2008).

Da região N-terminal da cadeia α , foram identificados os peptídeos Hb α 1-94, 3-94, 1-87. Estas hemocidinas possuem ao menos duas regiões com potencial atividade antimicrobiana, uma vez que já existe a descrição de peptídeos antimicrobianos contidos dentro dessas regiões, por exemplo 1-32 e 33-98 (**Tabela 3**), que foram ativos contra as bactérias *S. Enteritidis*, *E. coli*, *M. luteus* e *L. innocua*, com MIC na faixa de 38 à 154 μ M para o 1-32 e 49 à 90 μ M para o 33-98 (NEDJAR-ARROUME *et al.*, 2008).

O peptídeo Hb α 98-114, proveniente da região central da cadeia α não possui nenhuma hemocidina similar descrita na literatura.

O grande potencial da hemoglobina em produzir peptídeos com características antimicrobianas está associado ao fato de grande parte da estrutura secundária desta proteína ser composta por α -hélice (NEDJAR-ARROUME *et al.*, 2008). Peptídeos que apresentam uma estrutura organizada em hélice e aminoácidos hidrofóbicos são capazes de interagir com os lipídeos da membrana dos microorganismos, podendo levar à desorganização, e conseqüentemente a perda de conteúdo celular, levando a sua morte (Hancock e Lehrer, 1998; Bulet, Stocklin *et al.*, 2004).

Outra importante característica dos peptídeos antimicrobianos é a carga positiva, uma vez que é através da atração eletrostática, entre peptídeos e compostos carregados negativamente presentes na membrana, que se inicia o processo inserção (POWERS e HANCOCK, 2003). Já foi demonstrado a capacidade de desestabilização de membranas microbianas por duas hemocidinas, o Hb 33-61 e suas formas truncadas (SFORCA *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2007) e o fragmento 115-146 da cadeia β da hemoglobina humana (MAK *et al.*, 2007). No caso do Hb 33-61, foi proposto um modelo para a desestabilização de membrana, onde a região C-terminal do peptídeo se encontra inserida na bicamada, enquanto a região N-terminal permanece em contato com o solvente (SFORCA *et al.*, 2005). As porções C- e N-terminal são capazes de movimentarem-se de forma independente, podendo ser esta flexibilidade estrutural responsável em parte pela capacidade de permeabilização de membrana, como já foi visto para outros peptídeos (GAZIT *et al.*, 1996).

Utilizando diversos modelos matemáticos, disponíveis no servidor NPSA para prever a estrutura secundária as hemocidinas, foi possível identificar que todos os peptídeos antimicrobianos aqui descritos podem se apresentar estruturados em conformação α -hélice (**Tabela 3**), como já mencionado, uma característica presente em diversos peptídeos antimicrobianos (POWERS e HANCOCK, 2003). Além disso, a maioria deles é catiônico e apresentam um teor relativamente alto de resíduos hidrofóbicos (**Tabela 3**), outras duas característica dos peptídeos antimicrobianos (POWERS e HANCOCK, 2003). Os ensaios de atividade anti-Candida foram realizados em pH 5,1, valor este inferior ao ponto isoelétrico de todas as hemocidinas aqui identificadas, ou seja, todas os peptídeos estão carregados positivamente. Além disso, a digestão da hemoglobina ocorre em vesículas

lisossomais onde o pH é ácido (SONENSHINE, 1991; LARA *et al.*, 2005), e portanto os peptídeos também estariam com carga positiva. Todas essas observações nos permitem sugerir que as hemocidinas aqui identificadas provavelmente estão agindo através da permeabilização da membrana dos microorganismos.

Durante a digestão das proteínas sanguíneas, parte da aquisição destas moléculas é feita através da pinocitose (LARA *et al.*, 2005), um processo não específico de internalização da fase fluida do bolo alimentar, que poderia também levar à internalização de bactérias presentes no lúmen do tubo digestório. Desta forma, esses microorganismos entrariam em contato com as hemocidinas produzidas durante a hidrólise da hemoglobina. Outro fato comumente observado durante a digestão é o rompimento de células digestivas (BALASHOV IU e RAIKHEL, 1976; AGBEDE e KEMP, 1985; WALKER e FLETCHER, 1987; KOH *et al.*, 1991). A liberação de subprodutos da digestão da hemoglobina, dentre eles hemocidinas, pode então permitir a interação entre esses peptídeos antimicrobianos e os microorganismos presentes no lúmen do tubo digestório. Os patógenos bovinos transmitidos pelo *R. (Boophilus) microplus* são: *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. Tanto a bactéria quanto os protozoários tem como passo inicial da infecção do artrópode a invasão e colonização das células epiteliais digestivas (BUSCHER *et al.*, 1988; KOCAN *et al.*, 2009). Uma vez dentro das células digestivas, esses microorganismos poderiam também estar sujeitos à ação das hemocidinas, assim como também no lúmen quando os eritrócitos são lisados, liberando os microorganismos.

As enzimas envolvidas na hemoglobinese, e conseqüente produção de hemocidinas, são outro alvo de estudos em nosso laboratório. Duas dessas enzimas estão sendo caracterizadas: uma cisteína proteinase (BmCI1) e uma aspártico proteinase (BmAP) (CRUZ, 2009). A partir da BmCI1 recombinante, foi possível determinar a capacidade dessa enzima em processar gelatina, vitelina e hemoglobina, que ocorre preferencialmente em pH 5,5 (RENARD *et al.*, 2000; RENARD *et al.*, 2002). A sua especificidade P1-P4 foi determinada utilizando-se uma biblioteca de tetrapeptídeos (CHOE *et al.*, 2006). A BmCI1 clivou preferencialmente peptídeos com aminoácidos polares na posição P1, aminoácidos hidrofóbicos na posição P2, com maior hidrólise nos resíduos leucina e valina, não sendo observado uma especificidade significativa para as outras posições. Ao

compararmos os 11 sítios de clivagem existentes na formação das 10 hemocidinas identificadas, todos os sítios apresentam leucina ou valina como aminoácido na posição P2 (**Figura 17**), indicando que esses peptídeos podem ter sido produzidos pela BmCl1.

Também foram realizados ensaios de hemoglobinese *in vitro*, utilizando a BmCl1 recombinante e a BmAP nativa purificada (CRUZ, 2009). Nestes ensaios foram identificados diversos peptídeos formados após a incubação com cada uma das enzimas, e pela combinação das duas. Foi identificada uma correlação entre os fragmentos produzidos na hidrólise *in vitro* e as hemocidinas aqui identificadas: A BmCl1 foi capaz de produzir o peptídeo Hb β 127-145, além de clivar entre os aminoácidos L₂ - S₃ da cadeia α , podendo estar envolvida na produção do Hb α 3-94. A BmAP clivou entre os aminoácidos L₁₀₆-V₁₀₇ e T108-L109 da cadeia α , podendo estar envolvida na produção do Hb α 107-141 e 109-141. A combinação das duas enzimas foi capaz de clivar a cadeia α entre os aminoácidos H₈₇-A₈₈ e D₉₄-P₉₅, potencialmente produzindo os peptídeos Hb α 3-94, 1-94 e 1-87. Outra observação proveniente dos ensaios de hidrólise *in vitro* foi a preferência da BmAP por resíduos apolares na posição P1 (81% dos resíduos), podendo esta enzima ser responsável pela produção das hemocidinas Hb α 93-141, 103-141, 1-87 e 1-94, além de poder atuar na clivagem dos aminoácidos D₉₄-P₉₅ e N₉₇-F₉₈, que originam a região C-terminal do Hb α 3-94 e a região N-terminal do Hb α 98-114, respectivamente.

Hbα 109-141 ...SLLV <u>T</u> ₁₀₈ L ₁₀₉ ASHLP ...	Hbα 3-94 <u>V</u> L ₂ S ₃ AADKG... ...HKLR <u>V</u> D ₉₄ P ₉₅ VNFK...
Hbα 103-141 ...FKLL <u>S</u> ₁₀₂ H ₁₀₃ SLLVT...	Hbα 1-94 ...HKLR <u>V</u> D ₉₄ P ₉₅ VNFK...
Hbα 102-141 ...NFKLL ₁₀₁ S ₁₀₂ HSLLV...	Hbα 1-87 ...ELSDL <u>H</u> ₈₇ A ₈₈ HKLR...
Hbα 93-141 ...AHKL <u>R</u> ₉₂ V ₉₃ DPVNF...	Hbα 107-141 ...SHSLL <u>V</u> ₁₀₇ T ₁₀₈ LASH...
Hbα 98-114 ...VDPV <u>N</u> ₉₇ F ₉₈ KLLSHSLLVTLASH <u>P</u> ₁₁₄ S ₁₁₅ DFTP...	
Hbβ 127-145 ...TPVL <u>Q</u> ₁₂₆ A ₁₂₇ DFQKV...	

Figura 17: Sítios de clivagem das cadeias da hemoglobina utilizados para a geração das hemocidinas purificadas do tubo digestório de *R. (Boophilus) microplus*. Em negrito o sítio P1, em sublinhado o sítio P2.

Nossos resultados nos levam a concluir que as duas principais classes de enzimas digestivas de *R. (Boophilus) microplus*, cisteína e aspártico proteinases (FOGACA, 2003), estão produzindo, como produto da digestão da hemoglobina, hemocidinas que possuem atividade antimicrobiana. A identificação de diversos peptídeos antimicrobianos derivados da hemoglobina indica um possível papel destas moléculas na proteção do tubo digestório do carrapato, uma vez que o sangue armazenado no intestino de artrópodes hematófagos é um meio de cultura em potencial para o desenvolvimento de microorganismos (LEHANE *et al.*, 1997). As hemocidinas podem então desempenhar uma função de controlar microorganismos presentes no trato digestório, assim como patógenos adquiridos pelo carrapato durante o repasto sanguíneo como *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, atuando em sinergismo com outros componentes do sistema imune do artrópode.

6 Conclusões

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, podemos concluir que o carrapato bovino *R. (Boophilus) microplus* é capaz de produzir hemocidinas a partir da hidrólise da hemoglobina bovina. Essa hidrólise tem participação de duas enzimas digestivas pertencente à classe das aspártico (BmAP) e cisteíno (BmCl1) proteinases. As hemocidinas aqui identificadas apresentam uma estrutura terciária rica em α -hélice, característica de outras hemocidinas já identificadas, com provável modo de ação através da permeabilização de membranas, como já foi demonstrado para outras hemocidinas.

Referências Bibliográficas

- AFT, R. L.; MUELLER, G. C. Hemin-mediated DNA strand scission. **J. Biol. Chem.**, v.258, n.19, p.12069-72. 1983.
- AGBEDE, R. I.; KEMP, D. H. Digestion in the cattle-tick *Boophilus microplus*: light microscope study of the gut cells in nymphs and females. **Int. J. Parasitol.**, v.15, n.2, p.147-57. 1985.
- ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.15, n.3, p.97-100. 2006.
- ASSUNÇÃO, N. A. **Desenvolvimento de Instrumentação e metodologias bioanalíticas aplicadas a análises proteômicas.** 218 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- BALASHOV IU, S.; DAITER, A. B.; KHAVKIN, T. N. Distribution of *Rickettsia burneti* in *Hyalomma asiaticum* ticks (immunofluorescent and histological studies). **Parazitologiya**, v.6, n.1, p.22-5. 1972.
- BALASHOV IU, S.; RAIKHEL, A. S. Ultrastructure of the epithelium of the midgut in nymphs of *Hyalomma asiaticum* (Acarina, Ixodidae) ticks during feeding. **Parazitologiya**, v.10, n.3, p.201-9. 1976.
- BEIER, J.. C. Malaria parasite development in mosquitoes. **Annu. Rev. Entomol.**, v.43, p.519-43. 1998.
- BOLDBAATAR, D.; SIKALIZYO SIKASUNGE, C.; BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **Insect. Bio. Chem. Mol. Biol.**, v.36, n.1, p.25-36. 2006.
- BRADFORD, M. M. 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. 1976.
- BRAZ, G. R.; COELHO, H. S.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Curr. Biol.**, v.9, n.13, p.703-6. 1999.
- BRIEGEL, H.; LEA, A. O. Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. **J. Insect. Physiol.**, v.21, n.9, p.1597-604. 1975.
- BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.**, v.198, p.169-84. 2004.
- BUSCHER, G.; FRIEDHOFF, K. T.; EL-ALLAWY, T. A. Quantitative description of the development of *Babesia ovis* in *Rhipicephalus bursa* (hemolymph, ovary, eggs). **Parasitol. Res.**, v.74, n.4, p.331-9. 1988.

CHEVILLON, C.; DUCORNEZ, S.; DE MEEUS, T.; KOFFI, B. B.; HUGUETTE, G.; DELATHIERE, J. M.; BARRE, N. Accumulation of acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations from New Caledonia Island. **Vet. Parasitol.**, v.147, n.3-4, p.276-88. 2007.

CHOE, Y.; LEONETTI, F.; GREENBAUM, D. C.; LECAILLE, F.; BOGYO, M.; BROMME, D.; ELLMAN, J. A.; CRAIK, C. S. Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. **J. Biol. Chem.**, v.281, n.18, p.12824-32. 2006.

COMBET, C.; BLANCHET, C.; GEOURJON, C.; DELEAGE, G. NPS@: network protein sequence analysis. **Trends Bio. Chem. Sci.**, v.25, n.3, p.147-50. 2000.

CRUZ, C. E. **Caracterização de proteinases envolvidas na geração de peptídeos antimicrobianos no Intestino de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

DA SILVA VAZ, I., J.R.; LOGULLO, C.; SORGINE, M.; VELLOSO, F. F.; ROSA DE LIMA, M. F.; GONZALES, J. C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L.; MASUDA, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.66, n.3-4, p.331-41. 1998.

DAOUD, R.; DUBOIS, V.; BORS-DODITA, L.; NEDJ.AR-ARROUME, N.; KRIER, F.; CHIHIB, N. E.; MARY, P.; KOUACH, M.; BRIAND, G.; GUILLOCHON, D. New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. **Peptides**, v.26, n.5, p.713-9. 2005.

DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; SNYDER, D. E. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Vet. Parasitol.**, v.99, n.1, p.41-52. 2001.

DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; GARCIA-GARCIA, J. C.; MENDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDES, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUE, O.; MACHADO, H.; LLEONART, R. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genet. Anal.**, v.15, n.3-5, p.143-8. 1999.

DENG, L.; PAN, X.; WANG, Y.; WANG, L.; ZHOU, X. E.; LI, M.; FENG, Y.; WU, Q.; WANG, B.; HUANG, N. Hemoglobin and its derived peptides may play a role in the antibacterial mechanism of the vagina. **Hum. Reprod.**, v.24, n.1, p.211-8. 2009.

EMBRAPA. **Carrapato-de-boi: Prejuízos e Controle** Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD42.html>>. Acesso em: 28 set. 2009.

ESTEVEES, E.; FOGACA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F. D.; MANSO, P. P.; PELAJ.O-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Dev. Comp. Immunol.**, v.33, n.8, p.913-9. 2009.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A Review of the ticks (Acari, ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, n.4, p.453-70. 2000.

FOGACA, A. C. **Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos do carrapato de boi *Boophilus microplus***. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

FOGACA, A. C.; ALMEIDA, I. C.; EBERLIN, M. N.; TANAKA, A. S.; BULET, P.; DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, v.27, n.4, p.667-74. 2006.

FOGACA, A. C.; DA SILVA, P. I., J.R.; MIRANDA, M. T.; BIANCHI, A. G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P. E.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.36, p.25330-4. 1999.

FOGACA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Dev Comp. Immunol.**, v.28, n.3, p.191-200. 2004.

FRAZZON, A. P.; DA SILVA VAZ J.UNIOR, I.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol.**, v.94, n.1-2, p.117-25. 2000.

FROIDEVAUX, R.; KRIER, F.; NEDJ.AR-ARROUME, N.; VERCAIGNE-MARKO, D.; KOSCIARZ, E.; RUCKEBUSCH, C.; DHULSTER, P.; GUILLOCHON, D. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. **FEBS Lett.**, v.491, n.1-2, p.159-63. 2001.

GAZIT, E.; MILLER, I. R.; BIGGIN, P. C.; SANSOM, M. S.; SHAI, Y. Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. **J. Mol. Biol.**, v.258, n.5, p.860-70. 1996.

GUIDOTTI, G.; KONIGSBERG, W.; CRAIG, L. C. On the Dissociation of normal adult human hemoglobin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.50, p.774-82. 1963.

HERNANDEZ ALVAREZ, H. M.; MENDIOLA MARTINEZ, J.; FERNANDEZ-CALIENES, A.; VALDEZ, M. Identification of a neutral protease in the Int.estine of *Boophilus microplus* with electrophoresis in polyacrylamide gels copolymerized with gelatin. **Rev. Cubana. Med. Trop.**, v.52, n.3, p.165-9. 2000.

HODSON, D.; HIRSCH, J. G. The antibacterial activity of hemoglobin. **J. Exp. Med.**, v.107, n.2, p.167-83. 1958.

IVANOV, V. T.; KARELIN, A. A.; YATSKIN, O. N. Generation of peptides by human erythrocytes: facts and artifacts. **Biopolymers**, v.80, n.2-3, p.332-46. 2005.

J.ARMEY, J. M.; RIDING, G. A.; PEARSON, R. D.; MCKENNA, R. V.; WILLADSEN, P. Carboxydipeptidase from *Boophilus microplus*: a "concealed" antigen with similarity to angiotensin-converting enzyme. **Insect. Bio. Chem. Mol. Biol.**, v.25, n.9, p.969-74. 1995.

J.ONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Vet. Parasitol.**, v.137, n.1-2, p.1-10. 2006.

KARELIN, A. A.; PHILIPPOVA, M. M.; IVANOV, V. T. Proteolytic degradation of hemoglobin in erythrocytes leads to Biologically active peptides. **Peptides**, v.16, n.4, p.693-7. 1995.

KAUFMAN, W. R. Tick-host Interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitol. Today**, v.5, n.2, p.47-56. 1989.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Vet. Parasitol.**. 2009.

KOH, K.; MORI, T.; SHIRAISHI, S.; UCHIDA, T. A. Ultrastructural changes of the midgut epithelial cells in feeding and moulting nymphs of the tick *Haemaphysalis longicornis*. **Int. J. Parasitol.**, v.21, n.1, p.23-36. 1991.

LARA, F. A.; LINS, U.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. L. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. **J. Exp. Biol.**, v.208, Pt 16, p.3093-101. 2005.

LARA, F. A.; LINS, U.; PAIVA-SILVA, G.; ALMEIDA, I. C.; BRAGA, C. M.; MIGUENS, F. C.; OLIVEIRA, P. L.; DANSA-PETRETSKI, M. A new Intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. **J. Exp. Biol.**, v.206, n.Pt 10, p.1707-15. 2003.

LEHANE, M. J.; WU, D.; LEHANE, S. M. Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.94, n.21, p.11502-7. 1997.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annu. Rev. Immunol**, v.25, p.697-743. 2007.

LIEHL, P.; BLIGHT, M.; VODOVAR, N.; BOCCARD, F.; LEMAITRE, B. Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. **PLoS Pathog.**, v.2, n.6, p.e56. 2006.

LIEPKE, C.; BAXMANN, S.; HEINE, C.; BREITHAUPT, N.; STANDKER, L.; FORSSMANN, W. G. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.**, v.791, n.1-2, p.345-56. 2003.

MACHADO, A.; SFORCA, M. L.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; MIRANDA, M. T. Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine alpha-hemoglobin: effects on the structure and anticandidal activity. **Biopolymers**, v.88, n.3, p.413-26. 2007.

MAK, P.; SIWEK, M.; POHL, J.; DUBIN, A. Menstrual hemocidin HbB115-146 is an acidophilic antibacterial peptide potentiating the activity of human defensins, cathelicidin and lysozyme. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v.57, n.1, p.81-91. 2007.

MAK, P.; WOJCIK, K.; SILBERRING, J.; DUBIN, A. Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: hemocidins. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.77, n.3, p.197-207. 2000.

MAK, P.; WOJCIK, K.; WICHEREK, L.; SUDER, P.; DUBIN, A. Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. **Peptides**, v.25, n.11, p.1839-47. 2004.

MANGOLD, A. J.; AGUIRRE, D. H.; CAFRUNE, M. M.; DE ECHAIDE, S. T.; GUGLIELMONE, A. A. Evaluation of the infectivity of a vaccinal and a pathogenic *Babesia bovis* strain from Argentina to *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol.**, v.51, n.1-2, p.143-8. 1993.

MAYA-MONTEIRO, C. M.; DAFFRE, S.; LOGULLO, C.; LARA, F. A.; ALVES, E. W.; CAPURRO, M. L.; ZINGALI, R.; ALMEIDA, I. C.; OLIVEIRA, P. L. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.47, p.36584-9. 2000.

MENDIOLA, J.; ALONSO, M.; MARQUETTI, M. C.; FINLAY, C. *Boophilus microplus*: multiple proteolytic activities in the midgut. **Exp. Parasitol.**, v.82, n.1, p.27-33. 1996.

MENDIOLA, J.; HERNANDEZ, H.; FERNANDEZ-CALINENES, A.; GARCIA, I.; DE LA VEGA, R. Isolation of aspartic proteinases at different stages of development of *Boophilus microplus* tick. **Rev. Cubana. Med. Trop.**, v.53, n.3, p.145-53. 2001.

MIYOSHI, T.; TSUJII, N.; ISLAM, K. M.; KAMIO, T.; FUJISAKI, K. Enzymatic characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **J. Vet. Med. Sci.**, v.66, n.10, p.1195-8. 2004.

MIYOSHI, T.; TSUJII, N.; ISLAM, M. K.; HUANG, X.; MOTOBU, M.; ALIM, M. A.; FUJISAKI, K. Molecular and Reverse genetic characterization of serine proteinase-induced hemolysis in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. **J. Insect. Physiol.**, v.53, n.2, p.195-203. 2007.

MULENGA, A.; SUGIMOTO, C.; INGRAM, G.; OHASHI, K.; MISAO, O. Characterization of two cDNAs encoding serine proteinases from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **Insect. Bio. Chem. Mol. Biol.**, v.31, n.8, p.817-25. 2001.

MULENGA, A.; SUGIMOTO, C.; INGRAM, G.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Molecular cloning of two *Haemaphysalis longicornis* cathepsin L-like cysteine proteinase genes. **J. Vet. Med. Sci.**, v.61, n.5, p.497-502. 1999.

NAKAJIMA, Y.; OGIHARA, K.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). **J. Med. Entomol.**, v.40, n.1, p.78-81. 2003.

NEDJAR-ARROUME, N.; DUBOIS-DELVAL, V.; ADJ.E, E. Y.; TRAISNEL, J.; KRIER, F.; MARY, P.; KOUACH, M.; BRIAND, G.; GUILLOCHON, D. Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides. **Peptides**, v.29, n.6, p.969-977. 2008.

NEDJAR-ARROUME, N.; DUBOIS-DELVAL, V.; MILOUDI, K.; DAOUD, R.; KRIER, F.; KOUACH, M.; BRIAND, G.; GUILLOCHON, D. Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. **Peptides**, v.27, n.9, p.2082-9. 2006.

PAIVA-SILVA, G. O.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; NAKAYASU, E. S.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; DUNKOV, B. C.; MASUDA, H.; ALMEIDA, I. C.; OLIVEIRA, P. L. A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.103, n.21, p.8030-5. 2006.

PARISH, C. A.; JIANG, H.; TOKIWA, Y.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; MCCABE, D.; ZUCKERMAN, W.; XIA, M. M.; GABAY, J. E. Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. **Bioorg. Med. Chem.**, v.9, n.2, p.377-82. 2001.

PETROV, R. V.; MIKHAILOVA, A. A.; FONINA, L. A. Bone marrow immunoregulatory peptides (myelo peptides): isolation, structure, and functional activity. **Biopolymers**, v.43, n.2, p.139-46. 1997.

POWERS, J. P.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v.24, n.11, p.1681-91. 2003.

RATCLIFFE, N. A., WHITTEN, M.M.A. Vector Immunity In: Gillespie, S. H; Smith G.L.; Osbourn, A. (Ed.) **Vector-borne Diseases in Microbe-vector Interactions**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004 p.240-71.

RENARD, G.; GARCIA, J. F.; CARDOSO, F. C.; RICHTER, M. F.; SAKANARI, J. A.; OZAKI, L. S.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. **Insect. Bio. Chem. Mol. Biol.**, v.30, n.11, p.1017-26. 2000.

RENARD, G.; LARA, F. A.; DE CARDOSO, F. C.; MIGUENS, F. C.; DANSAPETRETSKI, M.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. **Insect. Mol. Biol.**, v.11, n.4, p.325-8. 2002.

RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents. Dis.**, v.4, n.3, p.143-52. 1995.

RIDING, G. A.; JARMEY, J.; MCKENNA, R. V.; PEARSON, R.; COBON, G. S.; WILLADSEN, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. **J. Immunol.**, v.153, n.11, p.5158-66. 1994.

ROBERTS, J. A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (canestrini). I. Development of ticks on *Bos taurus*. **J. Parasitol.**, v.54, n.4, p.663-6. 1968.

RODRIGUEZ, M.; MASSARD, C. L.; DA FONSECA, A. H.; RAMOS, N. F.; MACHADO, H.; LABARTA, V.; DE LA FUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, v.13, n.18, p.1804-8. 1995.

RUDOLF, I.; MENDEL, J.; SIKUTOVA, S.; SVEC, P.; MASARIKOVA, J.; NOVAKOVA, D.; BUNKOVA, L.; SEDLACEK, I.; HUBALEK, Z. 16S rRNA gene-based identification of cultured bacterial flora from host-seeking *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks, vectors of vertebrate pathogens. **Folia Micro. Biol. (Praha)**, v.54, n.5, p.419-28. 2009.

SCHMITT, T. H.; FREZZATTI, W. A.; J.R.; SCHREIER, S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. **Arch. Bio. Chem. Biophys.**, v.307, n.1, p.96-103. 1993.

SFORCA, M. L.; MACHADO, A.; FIGUEREDO, R. C.; OYAMA, S., J.R.; SILVA, F. D.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MIRANDA, M. T.; SPISNI, A.; PERTINHEZ, T. A. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. **Bio. Chemistry**, v.44, n.17, p.6440-51. 2005.

SIEBER, K. P.; HUBER, M.; KASLOW, D.; BANKS, S. M.; TORII, M.; AIKAWA, M.; MILLER, L. H. The peritrophic membrane as a barrier: its penetration by *Plasmodium gallinaceum* and the effect of a monoclonal antibody to ookinetes. **Exp. Parasitol.**, v.72, n.2, p.145-56. 1991.

SILVA, F. D.; REZENDE, C. A.; ROSSI, D. C.; ESTEVES, E.; DYSZY, F. H.; SCHREIER, S.; GUEIROS-FILHO, F.; BARBOSA, C.; PIRES, J. R.; DAFFRE, S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*. **J. Biol. Chem.**, 2009.

SOJKA, D.; HAJDUSEK, O.; DVORAK, J.; SAJID, M.; FRANTA, Z.; SCHNEIDER, E. L.; CRAIK, C. S.; VANCOVA, M.; BURESOVA, V.; BOGYO, M.; SEXTON, K. B.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R.; KOPACEK, P. IrAE: an asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. **Int. J. Parasitol.**, v.37, n.7, p.713-24. 2007.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, 1991. 447 p.

SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L.; CERAUL, S. M.; MITCHELL, R.; BENZINE, T. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. **Exp. Appl. Acarol.**, v.36, n.3, p.207-23. 2005.

STEINHAUS, E. A. The Microbial Flora of the Rocky Mountain Wood Tick, *Dermacentor andersoni* Stiles. **J. Bacteriol.**, v.44, n.4, p.397-404. 1942.

STONE, K. L.; WILLIAMS, K.R. Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrylamide gel. In: J. M. Walker (Ed.) **The protein protocol handbook**. Totowa, NJ.: Humana Press Inc., 1996 p.415-421.

TAYLOR, D. Innate Immunity in Ticks: A Review. **J. Acarolo. Soc. Japan**, v.15, n.2, p.109-27. 2006.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Arch. Insect. Biochem. Physiol.**, v.47, n.2, p.47-61. 2001.

VINCENT, S. H.; GRADY, R. W.; SHAKLAI, N.; SNIDER, J. M.; MULLER-EBERHARD, U. The influence of heme-binding proteins in heme-catalyzed oxidations. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.265, n.2, p.539-50. 1988.

WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naive and resistant to the ticks. **Int. J. Parasitol.**, v.17, n.8, p.1393-411. 1987.

WILKINS, M. R.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods Mol. Biol.**, v.112, p.531-52. 1999.

ZHIOUA, E.; BROWNING, M.; JOHNSON, P. W.; GINSBERG, H. S.; LEBRUN, R. A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **J. Parasitol.**, v.83, n.5, p.815-8. 1997.