****PEDRO ISMAEL DA SILVA JUNIOR***

**SISTEMA IMUNE EM ARACNÍDEOS:
ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA
HEMOLINFA DA ARANHA *Acanthoscurria gomesiana***

**Tese apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo
para obtenção do título
de Doutor em Ciências**

**São Paulo
2000**

Pedro Ismael da Silva Junior
Pesquisador Científico
LABORATÓRIO DE ARTRÓPODES
INSTITUTO BUTANTAN
Avenida Vital Brazil, 1500 - CEP 05503-900
Butantã – São Paulo/SP
E-mail: pisjr@usp.br

PEDRO ISMAEL DA SILVA JUNIOR

**SISTEMA IMUNE EM ARACNÍDEOS:
ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA HEMOLINFA DA
ARANHA *Acanthoscurria gomesiana***

**Tese apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

**Área de Concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro**

**Orientador:
Profa. Dra. Sirlei Daffre**

**São Paulo
2000**

ÍNDICE

[Dedicatória](#)

[Agradecimentos](#)

[Lista de Abreviaturas](#)

[Resumo](#)

[Summary](#)

[I – Introdução](#)

[II – Materiais e Métodos](#)

- 1- [Animais e Coleta de Hemolinfa](#)
- 2- [Imunização Experimental de Aranhas](#)
- 3- [Extração e Purificação de Peptídeos Antimicrobianos](#)
 - 3.1- [Plasma](#)
 - 3.2- [Hemócitos](#)
- 4- [Caracterização Estrutural](#)
 - 4.1- [Eletroforese de zona capilar](#)
 - 4.2- [Espectrometria de massa – MALDI-TOF-MS](#)
 - 4.3- [Redução e Alquilação](#)
 - 4.4- [Clivagem Enzimática de AGH2](#)
 - 4.4.1- [Tratamento com Piroglutamato Aminopeptidase](#)
 - 4.4.2- [Tratamento de AGH2 com Tripsina](#)
 - 4.5- [Seqüenciamento Amino –Terminal](#)
 - 4.6- [Determinação da Composição de Aminoácidos de AGH1](#)
 - 4.7- [Síntese Química de AGH2](#)

4.8- [Bioensaios](#)

4.8.1- [Microrganismos](#)

4.8.2- [Atividade Antimicrobiana](#)

4.8.2.1- [Ensaio de Zona de Inibição de Crescimento Bacteriano](#)

4.8.2.2- [Ensaio de Inibição de Crescimento Bacteriano em Meio Líquido](#)

4.8.2.3- [Ensaio Bactericida](#)

4.8.2.4- [Ensaio Antifúngico](#)

4.8.2.5- [Ensaio Fungicida](#)

4.8.3 [Ensaio Antiparasítico](#)

4.8.4-[Ensaio Hemolítico](#)

III – Resultados

1- [Peptídeos do Plasma](#)

1- [Purificação e Caracterização de AGP2](#)

2- [Peptídeos dos Hemócitos](#)

2.1- [Purificação e Caracterização de AGH1](#)

2.2- [Purificação e Caracterização de AGH2](#)

2.2.1- [Purificação de AGH2](#)

2.2.2- [Caracterização de AGH2](#)

2.2.3- [Espectro de atividade Antimicrobiana de Gomesina](#)

2.2.4- [Atividade Antibactericida e Fungicida de Gomesina](#)

2.2.5- [Atividade de Gomesina Contra Células Eucarióticas](#)

2.3- [Purificação e Caracterização de AGH3](#)

2.3.1- [Purificação e Caracterização de AGH3](#)

2.3.2- [Atividade Antimicrobiana de Achantoscurrina](#)

IV – Discussão

V – Referências Bibliográficas

VI – Figuras e Tabelas

VII – Anexos

1- [Patente](#)

2- [JBC](#)

**À minha esposa Hiroko,
Companheira e amiga que há muitos
anos me acompanha nesse fascinante
mundo do pesquisar, por sua
compreensão e apoio em todos os momentos.
Um beijo doce e delicado.**

[índice](#)

AGRADECIMENTOS

Estou chegando ao fim de mais uma etapa em minha vida, foram momentos custosos mas também de muitas alegrias, descobertas e muito aprendizado. Durante todo esse trajeto muitas pessoas estiveram a minha volta, me apoiando, me animando, ensinando e quando necessário fazendo críticas construtivas e me chamando à realidade. A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu conseguisse chegar ao fim dessa jornada, esperando não esquecer de citar algum amigo, aproveito esta ocasião para formalmente expressar meus sinceros e profundos agradecimentos:

Em primeiro lugar um agradecimento todo especial a Profa. Sirlei Daffre que com seu amor maternal adotou-me como seu orientado, aceitando o desafio em experimentar um novo material de pesquisa. Que nossa amizade dure sempre e que o sucesso esteja sempre presente;

Ao Prof. Antonio G. Bianchi um abraço especial, por me ajudar no início, lá na Química e por trazer o equilíbrio e orientação nesses momentos finais.

Ao Prof. Ronaldo Zucchi (FFCLRP/USP) pelos meus primeiros passos pelo caminho da investigação científica e pela compreensão em alguns momentos delicados;

À Dra. Sylvia Marlene Lucas, que a tanto tempo tem me apoiado e incentivado, depositando confiança e esperança na minha pessoa;

Ao saudoso Prof. Domingos Baggio que me acolheu com muito carinho para iniciar essa jornada aqui no Departamento de Parasitologia;

Ao Prof. Osvaldo Marinoti que me ensinou os primeiros passos no trato das proteínas e sempre esteve perto e com palavras e sugestões amigas;

Aos professores do Departamento de Parasitologia-ICB que disponibilizaram aparelhos ou reagentes, além de contribuírem com críticas e sugestões para as conduções dos experimentos. Em especial aos Professores Carlos Winter, Marcelo Barcinski, Terezinha Schumaker, Alejandro Katzin;

A todos os funcionários do Departamento de Parasitologia que de alguma forma contribuíram para o bom andamento dos trabalhos. Em especial a Susana, Clizete, Manoel, Rosa, Sueko, Mário Balanco, Marião e Zezé;

Ao Dr. Paulo Ribola e Dra. Margareth Capurro pela minha iniciação pelo mundo do FPLC, e por aguentarem tantas perguntas, respondendo sempre com atenção;

À Profa. Maria Tereza M. de Miranda do Dep. De Bioquímica – IQ pela minha iniciação pelo mundo do HPLC;

A todos amigos do laboratório com os quais pude dividir minhas angustias e alegrias. Que nossa amizade fique para sempre: Abrahin, Aline, Andrea, Bel, Cris, Cris Daffre, Cris Heideier, Damião, Daniel, Enios, Eric (Patric), Erica, Ernesto, Gisela, Isis, Kumie, Luciana, Márcio, Mauro, Rodrigo, Rosely, Zeca.

A todos amigos do Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan, em especial a Irene, Mírian, Denise, Rosana, Dirce, Tereza, Maria Helena, Maria Aguilera e, ao amigo sempre presente Rogério Bertani.

[Índice](#)

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AFP	Proteína Antifúngica (“Antifungal protein”)
ATCC	Centro Americano de Tipo de Cultura
BAEEase	Esterase N- α -Benzoyl-L-Arginine-Ethyl- Ester
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA obtido a partir de transcrição reversa de mRNA
CZE -	Eletroforese de Zona Capilar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra acético
ELISA	"Enzyme linked immunosorbent assay"
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonil
GRP	“Glycine-Rich Protein”
GRP PETHY	“Glycine-Rich Protein <i>Petunia hybrid</i> ”
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
Hvgrp	“ <i>Hordeum vulgare</i> Glycine-Rich Protein”
IAL	Instituto Adolfo Lutz

LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
m/z	Massa/carga
MALDI-TOF-MS	“Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry”
MCI	Menor Concentração Inibitória
MGD1	“ <i>Mytilus galloprovincialis</i> defensin 1”
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
Pb	Meio de cultura pobre em nutrientes
PBS	Tampão fosfato salina
PPAEase	Enzima ativadora da pró-fenoloxidade
PRs	“Pathogenesis-Related proteins”
PTH	Feniltiohidantoina
3’RACE-PCR	“Rapid Amplification of cDNA Ends-Polymerase Chain Reaction”
RNA	Ácido ribonucléico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS	Dodecil-sulfato de sódio

TEMED	N,N,N',N', tetrametilenodiamina
TFA	Ácido Trifluoroacético
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
Z	Ácido Piroglutâmico
Z18R	Gomesina com arginina C-terminal não amidada
Z18Ra	Gomesina com arginina C-terminal amidada

[índice](#)

Resumo

Peptídeos antimicrobianos são importantes componentes do sistema imune de vertebrados e invertebrados e, nos últimos 20 anos, muitas dessas moléculas foram isoladas e caracterizadas em diversos organismos.

Utilizando a aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, purificamos e caracterizamos quatro moléculas presentes em sua hemolinfa (**Tabela I**): 1) theraphosinina, peptídeo de 4052,5 Da purificado do plasma, apresenta atividade anti-*Micrococcus luteus* e não apresenta similaridade com outros peptídeos. A partir dos hemócitos foram purificados: 2) mygalomorphina, um peptídeo de 415,9 Da com atividade anti-*Escherichia coli*. Sua atividade está relacionada à produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pois é inibida por catalase; 3) gomesina, um peptídeo de 2270,4 Da que apresenta alta similaridade com taquiplesinas e protegrinas. Apresenta amplo espectro de atividade contra bactérias, leveduras, fungos e *Leishmania*; 4) acanthoscurrina, um peptídeo rico em glicina, que apresenta duas isoformas com 10132,4 e 10249,1 Da. Este peptídeo tem atividade contra *Escherichia coli* e *Candida albicans* e apresenta grande similaridade com proteínas antifúngicas de insetos e também com proteínas relacionadas com a defesa em plantas.

Tabela I – Peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*.

Peptídeos	Fonte	Massa Molecular	Atividade Antimicrobiana	Seqüência de aminoácidos	Similaridade
Theraphosinina	Plasma	4.052,5 Da	Bactéria Gram-positiva: <i>M. luteus</i> A270	ETDXEAHRXRASRGPLVNDINGXENGXYNPN (31 aminoácidos – seqüência parcial)	Não apresenta similaridade com proteínas e peptídeos antimicrobianos
Mygalomorphina	Hemócitos	415,9 Da	Bactéria Gram-negativa: <i>E. coli</i> SBS363	Cys-Asx..... (seqüência parcial)	5-S-GAD de dípteros
Gomesina	Hemócitos	2.270 Da	Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, Fungos e <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	Z*CRRLCYKQRCVTYCRGR (18 aminoácidos – seqüência total) *Z – ácido piruglutâmico	Taquiplesinas e Polifemusinas (limulídeos), Androctonina (escorpião) e Protegrina (suínos)
Acanthoscurrina (2 isoformas)	Hemócitos	10.132 Da 10.249 Da	Bactéria Gram-negativa: <i>E. coli</i> SBS363 e Fungo: <i>C. albicans</i>	DVYKGGGGGGRYGGGGRYGGGGYGGGLGGGGLGGGLGGGKGLGGGGLGGGLGGGLGGGGLG (62 aminoácidos – seqüência parcial)	Peptídeos ricos em glicina: a) relacionados com defesa em plantas e, b) antifúngicos de insetos

A detecção dessas moléculas e avaliação do seu modo de ação pode contribuir para um entendimento mais amplo dos processos envolvidos no sistema imune de aracnídeos e dos artrópodes em geral. Além disso a descrição e caracterização de novas moléculas com atividade antimicrobiana podem contribuir também para a produção e utilização de novas drogas para uso na medicina e na agricultura.

[índice](#)

Summary

Antimicrobial peptides are important components of the vertebrates and invertebrates immune system. In the last 20 years, many of these molecules have been isolated and characterized in several organisms.

Using the hemolymph of the *Acanthoscurria gomesiana* spider, four antimicrobial molecules were purified and characterized (**Table I**): 1) theraphosinin, a 4,052.5 Da peptide purified from plasma, has anti-*Micrococcus luteus* activity and do not have similarity with other known peptides. From the hemocytes three peptides have been purified: 2) mygalomorphina, a 415.9 Da peptide, has anti-*Escherichia coli* activity, that may be linked with hydrogen peroxide (H₂O₂) production once it is inhibited by catalase; 3) gomesina, a 2,270.4 Da peptide, has high similarity with tachyplesins and polyphemusins (present in hemocytes of horseshoe crabs), androctonin (present in scorpion hemolymph) and protegrins (present in swines leukocytes). Gomesin shows a broad spectrum of activity against bacteria, fungi and *Leishmania (L.) amazonensis*; 4) acanthoscurrina, a glycine-rich peptide which presents two isoforms with 10,132.4 and 10,249.1 Da. They have activity against *Escherichia coli* and *Candida albicans* and present sequence similarity with antifungal proteins of insects and with

proteins related with defense in plants.

Table I – Antimicrobial peptides from the hemolymph of *Acanthoscurria gomesiana* spider.

Peptides	Source	Molecular Weight	Antimicrobial Activity	Amino acid Sequence	Similarity
Theraphosinin	Plasma	4,052.5 Da	Gram-positive bacteria: <i>M. luteus</i> A270	ETDXEAHRXRASRGPLVNDINGXENGXYNPN (31 amino acids – partial sequence)	no similarity with known antimicrobial proteins and peptides
Mygalomorphin	Hemocytes	415.9 Da	Gram-negative bacteria: <i>E. coli</i> SBS363	Cys-Asx..... (partial sequence)	5-S-GAD of the Diptera
Gomesin	Hemocytes	2,270 Da	Gram-negative and Gram-positive bacteria, fungi and <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	Z*CRRLCYKQRCVTYCRGR (18 amino acids – total sequence) *Z – pyrroglutamic acid	Tachyplesins / Polyphemusins (horseshoe crabs), Androctonin (scorpion) and Protegrin (swines)
Acanthoscurrin (2 isoforms)	Hemocytes	10,132 Da 10,249 Da	Gram-negative bacteria: <i>E. coli</i> SBS363 and fungi: <i>C. albicans</i>	DVYKGGGGGGRYGGGGRYGGGGGYGGGLGGGGLGGGLGGGKGLGGGGLGGGLGGGLGGGGLG (62 amino acids – partial sequence)	Glycine-rich peptides: a) related with defense in plants and, b) antifungal peptides of insects

The investigation of these molecules and the understanding of their mechanisms of action may promote large knowledge about the immune system of arachnids and arthropods. Moreover, the description and characterization of new molecules with antimicrobial activity may contribute to the development of new drugs for medicine and agriculture.

[índice](#)

I - INTRODUÇÃO

Os artrópodes estão amplamente disseminados e podem ser encontrados em quase todos os ambientes. Sua dispersão e sobrevivência dependem em grande parte do sucesso em se defenderem contra vários tipos de microorganismos e parasitas, desde que muitos desses animais vivem em ambientes onde microorganismos são abundantes. É portanto claro que os invertebrados devam ter meios eficientes de reconhecer e combater microorganismos potencialmente perigosos.

O sistema de defesa dos invertebrados em geral se distingue fundamentalmente daquele dos vertebrados pela ausência de uma memória imunológica e pela falta de imunoglobulinas, moléculas que apresentam alta especificidade contra os invasores. A resposta de defesa dos invertebrados é muito pouco específica e se apoia sobre um sistema de defesa complexo que envolve reações celulares e humorais coordenadas.

Nessas reações, os hemócitos, células circulantes da hemolinfa, atuam de várias maneiras. Quando pequenos organismos, bactérias por exemplo, estão envolvidos, estes são fagocitados pelos hemócitos. Quando o número de bactérias é

elevado ou quando parasitas maiores são os responsáveis pela infecção, grupos de hemócitos atuam formando cápsulas ou nódulos em torno dos organismos invasores, provocando a morte destes por asfixia ou por ação de substâncias tóxicas que são liberadas dentro dos nódulos ou cápsulas. É muito comum a melanização desses nódulos e cápsulas para o isolamento dos parasitas. A reação de melanização, que é uma resposta comum à invasão de parasitas nos invertebrados, principalmente nos artrópodes, é devida a atividade da fenoloxidase. Esta enzima é parte de um complexo sistema de proteases, proteínas de reconhecimento e inibidores de proteases, constituindo o conhecido sistema ativador da pró-fenoloxidase ([Figura 1](#)). É um sistema de reconhecimento “nonsell” porque a conversão de pró-fenoloxidase na enzima ativa pode ser desencadeada por minúsculas quantidades de lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e β -1, 3-glucanos característicos dos microorganismos (revisão de Söderhäll & Cerenius, 1998).

Em insetos foram caracterizadas, além da pró-fenoloxidase, duas outras enzimas (PPAEase e BAEase) que participam dessa cascata. Além disso foram isoladas e caracterizadas duas proteínas que atuam como receptores na etapa inicial da cascata de fenoloxidase, através da ligação das mesmas aos componentes

da parede microbiana. Em crustáceos existe um mecanismo semelhante, mas os componentes da cascata da pró-fenoloxidase estão localizados dentro dos hemócitos e em insetos, no plasma (revisão de Söderhäll & Cerenius, 1998).

Assim como a cascata de ativação da pró-fenoloxidase pode ser desencadeada por moléculas estranhas ao organismo, existem fatores que inibem essa ativação. Em crustáceos foram isoladas duas proteínas, α -2-macroglobulina (190 kDa) e um inibidor de tripsina (154 kDa), que podem bloquear a atividade da enzima ativadora da pró-fenoloxidase (PPAE) assim impedindo a ativação da pró-fenoloxidase. Além dessas duas proteínas foi isolada uma proteína de 76 kDa em hemócitos de crustáceos, que tem como função promover a adesão celular, mediando a agregação e a dispersão dos hemócitos e modular a secreção da pró-fenoloxidase. Inibidores das proteases que atuam na ativação da pró-fenoloxidase também inibem a adesão celular dos hemócitos (revisão de Söderhäll *et al.*, 1998).

Ao lado da ativação da pró-fenoloxidase que é desencadeada imediatamente após um ferimento ou penetração de algum organismo invasor, outra reação que muitas vezes ocorre, é a coagulação da hemolinfa. Esse fenômeno vem sendo pouco estudado em insetos, no entanto em *Limulus* (Chelicerata) é

conhecido que a coagulação é ativada por uma cascata de serina-proteases, semelhante aquela da pró-fenoloxidase ([Figura 2](#)). Todos os componentes da reação de coagulação de *Limulus* já foram caracterizados a nível molecular (revisão de Iwanaga *et al.*, 1998). Essas proteases possuem funções homólogas aos componentes do sistema de complemento e aos fatores de coagulação dos mamíferos. Essas informações sugerem que todas essas cascatas proteolíticas podem ter uma origem comum (revisão de Iwanaga *et al.*, 1998).

Em algumas reações de defesa, uma série de substâncias, que estão presentes em pequenas quantidades na hemolinfa ou que aparecem somente no curso de uma infecção, têm sua síntese estimulada. Essas substâncias estão envolvidas no reconhecimento, na mediação da resposta imune-celular ou na ação direta antimicrobiana. Entre estas substâncias, as mais estudadas são as lectinas, hemolina e os peptídeos e as proteínas antimicrobianas (Sun *et al.*, 1990; Daffre & Faye., 1997; Andreu & Rivas, 1998; Mendoza & Faye, 1999; Kawabata & Iwanaga, 1999; Wilson *et al.*, 1999).

As lectinas são proteínas com afinidade por carboidratos e estão relacionadas a vários fenômenos de reconhecimento celular, incluindo adesão a hemócitos e microrganismos. Desempenham

portanto um papel importante na imunidade dos artrópodes, funcionando como opsoninas, ao se aderirem aos organismos invasores (revisões de Boman e Hultmark, 1987; Faye e Hultmark, 1993; Kawabata & Iwanaga, 1999; Wilson *et al.*, 1999;).

Hemolina é uma proteína encontrada em *Hyalophora cecropia* e *Manduca sexta*, induzível por infecção bacteriana. A concentração de hemolina na hemolinfa dos insetos não infectados é muito baixa, aumentando acentuadamente em resposta a uma infecção bacteriana. Esta proteína não apresenta atividade antibacteriana e através da seqüência de nucleotídeos de seu gene, verificou-se que ela faz parte da superfamília das imunoglobulinas. À família das imunoglobulinas pertencem as moléculas que funcionam como anticorpos em vertebrados e também várias proteínas envolvidas em adesão celular (Faye & Hultmark, 1993). A hemolina, está envolvida no reconhecimento e/ou modulação da adesão dos hemócitos aos organismos invasores durante a resposta imunológica de *Hyalophora* e *Manduca* (Faye & Hultmark, 1993; Daffre & Faye., 1997; Mendoza & Faye, 1999).

Muitas proteínas e peptídeos, induzíveis ou constitutivos, com atividade contra diferentes tipos de microorganismos, foram encontrados em quase todos os grupos de animais. Uma considerável variedade de peptídeos, apresentando diferentes

estruturas estão associados à atividade antimicrobiana em eucariotos. As primeiras classificações das proteínas e peptídeos antimicrobianos foram baseadas essencialmente na estrutura primária dessas macromoléculas, como por exemplo:

a) cecropinas: grupo de peptídeos lineares apresentando de 35 a 39 resíduos de aminoácidos, região amino-terminal fortemente básica e uma longa região carboxi-terminal hidrofóbica. Foram descobertas pela primeira vez na hemolinfa da mariposa *Hyalophora cecropia*, daí o seu nome (revisões de Boman, 1991; Faye e Hultmark, 1993);

b) defensinas: peptídeos ricos em cisteínas que apresentam três pontes dissulfeto, receberam este nome devido às similaridades na seqüência de aminoácidos com às defensinas dos vertebrados, um grupo de peptídeos líticos de macrófagos e neutrófilos (revisão de Boman, 1991; Hultmark, 1993);

c) atacinas: formam um grupo de proteínas lineares ricas em glicina com atividade contra bactérias Gram-negativas. Apresentam peso molecular em torno de 20 a 28 kDa (Revisões de Boman e Hultmark, 1987; Hultmark, 1993);

d) dipterocinas: grupo de peptídeos com aproximadamente 9 kDa e que apresentam similaridades nas seqüências de aminoácidos com as atacinas, também são ricos em glicina.

(Revisões de Hultmark et al., 1982; Boman e Hultmark, 1987; Hultmark, 1993).

e) peptídeos ricos em prolina: grupo de peptídeos que apresentam de 18 a 34 resíduos de aminoácidos, são ricos em prolina e com atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Como exemplo temos as apidecinas e as abecinas, encontradas em abelhas (revisão de Faye & Hultmark, 1993);

f) lisozimas: proteínas ricas em cisteínas com aproximadamente 14 kDa e com 4 pontes dissulfeto, são encontradas em diferentes seres vivos e, nos insetos são consideradas de grande importância na defesa imunológica (revisão de Faye & Hultmark, 1993).

A classificação mais atual considera a estrutura terciária: 1) proteínas e peptídeos lineares (randômicos) ricos em um ou mais tipos de aminoácidos, principalmente prolina ou glicina; 2) proteínas e peptídeos lineares que não possuem resíduos de cisteínas em sua sequência e que formam alfa-hélice; 3) proteínas e peptídeos cíclicos (com cisteínas em sua sequência) apresentando estruturas alfa-hélice e folha beta pregueada (Andreu & Rivas, 1998; Bulet *et al.*, 1999). Os autores, na classificação apresentada acima, consideraram como peptídeos cíclicos aqueles que fecham uma

estrutura com pontes dissulfeto.

Considerando que recentemente foram isolados e caracterizados peptídeos com cisteína que apresentam uma estrutura cíclica com terminação fechada (Tang *et al.*, 1999) será necessário fazer alterações à classificação feita por Andreu & Rivas (1998) e Bulet *et al.*, (1999) apresentada acima.

Os peptídeos antimicrobianos são tipicamente moléculas anfipáticas positivamente carregadas compostas de 12 a 45 resíduos de aminoácidos. O principal modo de ação destas moléculas é através do aumento da permeabilidade da membrana plasmática (Andreu & Rivas, 1998; Hancock & Lehrer, 1998). Uma correlação direta entre o efeito antibiótico e a habilidade de permeabilização foi encontrado para defensinas, magaininas, cecropinas, bactenecinas e dermaseptinas, entre outras (Andreu & Rivas, 1998). A primeira etapa no mecanismo de ação seria a interação eletrostática entre o peptídeo positivamente carregado e os componentes negativamente carregados da membrana do microorganismo e/ou parasita. Em uma etapa posterior, a interação entre a porção apolar da membrana das células e os resíduos hidrofóbicos das proteínas e peptídeos antimicrobianos culminariam na permeabilização das membranas.

Embora a maioria das proteínas e peptídeos antimicrobianos

descritos sejam fortemente positivos, foram descritos alguns peptídeos antimicrobianos negativamente carregados muito ativos e, provavelmente nestes casos, um modo diferente de ação possa estar envolvido (Andreu & Riva, 1998).

Peptídeos antimicrobianos estão amplamente distribuídos nos organismos. A ampla ocorrência dessas substâncias sugere que elas desempenham um papel importante na imunidade inata contra microorganismos e outros patógenos (Boman, 1995; Ganz & Lehrer, 1999; Hoffmann *et al.*, 1999). Nos artrópodes, as proteínas e os peptídeos antimicrobianos tem sido estudados principalmente em insetos, crustáceos e limulídeos. Nos insetos, os genes codificadores das proteínas e peptídeos antimicrobianos são induzidos por infecção e após algumas horas essas macromoléculas são secretadas no plasma (Hoffmann *et al.*, 1996; Engström, 1998; Manetti *et al.*, 1998). Já em alguns crustáceos tais como o camarão *Penaeus vannamei* (Destoumieux *et al.*, 2000), as proteínas e peptídeos antimicrobianos são sintetizados constitutivamente e ficam armazenados nos grânulos dos hemócitos. Nestes, a presença de organismos invasores induz a liberação destas moléculas para o plasma.

Nos últimos 20 anos, diversos desses peptídeos antimicrobianos foram isolados e caracterizados em invertebrados

incluindo representantes de duas classes de quelicerados: limulídeos (merostomata) (para revisão, ver Iwanaga *et al.*, 1998), escorpiões (arachnida) (Cociancich *et al.*, 1993; Ehret-Sabatier *et al.*, 1996) e carrapatos (arachnida) (Johns *et al.*, 1998; Fogaça *et al.*, 1999). Os hemócitos dos limulídeos contêm vários peptídeos positivamente carregados ricos em cisteína (taquiplesina, polifemusina, taquicitina, taquistatina e "big-defensina") com efeitos inibitórios sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos. Além disso, duas proteínas (fator anti-LPS e fator D) que não apresentam cisteínas, são produzidas em resposta a uma infecção microbiana, atuando principalmente contra bactérias Gram-negativas. As taquiplesinas e polifemusinas, estão localizadas em pequenos grânulos nos hemócitos, onde estão também as taquicitinas e as taquistatinas, enquanto que os fatores anti-LPS e D são encontrados nos grânulos grandes e a "big-defensina" em ambos os tipos de grânulos (revisão de Iwanaga *et al.*, 1998). Além deste grupo de quelicerados, diversas proteínas e peptídeos antimicrobianos foram caracterizados na hemolinfa dos escorpiões. Foi caracterizado na hemolinfa dos escorpiões *Leiurus quinquestriatus*, não submetidos a desafio bacteriano, uma molécula semelhante às defensinas de insetos e com atividade contra bactérias Gram-positivas (Cociancich *et al.*, 1993). Em

Androctonus australis, também não submetidos a desafio bacteriano, três distintos peptídeos antimicrobianos foram caracterizados na hemolinfa: androctonina, butinina e uma defensina (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996). A defensina é semelhante à defensina encontrada em *L. quinquestriatus*. Androctonina, é um peptídeo com 25-resíduos de aminoácidos e quatro resíduos de cisteína, ativo contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Androctonina mostra similaridade na seqüência com taquiplesinas e polifemusinas. O outro peptídeo, a butinina, apresenta 34 resíduos de aminoácidos com três pontes dissulfeto, não mostrando similaridade com qualquer seqüência conhecida de peptídeos antimicrobianos. Enquanto que a defensina e a androctonina são ativas contra fungos e bactérias, a butinina apresenta somente atividade antibacteriana.

Em carrapatos foram isolados dois fatores antibacterianos da hemolinfa de *Dermacentor variabilis* que apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas. A concentração desses fatores é aumentada por infecção bacteriana. Um desses fatores apresenta massa de 14,5 kDa e apresenta semelhanças com lisozima (Johns *et al.*, 1998).

No carrapato do boi *Boophilus microplus* foi detectada atividade antibacteriana e antifúngica na hemolinfa e no conteúdo

intestinal de animais não desafiados por infecção bacteriana. No plasma foi identificado um fator antibacteriano com 10 kDa de massa molecular sem similaridade na sua seqüência N-terminal com outras moléculas antimicrobianas. Um dos fatores responsáveis por essa atividade no conteúdo intestinal é um peptídeo com massa molecular de 3,2 kDa e seu seqüenciamento revelou que se tratava do fragmento 33-61 da cadeia α da hemoglobina bovina (Fogaça *et al.*, 1999). Esse fragmento com atividade antimicrobiana parece ser gerado no intestino dos carrapatos por clivagem enzimática da hemoglobina bovina. Como durante a alimentação sangüínea esses animais ficam susceptíveis à infecções pelas bactérias presentes no couro do bovino e/ou que infectem o animal, a clivagem da hemoglobina gerando fragmentos com atividade antimicrobiana torna-se importante para a proteção dos carrapatos.

Em adição aos peptídeos estritamente antimicrobianos encontrados nos quelicerados, outras moléculas com propriedades antibacterianas foram recentemente isoladas do veneno das aranhas *Lycosa carolinensis* (Yan & Adams, 1998) e *Cupiennius salei* (Haeberli *et al.*, 2000). Na aranha *L. carolinensis*, duas toxinas (licotoxinas I e II) contendo 25-27 aminoácidos e não apresentando resíduos de cisteínas, exibem propriedades de dissipar gradientes

de voltagem através de membranas de células excitáveis e provavelmente contribuem para a paralisia da presa envenenada. Além desta atividade, Yan & Adams (1998) mostraram que estas toxinas exibem atividade antibacteriana. Elas apresentam forte similaridade em seqüência com alguns peptídeos antimicrobianos de sapos, tais como magainina, adrenoregulina, e dermaseptinas (Yan & Adams, 1998). Na aranha, *C. salei* cinco toxinas com massa molecular entre 3 e 4 kDa foram isoladas a partir do veneno. Estas toxinas apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Haeberli *et al.*, 2000).

Embora existam muitos trabalhos sobre a resposta imunológica em artrópodes, eles estão praticamente restritos aos insetos, crustáceos e limúlídeos. O estudo de outros grupos de artrópodes pode ser importante para se entender o processo imunológico de uma maneira mais ampla, possibilitando compreender as relações existentes entre os vários sistemas bem como sua origem. Nesse sentido, a utilização de aranhas como modelo experimental vem preencher essa lacuna. Como não existem métodos de controle adequados e como algumas espécies têm se tornado de grande importância epidemiológica em algumas regiões do país, devido a sua íntima relação com o homem, esses estudos poderiam auxiliar nesse sentido. O conhecimento dos

mecanismos de defesa imunológica podem fornecer subsídios para um controle mais eficiente e menos danoso para o ser humano e ao ambiente.

Não existem dados na literatura sobre o sistema imunológico das aranhas, a maior parte dos trabalhos se restringe à descrição dos tipos de hemócitos e suposições quanto as suas funções neste sistema. É provável que os hemócitos tenham um papel na coagulação e na cicatrização de feridas. Parece também que certos hemócitos agem como fagócitos ou como granulócitos (Foelix, 1996).

Como quase todas as aranhas da família Theraphosidae do novo mundo, *A. gomesiana* apresenta pêlos urticantes situados no dorso do abdome. A aranha, quando se sente ameaçada ou quando é manipulada, raspa os pêlos do abdome, utilizando espinhos presentes nas patas posteriores, lançando-os contra um inimigo em potencial (Cooke et al., 1972). Esses pêlos provocam reações mecânico-inflamatórias nas mucosas e pele (Cooke et al., 1972) além de reações alérgicas de certa gravidade (Morato Castro, 1987).

Como não existem relatos na literatura sobre peptídeos com atividade antimicrobiana provenientes da hemolinfa de aranhas, a caracterização dos mesmos nesta classe de quelicerados pode ser

de grande valor para entender aspectos evolutivos da imunidade inata. Dessa maneira, o uso de aranhas migalomorfas como modelo experimental é muito útil, uma vez que elas pertencem a um grupo dos mais antigos da ordem Araneae. Uma outra característica que torna o estudo de aranhas migalomorfas interessante está no fato de apresentarem alta longevidade, quando comparadas com outros invertebrados e mesmo com a maioria das aranhas. Algumas fêmeas das grandes caranguejeiras podem viver mais de 20 anos (Livros de registros do Instituto Butantan; Foelix, 1996). As aranhas, como todos os artrópodes, apresentam um exoesqueleto e para o crescimento passam pelo processo da muda. Em geral, na maioria das aranhas, quando é atingido o estágio reprodutivo, cessa o crescimento e conseqüentemente as trocas do exoesqueleto. Nas aranhas caranguejeiras (Mygalomorphae), diferentemente das outras aranhas, as fêmeas adultas continuam realizando a muda uma vez ao ano ou em intervalos irregulares. Quanto maior a longevidade de uma aranha maior o número de mudas de crescimento. Durante o processo de muda ou ecdise as aranhas, como todos os artrópodes, estão sujeitos a uma série de perigos como a ruptura acidental da cutícula e conseqüentemente a perda de hemolinfa, assim como ao ataque de parasitas. Durante o processo da muda elas também estão mais sujeitas a infecção por

fungos e bactérias. Sendo assim, devem apresentar mecanismos de defesa imune muito bem elaborados, que podem contribuir para sua longevidade.

Neste trabalho, nosso objetivo foi iniciar o estudo do sistema imunológico em aracnídeos, utilizando a aranha caranguejeira *A. gomesiana*, como modelo experimental. Nosso intuito foi verificar se as aranhas eram capazes de apresentar uma resposta imune através da produção de substâncias antimicrobianas como observado em outros artrópodes. Dessa forma, através da purificação e caracterização de moléculas presentes na hemolinfa procuramos avaliar a presença de moléculas ativas contra microorganismos e portanto envolvidas no sistema imune dessa aranha. A caracterização dessas moléculas e avaliação dos seus modos de ação podem contribuir para um entendimento mais amplo dos processos envolvidos no sistema imune de aracnídeos e dos artrópodes em geral. Além disso a descrição e caracterização de novas moléculas com atividade antimicrobiana podem contribuir também para a produção e utilização de novas drogas para uso na medicina e na agricultura.

[Índice](#)

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1- Animais e Coleta de Hemolinfa

Acanthoscurria gomesiana (Theraphosidae, Mygalomorphae) ([Figura 3](#)) é uma aranha caranguejeira de porte médio (5cm de comprimento) encontrada na região nordeste do Estado de São Paulo (com exceção do litoral) e sudeste de Minas Gerais. Na natureza é encontrada sob troncos caídos e pedras, em cupinzeiros, junto às raízes de grandes árvores e nos pastos, e não constroem teia de caça. Com a urbanização tem se tornado uma aranha de hábitos peridomiciliares, muito bem adaptada ao lixo urbano, de onde provém o seu principal alimento, as baratas. São aranhas de comportamento agressivo e que picam com facilidade quando molestadas. Está entre as aranhas caranguejeiras que mais provocam acidentes na região metropolitana de São Paulo (Lucas *et al.*, 1994). *A. gomesiana* está entre as aranhas recebidas mais freqüentemente pelo Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), vindo principalmente das regiões periféricas da cidade de São Paulo bem como das cidade vizinhas que compõem a grande São Paulo.

Usou-se nos experimentos exemplares da aranha *A. gomesiana*, de ambos os sexos, recebidas e mantidas pelo Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil).

A hemolinfa (aproximadamente 0,4 ml / aranha), de animais de diferentes estágios de desenvolvimento e sexo, foi coletada, de animais previamente resfriados, por punção do vaso dorsal ([Figura 4](#)) utilizando-se seringa apirogênica. Para evitar a desgranulação dos hemócitos e conseqüente coagulação da hemolinfa, esta foi coletada na presença de tampão citrato de sódio (NaCl 0,45M; glicose 0,1M; citrato trissódico 30mM; ácido cítrico 26mM; EDTA 10mM), pH 4,6 (2 volumes de hemolinfa:1 volume de tampão) (Söderhäll e Smith, 1983). Os hemócitos foram separados do plasma por centrifugação a 800 x g durante 10 min a 4⁰C, e então, após terem sido lavados no tampão citrato de sódio, foram secos em uma centrífuga a vácuo (Savant Instruments, Inc). O plasma também foi seco por concentração a vácuo (Savant Instruments, Inc).

[índice](#)

2- Imunização experimental das aranhas

Para imunização experimental, 50 μ l de *Enterobater cloacae* β -12 (2×10^5 células). foram injetados na região dorso lateral do abdome de 3 aranhas. A hemolinfa dessas aranhas foi coletada antes e após vários tempos de inoculação e os hemócitos foram isolados do plasma como descrito anteriormente ([Materiais e Métodos, item 1](#)).

3- Extração e Purificação de Peptídeos Antimicrobianos

3.1- Plasma

O plasma (1,8ml), de aranhas não imunizadas, após concentração em uma centrífuga a vácuo (Savant Instruments, Inc) foi ressuspendido em água Milli-Q acidificada [ácido trifluoracético (TFA) 0,05%] (20 vezes o volume de hemolinfa coletada) na presença do inibidor de protease, aprotinina (concentração final de 20 μ g/ml). O pH foi ajustado para aproximadamente 3,3 e a solução mantida em um banho de gelo durante 30 minutos, com agitação constante. O sobrenadante, obtido por centrifugação a 13.800 x g

por 30 minutos a 6°C, foi aplicado em duas colunas Sep-Pak C18 (Waters Associates) ligadas em série, equilibradas com água acidificada, com o objetivo de pré-purificar os peptídeos antimicrobianos. Três estágios de eluição foram realizados utilizando-se sucessivamente diferentes concentrações de acetonitrila (5%, 40%, e 80%) em água acidificada.

As frações eluídas a 5%, 40% e 80% de acetonitrila, obtidas na etapa anterior foram concentradas em centrífuga a vácuo, reconstituídas com água Milli-Q e submetidas à cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). A purificação por HPLC foi realizada à temperatura ambiente utilizando-se o sistema HPLC Beckman Gold equipado com detector fotodiodo “array” Beckman 168 ou o sistema HPLC Shimadzu, também equipado com detector fotodiodo “array”. A absorbância do efluente foi monitorada a 225 nm. As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente, concentradas em uma centrífuga a vácuo (Savant Instruments, Inc), e reconstituídas em água Milli-Q. A presença de atividade antibacteriana nestas frações foi determinada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido (organismos testes: *Micrococcus luteus* A270 e *Escherichia coli* SBS 363) ([Materiais e Métodos, item 4.8.2.2](#)) em cada etapa de purificação dos peptídeos.

As frações (5%, 40%, e 80% de acetonitrila) foram aplicadas em uma coluna cromatográfica de fase reversa semipreparativa do tipo RP300 C8 (250mm x 7.0mm, Brownlee™) e as eluições foram realizadas por gradientes de acetonitrila em água acidificada de 0 a 20%, 2 a 60% e 20 a 80%, respectivamente, por 120 min, sob um fluxo de 1,3 ml/min.

A fração com atividade antibacteriana (**AGP2**) obtida no gradiente de 2 a 60% de acetonitrila passou por uma etapa de purificação por HPLC utilizando-se uma coluna de fase reversa analítica do tipo RP300 C8 (250mm x 4.6mm, Brownlee™) em um gradiente linear bifásico de 2 a 18% (10 min) e 18 a 28% (50 min) de acetonitrila em água acidificada, sob um fluxo de 0,8 ml/min.

[Índice](#)

3.2 - Hemócitos

Após a concentração em centrífuga a vácuo, o material originado dos hemócitos, obtidos a partir da hemolinfa de aranhas não desafiadas (1,8 ml) foram homogenizados em Homogenizador Dounce em 1,5 ml de ácido acético 2M na presença de aprotinina (concentração final de 20 µg/ml). O homogeneizado foi submetido à sonicação (3x 30 s) a meia força (Branson Ultrasons Annemasse) em um banho de gelo, sendo esta preparação a seguir mantida com agitação durante 30 minutos. O sobrenadante, obtido por centrifugação a 13.800 x g por 30 minutos a 6°C, foi aplicado em quatro colunas Sep-Pak C18 (Waters Associates) ligadas em série, equilibradas com água acidificada, com o objetivo de pré-purificar os peptídeos antimicrobianos. Três estágios de eluição foram realizados utilizando-se sucessivamente diferentes concentrações de acetonitrila (5%, 40%, e 80%) em água acidificada.

As frações 5%, 40%, e 80% obtidas na etapa anterior foram concentradas em centrífuga a vácuo, reconstituídas com água Milli-Q e submetidas à cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Estas frações (5%, 40%, e 80% de acetonitrila) foram aplicadas em uma coluna de fase reversa semipreparativa do tipo RP300 C8 (250mm x 7.0mm, BrownleeTM), sendo eluídas com gradientes de

acetonitrila em água acidificada de 0 a 20%, 2 a 60% e 20 a 80%, respectivamente, por 120 min, sob um fluxo de 1,3 ml/min. As frações coletadas foram concentradas à vácuo, e reconstituídas em água Milli-Q. A presença de atividade antibacteriana foi analisada por ensaios de inibição de crescimento em meio líquido ([Materiais e Métodos, item 4.8.2.2](#)).

Os fatores (**AGH1**, **AGH2** e **AGH3**) com atividade antibacteriana presentes nas frações obtidas no gradiente de 2 a 60% de acetonitrila foram submetidos a outras etapas de purificação utilizando-se diferentes métodos. **AGH1** e **AGH2** foram submetidos a uma etapa de purificação por cromatografia de filtração utilizando-se duas colunas do tipo HPLC-SEC (Colunas Ultraspherogel SEC3000 e SEC2000, 300 x 7,5 mm, Beckman™) ligadas em série e protegidas por uma pré-coluna (Ultraspherogel SEC, 40 x 7,5 mm Beckman™). A eluição foi realizada sob condições isocráticas com acetonitrila 30% em água acidificada sob um fluxo de 0,4 ml/min.

Alternativamente, a fração 40% de acetonitrila obtida na extração de fase sólida foi concentrada em centrífuga a vácuo, reconstituída com água Milli-Q e submetida à cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) utilizando-se coluna de fase reversa semipreparativa Jupiter C18 (250mm x 10mm). A eluição foi

realizada em gradiente de acetonitrila em água acidificada de 2 a 60% por 120 min., sob um fluxo de 1,3 ml/min. **AGH1** e **AGH2** foram submetidos a uma etapa de purificação por cromatografia de filtração utilizando-se a coluna Superdex Peptide HR 10/30 (300 x 7,5 mm, Pharmacia Biotech). A eluição foi realizada sob condições isocráticas com acetonitrila 30% em água acidificada sob um fluxo de 0,5 ml/min.

AGH3 foi submetido a uma etapa de purificação por cromatografia de fase reversa utilizando-se uma coluna analítica do tipo RP300 C8 (250mm x 4.6mm, Brownlee™) em um gradiente linear bifásico de 2 a 22% (10 min.) e 22 a 32% (50 min.) de acetonitrila em água acidificada (TFA 0,046%), sob um fluxo de 0,8 ml/min. Alternativamente, AGH3 foi purificado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) utilizando-se uma coluna de fase reversa analítica Vydac C18 (250mm x 4.6mm, Vydac™) em um gradiente linear bifásico de 2 a 29% (10 min.) e 29 a 39% (50 min.) de acetonitrila em água acidificada sob um fluxo de 0,8 ml/min.

[Índice](#)

4- Caracterização Estrutural

4.1- Eletroforese de zona capilar (CZE):

Durante as diferentes etapas de purificação as frações contendo atividade foram analisadas por Eletroforese de Zona Capilar (CZE). A eletroforese foi efetuada utilizando-se um sistema de eletroforese capilar Modelo 270A-HT (PE Applied Biosystems) equipado com capilar de sílica fundida (72 cm de comprimento, 50 µm de diâmetro interno). O volume injetado sob vácuo foi de 2 nl e a separação foi feita do anodo para o catodo, sob uma voltagem de 20 kV a 30⁰C, utilizando-se o tampão citrato 20 mM (pH 2,5), condições apropriadas para a separação de peptídeos positivamente carregados. A análise da corrida eletroforetica foi realizada pela medida da absorção de luz a 200nm.

[Índice](#)

4.2- Espectrometria de Massa - MALDI-TOF-MS

A espectrometria de massa foi utilizada para: controlar a pureza das moléculas durante as etapas de purificação, avaliar a massa das moléculas apresentando atividade antimicrobiana, determinar o número de cisteínas presentes em uma molécula, por comparação das massas após redução e alquilação, e identificar os fragmentos peptídicos após a hidrólise enzimática da molécula. O aparelho utilizado para essas medidas foi um espectrômetro de massa do tipo Bruker BIFLEXTM (Bruker, Bremen).

Os peptídeos depositados em uma fina camada de cristais de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico são sublimados com o uso de laser (337 nm) e se ionizam pela aquisição de prótons e de elétrons. Os íons obtidos, em geral são dos tipos $(M+H)^+$, $(M+H)$, $(M+Na)^+$. Eles são acelerados através de um campo elétrico sendo direcionados para o analisador. O analisador de tempo de voo (TOF) associado a este sistema de ionização permite determinar a relação massa/carga (m/z) dos íons formados, medindo o tempo que um íon leva para conseguir atingir o detector. A velocidade adquirida por um íon acelerado por uma dada energia dentro de um campo elétrico é inversamente proporcional a sua relação m/z . Os íons são portanto detectados em ordem crescente. A detecção pode ser efetuada em modo positivo ou negativo dependendo da natureza da

carga dos íons que são formados. Este tipo de espectrometria de massa recebe o nome de MALDI-TOF-MS (Matrix assisted laser desorption/ionisation – Time of flight – Mass spectrometry).

As análises foram realizadas operando em modo linear positivo como descrito por Uttenweiler-Joseph *et al.* (1997). Resumidamente, os peptídeos (0,5uL) foram depositados sobre uma fina camada de cristais de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico obtida por evaporação rápida de uma solução saturada do ácido em acetona. Após uma lavagem rápida, do material aplicado, com 1uL de TFA 0,1%, a preparação foi seca sob vácuo antes da introdução no espectrômetro de massa. Os espectros de massa foram obtidos pela média de 50-100 pulsos de laser. Os espectros de massa do tipo MALDI foram calibrados usando uma mistura de peptídeos padrões: angiotensina II, corticotropina (18-39) e insulina bovina com MH^+ apresentando a relação massa/carga (m/z) de 1047,2; 2466,1; e 5734,6, respectivamente.

[índice](#)

4.3- Redução e Alquilação de AGH2

O peptídeo purificado foi submetido à redução e alquilação usando os procedimentos descritos por Bulet *et al.* (1992). Uma alíquota do peptídeo (2 nmol) foi dissolvida em 40 µL de Tris-HCl 0,5 M contendo ácido etilenodiaminotetra acético (EDTA) 2 mM e hidrocloreto de guanidina 6 M, pH 7,5, ao qual 2 µL de ditioneitol 2,2 M foram adicionados. A amostra foi mantida sob atmosfera de nitrogênio durante a incubação por 1 h a 45°C, protegida da luz. Após a incubação a amostra foi adicionada de 2 µL de 4-vinilpiridina pura, e incubada por um tempo adicional de 10 min nas mesmas condições descritas anteriormente. O peptídeo S-piridiletilado foi purificado utilizando-se uma coluna Aquapore RP300 C8 (220mm x 4.6mm, BrownleeTM) usando um gradiente linear de 2-60% de acetonitrila em água acidificada, por 120 min sob um fluxo de 0,8 ml/min.

[Índice](#)

4.4- Clivagem Enzimática de AGH2

4.4.1- Tratamento com Piroglutamato Aminopectidase

Para a remoção do piroglutamato N-terminal o peptídeo S-piridiletilado (2 nmol) foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM contendo EDTA 10 mM, ditioeritritol 5 mM, glicerol 5% (v:v), piroglutamato aminopectidase (Boehringer Mannheim), numa razão enzima/substrato de 1:20 (p/p), pH 8 e, incubado por 12 horas a 37°C. A mistura de reação foi submetida à cromatografia de fase reversa utilizando-se uma coluna microbore (100 mm x 1 mm, Aquapore RP300 C8, Brownlee™), eluída com gradiente linear de 2 a 60% de acetonitrila em água acidificada, por 60 min sob um fluxo de 80 µl/min a 35°C. Os picos eluídos foram analisados por MALDI-TOF-MS e o fragmento correspondente ao peptídeo sem o grupo piroglutamil foi microsequenciado por degradação de Edman ([Materiais e Métodos, item 4.5](#)).

[Índice](#)

4.4.2- Tratamento de AGH2 com Tripsina

O peptídeo **AGH2** foi tratado com tripsina (Boehringer Mannheim) numa razão enzima/substrato de 1:20 (p/p) em 40 µL de reação contendo 0,1 M de Tris-HCl, pH 7,5. A incubação foi realizada por 16 horas a 37°C. A reação foi interrompida por acidificação do meio com TFA 0.1%. Os fragmentos foram separados em uma coluna Delta Pak HPI C18 (150mm x 2mm, Waters AssociatesTM) usando-se um gradiente linear de 2-80% de acetonitrila em água acidificada, por 90 min sob um fluxo de 0.2ml/min. Os fragmentos foram analisados por MALDI-TOF-MS e microseqüenciados por degradação de Edman ([Materiais e Métodos, item 4.5](#)).

[Índice](#)

4.5- Seqüenciamento amino-terminal

Os seqüenciamentos dos peptídeos purificados foram realizados em um seqüenciador automático de pulso líquido (Applied Biosystems Model 473A) utilizando-se a degradação de Edman.

Para recuperar as cisteínas, os peptídeos foram reduzidos e alquilados como descrito anteriormente ([Materiais e Métodos, item 4.3](#)).

4.6- Determinação da Composição de Aminoácidos de AGH1

O peptídeo **AGH1** foi submetido a hidrólise ácida por HCl 6N na presença de ácido perfórmico 4% (v/v), a 135⁰C por 3 horas. Após a hidrólise, a composição de aminoácidos de **AGH1** foi determinada em um analisador automático Beckman 7300 em estação de trabalho PicoTag (Waters).

[índice](#)

4.7- Síntese Química de AGH2

Os peptídeos foram sintetizados de acordo com o método clássico Fmoc, como descrito por Ehret-Sabatier *et al.* (1996). Dois tipos do peptídeo **AGH2** foram sintetizados, um com a arginina C-terminal amidada e outro sem amidação.

Resumidamente, um protocolo padrão Fmoc foi utilizado em conjunto com benzotriazol-1-il-oxitris(dimetilamina)fosfônio hexafluorofosfato/*N*-hidroxibenzotriazola/diisopropiletilamina. As reações de acoplamento foram realizadas por 15 minutos. Após duas lavagens com dimetilformamida, um segundo acoplamento com o mesmo excesso de reagentes foi realizado. No final da síntese, a resina foi lavada com diclorometano e éter e então seca sob atmosfera de nitrogênio. A clivagem final com ácido trifluoroacético foi realizada no mesmo recipiente de reação com 5 ml do reagente descrito por King *et al.*, (1990) por 150 min. No final, os peptídeos foram colocados em tubo de polipropileno de 40ml para centrifuga contendo 25ml de éter etílico gelado. A suspensão de peptídeos resultante foi então centrifugada e o sedimento lavado duas vezes com éter.

Uma vez sintetizados, os peptídeos foram dissolvidos através de sonicação em 15 ml de ácido acético puro. As soluções obtidas

foram lentamente adicionadas a um tampão acetato de amônio 0,1M e o pH ajustado para pH 8,5, com hidróxido de amônio. O volume das soluções finais de renaturação dos peptídeos foi de 2,5 l. A renaturação dos peptídeos foi realizada em temperatura ambiente por 17 horas, sob agitação constante para melhor oxigenação.

As soluções de renaturação dos peptídeos tiveram o pH ajustado para 4 com ácido acético puro e foram aplicadas em colunas Sep-Pak Vacc C18 (Waters Associates) equilibradas com água acidificada. Os sais foram removidos por lavagem das colunas com 200 ml de água acidificada. Os peptídeos foram eluídos com 150 ml de acetonitrila 60% em água acidificada, concentrados em centrífuga a vácuo e purificados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), utilizando-se coluna de fase reversa semipreparativa Aquapore RP300 C8 (250mm x 7.0mm, BrownleeTM). Os peptídeos sintetizados e purificados foram reduzidos e alquilados ([Materiais e Métodos, item 4.3](#)) e comparados com o peptídeo nativo através de análises por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF-MS para verificação da formação correta das pontes dissulfeto.

[Índice](#)

4.8- Bioensaios

4.8.1- Microorganismos

Bacillus megaterium (ATCC 10778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 7080), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341 A), *Serratia marcesens* (ATCC 4112), e *Staphylococcus epidermides* (ATCC 12228) foram obtidos da Coleção Americana de Tipos de Cultura (ATCC). *Pseudomonas aeruginosa* (IAL 1025) foi obtida da Coleção de Cultura do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Brasil (IAL). *Escherichia coli* D31 e *Enterobacter cloacae* β -12 foram obtidas junto ao Dr. H. G. Boman da Universidade de Estocolmo, Suécia. *Escherichia coli* SBS 363 e *Micrococcus luteus* A270 foram obtidas da coleção do Instituto Pasteur, Paris. *Aspergillus nidulans* (UT196) foi obtido da coleção da Universidade de Utrecht, Holanda. *Candida albicans* (MDM8) foi obtida da Coleção do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil. Os outros microorganismos utilizados nos experimentos foram obtidos das coleções citadas em Bulet *et al.*, 1991, Fehlbaum *et al.*, 1994, Conciancich *et al.*, 1994 e Lamberty *et al.*, 1999.

[Índice](#)

4.8.2- Atividade Antimicrobiana

Dois diferentes tipos de procedimentos foram utilizadas para avaliar a atividade antibacteriana: ensaio de zona de inibição de crescimento bacteriano (Hultmark *et al.*, 1980) e ensaio de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido (Bulet *et al.*, 1993). A atividade antifúngica foi determinada utilizando-se o ensaio de inibição de crescimento em meio líquido descrito em Fehlbauer *et al.* (1994). A medida da absorbância das culturas, após as incubações, foi realizada a 595nm em um leitor de microplaca IEMS (LABSYSTEM™). A mínima concentração inibitória (MCI) foi expressa como intervalo de concentrações [a] - [b], onde [a] é a máxima concentração do peptídeo testada na qual os microorganismos estão crescendo e [b] é a menor concentração que causa 100% de inibição do crescimento.

[Índice](#)

4.8.2.1- Ensaio de Zona de Inibição de Crescimento

Bacteriano

As amostras (2 µl) de hemolinfa das aranhas foram aplicadas em poços de uma placa de Petri, contendo 6ml de meio de cultura Lúria-Bertani (LB) com ágar 1% na qual foram semeadas bactérias. Neste ensaio, a atividade antibacteriana é detectada após 18 horas de incubação a 37⁰C, pela formação de um halo sem crescimento bacteriano, em volta do poço onde a amostra foi aplicada (Hultmark *et al.*, 1980).

4.8.2.2- Ensaio de Inibição de Crescimento em Meio

Líquido

A 10µl da fração a ser testada ou de água (controle), aplicados em poços de uma microplaca, são adicionados 90µl de meio de cultura pobre em nutrientes [PB: bacto-peptona 1%; NaCl 0,5% (m:v); pH 7,4] contendo uma suspensão de uma cultura de bactérias em fase logarítmica de crescimento. O crescimento bacteriano é avaliado por medida da absorbância da cultura

([Materiais e Métodos, item 4.8.2](#)), após 18 horas de incubação a 30⁰C. Este procedimento é baseado nos ensaios descritos por Bulet *et al.* (1993).

4.8.2.3- Ensaio Bactericida

O ensaio bactericida foi realizado com *M. luteus* A270 ou *E. coli* D22. Culturas dessas bactérias, na fase logarítmica (partindo-se de 0,15 unidade de absorbância a 600 nm), em meio nutriente rico Luria-Bertani ((Bacto-Tryptona 1%, extrato de levedura 0.5%, e NaCl 1% (w/v)) foram incubadas a 30⁰C na presença de AGH2 ou água (controle). A concentração final de AGH2 testada com *M. luteus* A270 e *E. coli* D22 foi de 10µM. Alíquotas das culturas tratadas foram removidas em diferentes intervalos de tempo e semeadas em placa de Petri contendo agar nutriente [meio nutriente Luria-Bertani (Bacto-Tryptona 1%, extrato de levedura 0.5%, e NaCl 1% (w:v)) e agar 1,5%]. O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi determinado após 18 horas de incubação a 37⁰C.

4.8.2.4- Ensaio Antifúngico

Fungos e leveduras (concentração final: 10^4 células/ml) foram ressuspensos em um meio de crescimento contendo dextrose de batata 1,2% (m:v) (Difco; "half strength") suplementado com tetraciclina ($10\mu\text{g/ml}$). Alíquotas de $80\mu\text{L}$ dessa suspensão foram dispensadas em poços de uma microplaca contendo $20\mu\text{L}$ de água ou da fração a ser analisada.

O crescimento dos fungos e leveduras foi observado microscopicamente após 24 horas de incubação a 25°C , em câmara úmida, e avaliado por medida da absorbância da cultura a 595nm ([Materiais e Métodos, item 4.8.2](#)) após 48h de incubação na mesma temperatura.

4.8.2.5- Ensaio Fungicida

Esporos de *Neurospora crassa* foram ressuspensos em um meio de crescimento contendo dextrose de batata 1,2% (m:v) (Difco; "half strength") e incubados na presença de $10\mu\text{M}$ de **AGH2** amidada. Após diferentes tempos de incubação (0,5; 1; 2; 4 e 8

horas), alíquotas dessa suspensão foram coletadas, os esporos removidos por centrifugação e colocados em meio de cultura fresco. Essa suspensão foi incubada novamente em câmara úmida a 25⁰C. Após 48 horas de reincubação, a cultura foi examinada microscopicamente e espectrometricamente a 595nm ([Materiais e Métodos, item 4.8.2](#)).

4.8.3- Ensaio antiparasítico

Para o ensaio antiparasítico, avaliamos a ação do peptídeo sintético **AGH2** amidado contra promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (MPRO/BR/72M 1841-LV-79). Os parasitas foram incubados, por 1 h a 22⁰ C, com diferentes concentrações de **AGH2** utilizando-se água como controle. A medida de viabilidade celular dos parasitas foi realizada utilizando-se o ensaio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio] como descrito por Mosmann (1983) e adaptado para *Leishmania* spp (Kiderlen & Kaye, 1990).

4.8.4- Ensaio Hemolítico

O ensaio para atividade hemolítica foi realizado com eritrócitos humanos. Diluições seriais de 0,1 a 100 μ M dos peptídeos sintéticos **AGH2** amidado e não amidado foram incubadas com uma suspensão de eritrócitos (0,4%) em solução salina fosfato-tamponada (NaCl 0,14M; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10mM e KH₂PO₄ 1,8mM, pH 7,4). Como controle positivo (100% de lise), uma solução de SDS 1% foi usada em substituição aos peptídeos. Após uma hora de incubação a 37°C, as amostras foram centrifugadas (320 xg, 5 min) e a absorbância do sobrenadante (50uL) foi medida a 405nm ([Materiais e Métodos, item 4.8.2](#)).

[Índice](#)

III - RESULTADOS

Utilizando-se ensaios de inibição de crescimento em meio sólido foi detectada atividade antibacteriana no extrato ácido de plasma e de hemócitos de aranhas não desafiadas por infecção bacteriana ([Tabela I](#)). O extrato ácido de plasma apresentou atividade contra as bactérias Gram-positivas *M. luteus* e *B. megaterium*. O extrato ácido de hemócitos apresentou atividade contra todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. Em ensaios de inibição de crescimento em meio líquido detectamos atividade contra o fungo *A. nidulans* e contra a levedura *C. albicans*, tanto do extrato ácido do plasma como dos hemócitos ([Tabela I](#)).

Aranhas foram injetadas na região dorso lateral do abdome com *Enterobater cloacae* β -12 (2×10^5 células) e tiveram a hemolinfa coletada antes e após 2 e 10 dias da inoculação bacteriana. O plasma e hemócitos foram separados, submetidos à extração ácida e a atividade antibacteriana avaliada por ensaios de inibição de crescimento em meio líquido.

Já que foi observada atividade antimicrobiana nos extratos ácidos de plasma e de hemócitos de aranhas não imunizadas e, que os ensaios com aranhas imunizadas experimentalmente

mostraram atividade antimicrobiana similares antes e após a imunização experimental, decidimos purificar os compostos antimicrobianos utilizando-se como material inicial a hemolinfa de aranhas não imunizadas.

[índice](#)

1- PEPTÍDEOS DO PLASMA

1 - Purificação e caracterização de AGP2

As proteínas e peptídeos do plasma extraídos com ácido trifluoracético (TFA) foram submetidos a uma extração em fase sólida. As três frações obtidas, eluídas a 5, 40, e 80% de acetonitrila, foram submetidas à cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). As frações obtidas nas cromatografias tiveram a atividade antibacteriana avaliada utilizando-se *M. luteus* A270 e *E. coli* SBS 363.

Foi observada atividade anti-*M. luteus* A270 em duas frações obtidas na cromatografia da fração eluída com 40% de acetonitrila na pré-purificação por extração sólida ([Figura 5](#))

Um dos fatores anti-*M. luteus* A270, **AGP1**, inibiu parcialmente enquanto que o outro fator, **AGP2** inibiu totalmente o crescimento de *M. luteus* A270. Como inibiu **AGP1** parcialmente o crescimento bacteriano resolveu-se, nesta fase, trabalhar-se apenas com **AGP2**.

A análise por MALDI-MS revelou que **AGP2** não estava totalmente puro, por isso o material foi submetido a uma segunda etapa de purificação utilizando-se cromatografia líquida de alta resolução

(HPLC) com uma coluna analítica de fase reversa. O gradiente de acetonitrila foi ampliado para possibilitar uma melhor separação das proteínas e peptídeos ([Figura 6](#)). Nesta cromatografia apenas uma fração apresentou atividade contra *M. luteus* A270. A análise por MALDI-TOF-MS da fração contendo o fator antibacteriano purificado revelou dois picos, um correspondente ao íon monocarregado com valor de m/z igual a 4053,5 e o outro ao íon duplamente carregado com valor de m/z igual a 2027,7 ([Figura 7](#)). Essa análise mostrou que o fator **AGP2** estava puro e apresentava uma massa molecular de 4052,5 Da. Este peptídeo foi denominado theraphosinina em referência ao nome da subfamília a que pertence *A. gomesiana*, Theraphosininae.

A seqüência N-terminal de theraphosinina (**AGP2**) foi determinada por degradação de Edman. Nesta análise foram obtidos 31 resíduos de aminoácidos: **ETDXEAHRXRASRGPLVNDINGXEN GXYNPN**. Os ciclos onde não foram detectados sinais de resíduos de aminoácidos são representados por X. Provavelmente devem representar cisteínas, uma vez que estas, quando não estão alquiladas, são destruídas durante a degradação de Edman.

[índice](#)

2- PEPTÍDEOS DOS HEMÓCITOS

Para o isolamento dos peptídeos antimicrobianos, os hemócitos de aranhas não imunizadas, foram homogenizados em ácido acético 2M e os peptídeos extraídos como descrito anteriormente ([Materiais e Métodos, item 3.2](#)). O sobrenadante, obtido por centrifugação, foi aplicado em colunas Sep-Pak C18 e submetido a três estágios sucessivos de eluição com diferentes concentrações de acetonitrila, com o objetivo de pré-purificar os peptídeos antimicrobianos. As frações eluídas com 5%, 40% e 80% de acetonitrila foram submetidas à cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Todas as frações obtidas nas três cromatografias foram analisadas quanto à atividade antibacteriana utilizando-se *M. luteus* A270 e *E. coli* SBS 363. Apenas três frações obtidas na cromatografia do material eluído com 40% de acetonitrila na coluna Sep-Pak C18 apresentaram fatores com atividade antibacteriana ([Figura 8](#)), denominados **AGH1**, **AGH2** e **AGH3**.

[índice](#)

2-1. Purificação e caracterização de AGH1

A fração contendo o fator **AGH1** ([Figura 8](#)) foi submetida a uma segunda etapa de purificação por cromatografia de filtração ([Figura 9](#)). A fração referente a este pico apresentou atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* SBS 363, mas não apresentou atividade contra *M. luteus* A270. **AGH1** quando submetido à análise por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF-MS revelou um único pico correspondente ao íon monoisotópico com valor de m/z igual a 416,9 ([Figura 10](#)), demonstrando a pureza do peptídeo. Este peptídeo foi denominado mygalomorphina em referência ao nome da infraordem a que pertence a aranha *A. gomesiana*, Mygalomorphae.

A análise de microsequenciamento desse peptídeo não resultou em seqüência, possivelmente pelo N-terminal estar bloqueado, uma vez que nenhum sinal de PTH-amino ácido foi observado após 5 ciclos da degradação de Edman.

A análise de composição de aminoácidos revelou a presença de apenas dois aminoácidos, uma cisteína (sob a forma de ácido cistêmico) e um ácido aspártico ou asparagina.

A atividade antibacteriana deste peptídeo foi inibida por catalase, sugerindo que sua atividade antibacteriana está

relacionada à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

2.2- Purificação e caracterização de AGH2

2.2.1- Purificação de AGH2

Análise por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF-MS da fração de **AGH2** mostrou a presença de três diferentes moléculas e portanto que esse fator não estava puro. O material contendo **AGH2** ([Figura 8](#)) foi submetido a cromatografia de filtração ([Figura 11](#)). Entre as diferentes frações obtidas nesta cromatografia, somente uma apresentou atividade antibacteriana contra *M. luteus* A270 e *E. coli* SBS 363. Como apenas uma única massa molecular de 2270,4 Da (valor de m/z igual a 2271,37) foi obtida por espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS) ([Figura 12](#)), a molécula foi considerada pura o suficiente para o seqüenciamento por degradação de Edman.

[Índice](#)

2.2.2- Caracterização de AGH2

Desde que nenhum sinal de PTH-aminoácidos foi observado em 25 ciclos da degradação de Edman de **AGH2** purificado, esta molécula deveria apresentar o aminoácido N-terminal bloqueado. O material purificado foi submetido à redução e alquilação, seguidos de digestão pela enzima piroglutamato aminopeptidase. Após a purificação dos produtos da digestão, por HPLC em colunas de fase reversa, duas frações foram obtidas. Análise por espectrometria de massa revelou uma diferença de 111 Da entre as duas moléculas (2583,8 Da e 2694,7 Da), o que corresponde exatamente à massa molecular de um ácido piroglutâmico. O composto com menor massa molecular (2583,8 Da) foi submetido à degradação de Edman e uma seqüência com 17 resíduos de aminoácidos foi obtida: **C*RRLC*YKQRC*VTYC*RGR**, onde **C*** corresponde à cisteína alquilada. A identificação das quatro cisteínas após a degradação de Edman está de acordo com o aumento da massa molecular (424,3 Da) do peptídeo nativo após a redução/alquilação com vinil piridina (2694,7 Da). A partir da seqüência primária obtida e assumindo o ácido piroglutâmico (**Z**) como o primeiro resíduo e quatro resíduos de cisteína envolvidos em duas pontes dissulfeto, a

massa molecular calculada é igual a 2269,7 Da, diferindo somente de aproximadamente 1 Da da massa medida por MALDI-TOF MS (2270,4 Da) da molécula nativa. Esta observação indica que a arginina C-terminal deste peptídeo ocorra em sua forma amidada.

Para determinar o posicionamento das pontes dissulfeto, a molécula nativa (**ZC*RRLC*YKQRC*VTYC*RGR**) foi submetida a digestão por tripsina. Após a digestão, diversos fragmentos foram separados por HPLC. Um peptídeo com massa molecular de 1006,9 Da foi seqüenciado por degradação de Edman e a seguinte seqüência obtida: **Leu¹-Val²-Tyr/Thr³-Tyr/Lys⁴**. A presença de dois PTH-aminoácidos com a mesma intensidade nas posições 3 e 4, demonstrou claramente a existência de duas seqüências nesta fração. Esta observação, associada com a estrutura primária estabelecida, está de acordo com a ligação do tetrapeptídeo **Leu⁵-Cys⁶-Tyr⁷-Lys⁸** à seqüência **Cys¹¹-Val¹²-Thr¹³-Tyr¹⁴**. Portanto, as duas pontes dissulfeto estão entre **Cys²¹-Cys¹⁵⁴** e **Cys⁶²-Cys¹¹³**.

Para verificar se a arginina C-terminal era realmente amidada, como o indicado pelos cálculos das massas moleculares, foram sintetizadas moléculas com o grupo carboxi-terminal amidado e não amidado. Após a renaturação e purificação, a identidade e integridade de ambos compostos foi confirmada por espectrometria de massa. A molécula nativa e as duas formas sintéticas foram

analisadas por MALDI-TOF-MS, e a massa molecular monoisotópica da molécula nativa (2270,9 Da) é razoavelmente concordante com a massa molecular monoisotópica da molécula sintética amidada (2270,5 Da). A forma não amidada apresentou massa molecular igual a 2271,6 Da ([Figura 13](#)). Isto confirma que o peptídeo nativo apresenta a arginina C-terminal amidada.

Este peptídeo amidado, com 18-resíduos de aminoácidos, foi denominado gomesina em referência ao nome da espécie da aranha *A. gomesiana*.

[Índice](#)

2.2.3- Espectro de atividade antimicrobiana de gomesina

A gomesina nativa apresentou atividade contra *M. luteus* A270 e *E. coli* SBS363, respectivamente bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Como a quantidade de gomesina obtida nas purificações não era suficiente para uma ampla investigação do seu modo de ação e espectro de atividade, utilizamos seus análogos sintéticos (carboxi-terminal amidado e não amidado) para esses experimentos. A mínima concentração inibitória (MCI) da gomesina nativa contra *M. luteus* A270 foi 0,25-0,5 μM , semelhante aos MCIs encontrados para os peptídeos sintéticos amidado e não amidado (0,4-0,8 μM). Portanto, a atividade da gomesina sintética pode ser considerada equivalente à nativa. O espectro de atividade da gomesina sintética amidada e não amidada está sumarizado na [Tabela II](#) juntamente com o espectro de atividade de androctonina, um peptídeo antimicrobiano de escorpião (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996). A gomesina sintética amidada apresentou uma alta atividade contra quase todas as bactérias Gram-positivas testadas (MCIs < 3,15 – 6,25 μM), exceto contra *Pediococcus acidolactici* (MCI =

3,15-6,25 μM), *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis* (MCI = 6,25-12,5 μM). Gomesina sintética mostrou também alta atividade contra quase todas bactérias Gram-negativas testadas com exceção de *Agrobacterium tumefaciens* e da bactéria entomopatogênica *Serratia marcescens*, sobre as quais o peptídeo não apresentou atividade. As linhagens mais sensíveis foram *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Salmonella thyphimurium* (MCIs < 3,15 – 6,25 μM). A gomesina atuou contra as outras bactérias Gram-negativas com MCIs variando de 3,15 – 6,2 μM 5 a 6,25 – 12,5 μM . Já a atividade sobre a bactéria *Alcaligenes faecalis* foi apenas parcial, mesmo na concentração de 100 μM do peptídeo.

Todos os fungos filamentosos testados foram altamente sensíveis à gomesina (MCI < 3,15 – 6,25 μM), com exceção de *Beauveria bassiana* (MCI = 12,5-25 μM). A gomesina também apresentou uma atividade marcante contra a maioria das leveduras testadas, tais como *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, e *Saccharomyces cerevisiae* (MCI < 6,25 – 12,5 μM) e moderada atividade contra *C. glabrata* (MCI = 12,5 - 25 μM). A atividade antifúngica dos peptídeos sintéticos também foi avaliada na presença de sal, onde o meio de cultura foi preparado com solução salina fosfato-tamponada (NaCl 137 mM, KCl 2,7mM;

Na_2HPO_4 10mM e KH_2PO_4 1,8mM, pH 7,4). A atividade antifúngica em ensaio realizado nessas condições (condições fisiológicas) contra *Neurospora crassa* mostrou-se idêntica àquela observada em condições normais (dados não apresentados).

Nossos ensaios de atividade antimicrobiana mostraram que a atividade da gomesina sintética amidada foi maior que a da gomesina sintética não amidada. De 36 organismos testados ([Tabela II](#)), 17 foram mais sensíveis à gomesina sintética amidada que a não amidada, os demais organismos apresentaram igual sensibilidade.

[Índice](#)

2.2.4- Atividade bactericida e fungicida de gomesina

Quando a gomesina sintética foi incubada com *M. luteus* e *E. coli* D31 em concentração 12,5 vezes maior que os respectivos MCIs, nenhuma bactéria viva foi detectada após 1 minuto de incubação ([Figura 14](#)). Na presença de gomesina sintética em concentração 12.5 vezes maior que o respectivo MCI, nenhum crescimento de esporo de *Neurospora crassa* foi observado após 30 min de incubação (dados não apresentados).

2.2.5- Atividade de gomesina contra células eucarióticas

Para determinar a atividade de gomesina contra células eucarióticas, várias concentrações do peptídeo sintético (0.1–100 μ M) foram testadas contra o parasita *Leishmania (L) amazonensis* e eritrócitos humanos utilizando-se ensaios de viabilidade e hemolítico, respectivamente.

No ensaio antiparasítico, após 1 h de incubação de *L. (L) amazonensis* na presença de várias concentrações do peptídeo, a

viabilidade do parasita mostrou-se dependente da concentração de gomesina utilizada. Gomesina atua sobre a viabilidade do parasita em concentrações tão baixas quanto 2,5 μM , reduzindo o percentual de células viáveis para 47% ([Figura 15](#)).

No ensaio hemolítico, onde eritrócitos humanos foram incubados em solução salina fosfato-tamponada (PBS), na presença de várias concentrações de gomesina, o peptídeo apresentou uma certa atividade hemolítica. Na concentração de 0,8 μM , tanto a gomesina amidada (**ZRa**) como a não amidada (**ZR**) promoveram 14,8% e 13,2% de hemólise, respectivamente ([Figura 16](#)). O percentual de células hemolisadas é gradativamente aumentado de 16,4% (**ZRa**) / 17,9% (**ZR**) até 28,4% (**ZRa**) / 28,4% (**ZR**), a partir da concentração de 1,6 μM até 100 μM .

[Índice](#)

2.3- Purificação e caracterização de AGH3

2.3.1- Purificação e caracterização de AGH3

A análise por MALDI-MS revelou que **AGH3** recuperado da cromatografia ([Figura 8](#)) apresentava duas moléculas com valores de m/z iguais a 10.133,4 e 10.250,0 ([Figura 17](#)). Os outros picos observados na [Figura 17](#) correspondem aos íons duplamente carregados (valores de m/z iguais a 5.056,3 e 5.123,7) e triplamente carregados (valores de m/z iguais a 3.282,0 e 3.414,7). A análise da fração contendo **AGH3** por eletroforese capilar também mostrou a ocorrência de duas frações ([Figura 18](#)).

A fração contendo **AGH3** obtida pela cromatografia mostrada na [Figura 8](#) foi submetida a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) utilizando-se coluna analítica de fase reversa. O gradiente de acetonitrila foi ampliado para possibilitar uma melhor separação das proteínas e peptídeos ([Figura 19](#)). Como o pico referente a **AGH3** ([Figura 19](#)) não se mostrou simétrico, a fração correspondente foi coletada em duas partes: fração ascendente (**AGH3a**) e descendente (**AGH3d**). Tanto a fração **AGH3a** como a **AGH3d** apresentaram atividade anti-*E. coli* SBS363. Cada uma

dessas frações, quando analisada por MALDI-TOF-MS, revelou a presença das mesmas moléculas observadas na [Figura 17](#) (valores de m/z iguais a 10.133,4 e 10.250,0).

As seqüências N-terminais de **AGH3a** e **AGH3d** são idênticas nos primeiros ciclos da degradação de Edman (dados não apresentados). A seqüência N-terminal (62 aminoácidos) de **AGH3a** determinada por degradação automatizada de Edman foi igual a: **DVYKGGGGGRYGGGRYGGGGGYGGGLGGGGLGGGGLGGGK GLGGGGLGGGGLGGGGLGGGGLG**. Em cada ciclo da degradação de Edman recuperou-se apenas um aminoácido, mostrando que as duas moléculas que compõem **AGH3** apresentam a mesma seqüência N-terminal, e que **AGH3a** e **AGH3d** são provavelmente isoformas ([vide discussão](#)) .

Baseando-se na seqüência obtida de **AGH3**, verifica-se que este é um peptídeo muito rico em glicina (71%) contendo 14.5% de aminoácidos hidrofóbicos (leucina e valina), 6,5% de aminoácidos não carregados (tirosina), 6.5% de aminoácidos básicos (lisina e arginina), e 1.6% de aminoácidos ácidos (ácido aspártico). Existe uma regularidade na seqüência dos 62 aminoácidos com uma repetição de duas vezes do motivo **Tyr(Gly)₅Tyr(Gly)₃** e duas vezes do motivo **Leu(Gly)₄Leu(Gly)₄Leu(Gly)₃**.

As duas isoformas de **AGH3** foram denominadas

acanthoscurrina I e II em referência ao nome do gênero da aranha *Acanthoscurria gomesiana*.

2.3.2- Atividade antimicrobiana de acanthoscurrina

A atividade antimicrobiana obtida a partir de hemócitos de aranhas injetadas com suspensão de *Enterobater cloacae* β -12, não apresentou diferença com a atividade obtida a partir de hemócitos de aranhas não injetadas. Tal fato sugere que a síntese de acanthoscurrina também não é induzida, pelo desafio por injeção de bactérias como apresentado para gomesina.

No ensaio de inibição de crescimento em meio líquido, acanthoscurrina apresentou atividade contra a levedura *C. albicans*, com um MCI 1,15 - 2.3 μ M e contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* SBS 363 um MCI 2,3 - 5.6 μ M. Acanthoscurrina foi inativa contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus* A270 na concentração de 5.6 μ M ([Tabela III](#)). Foram removidas amostras dos poços onde o ensaio de inibição de crescimento em meio líquido foi realizado, nos quais a menor concentração do peptídeo causou 100% de inibição (5.6 μ M para *E. coli* SBS363 e 2.3 μ M para *C. albicans*) e adotados

os procedimentos descritos em materiais e métodos [item 4.8.2.3](#) para a bactéria *E. coli* SBS 363 e [item 4.8.2.5](#) para a levedura *C. albicans*. Nenhuma unidade formadora de colônia nem leveduras foram detectados após a incubação, indicando que a acanthoscurrina é bactericida e fungicida nestas concentrações.

[índice](#)

IV- DISCUSSÃO

Considerando os estudos sobre o sistema imune dos invertebrados, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune dos aracnídeos é fragmentário. De maneira a obter informações sobre o envolvimento de peptídeos antimicrobianos na imunidade dos aracnídeos, começamos a investigá-los na hemolinfa da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*.

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

et al., 1991).

As aranhas, como todos os outros artrópodes, apresentam o corpo revestido por uma rígida exocutícula, que limita o seu crescimento ao período da muda. A muda compreende dois diferentes processos: (1) apólise, quando ocorre a separação da cutícula velha das células hipodermais e (2) ecdise, a troca de toda a cutícula velha (exúvia), que corresponde ao que normalmente é denominado de muda. A apólise precede à ecdise em cerca de uma semana.

As aranhas quando entram no período da muda, param de se alimentar e ficam escondidas em seus refúgios. No início da ecdise, as grandes caranguejeiras permanecem com o dorso do abdome e cefalotórax sobre a superfície de seu refúgio. A ecdise compreende três fases sucessivas: a) ruptura e liberação da carapaça, b) liberação do abdome e c) liberação das extremidades (patas, palpos, quelíceras e fiandeiras). O processo inteiro da ecdise pode levar de 10 a 15 minutos nas pequenas aranhas e várias horas nas grandes caranguejeiras. O número e frequência da muda varia entre as espécies de aranhas, em geral pequenas aranhas realizam cinco mudas em um ano até atingirem o estágio adulto (reprodutivo). As fêmeas das grandes caranguejeiras não param de realizar as mudas, passando por esse processo em geral

uma vez por ano, já os machos ao atingirem o estágio reprodutivo param de mudar, acasalam e morrem.

O período de muda para todos os artrópodes, assim como para as aranhas, é um momento muito delicado na vida desses organismos, particularmente naqueles com ciclo de vida tão longo. Todos estão expostos a cada muda de crescimento a uma série de perigos. Desde o ataque de predadores e parasitas (endoparasitas e ectoparasitas) até a uma ruptura da cutícula e conseqüente perda de hemolinfa. Concomitantemente as infecções por fungos e bactérias ficam facilitadas.

Nos insetos, os genes codificadores de uma série de moléculas antimicrobianas são induzidos por infecção e após algumas horas essas moléculas são secretadas no plasma (Hoffmann *et al.*, 1997; Engström, 1998; Manetti *et al.*, 1998). Em nossos experimento observamos que aranhas não submetidas ao desafio antibacteriano apresentaram atividade antimicrobiana e, quando comparamos a atividade de animais submetidos a imunização experimental com a de animais não submetidos verificamos que estas eram similares. Nossos resultados sugerem que essa moléculas antimicrobianas sejam produzidas constitutivamente, semelhante ao observado em escorpiões (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996), camarões (Destoumieux *et al.*, 1997),

moluscos bivalves (Mitta *et al.*, 1999) e carrapatos (Fogaça *et al.*, 1999). Aparentemente, os peptídeos antimicrobianos armazenados nos hemócitos das aranhas podem ser liberados no plasma no início de uma infecção, como estabelecido em moluscos (Mitta *et al.*, 1999) e camarões (Destoumieux *et al.*, 2000).

Foram purificados e caracterizados quatro peptídeos, com atividade antimicrobiana, presentes na hemolinfa da aranha caranguejeira *A. gomesiana*. Um desses peptídeos foi purificado a partir do plasma e os outros três, foram purificados a partir de hemócitos ([Tabela IV](#)).

A theraphosina (**AGP2**), purificada do plasma, apresenta atividade contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus* A270. Este peptídeo apresenta massa molecular de 4052,5 Da. A seqüência N-terminal de theraphosinina é a seguinte: **ETDXEAHRXRASRGPL VNDINGXENGXYNPN**. Esta seqüência de aminoácidos da theraphosinina quando submetida a um banco de dados de proteínas (Swiss Protein, Blast, Matrix BLOSUM80) não mostrou similaridade com nenhum outro peptídeo antimicrobiano.

Resultados recentes no nosso laboratório sugerem fortemente que theraphosinina é sintetizada no hepatopâncreas. Através da técnica de 3'-RACE PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends-Polymerase Chain Reaction), utilizando-se um oligonucleotídeo

degenerado deduzido a partir da seqüência N-terminal da theraphosinina, e RNA total de hepatopâncreas de *A. gomesiana*, Lorenzini *et al.* (2000) clonaram um cDNA que codifica o que parece ser uma isoforma desse peptídeo. A seqüência deduzida de aminoácidos a partir do cDNA apresenta pequenas diferenças com a obtida por degradação de Edman ([Figura 20](#)). Isto pode ser indicativo da existência de isopeptídeos de theraphosinina como observado para outros peptídeos antimicrobianos de insetos (cecropina A, B e D) (Lidholm *et al.*, 1987), limulídeos (taquiplesina I, II e III) (Shigenaga *et al.*, 1990) e moluscos (mitilina A e B) (Mitta *et al.*, 1999).

Os outros peptídeos com atividade antimicrobiana foram purificados a partir de hemócitos de aranhas não desafiadas por bactérias. Um dos peptídeos dos hemócitos, mygalomorphina (**AGH1**), apresenta massa molecular de 415,9 Da. Mygalomorphina apresenta atividade contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* SBS 363, mas não contra *M. luteus* A270. Como não foi possível determinar o resíduo de aminoácido N-terminal desse peptídeo supomos que o mesmo deva estar bloqueado. A análise de aminoácidos desse peptídeo revelou a presença de uma cisteína (Cys) e de um ácido aspártico ou asparagina (Asx). Comparando a massa molecular obtida por espectrometria de massa com a massa

da cisteína mais ácido aspártico/asparagina, é clara a existência de outros componentes não identificados por esta metodologia.

Como na presença de catalase a atividade desse peptídeo é inibida, é possível que esta atividade esteja relacionada com a produção de H_2O_2 , de forma semelhante ao observado com o peptídeo antibacteriano 5-S-GAD de 574,18 Da, encontrado na mosca *Sarcofaga peregrina* (Leem *et al.*, 1996). O peptídeo 5-S-GAD também não pode ser microseqüenciado e a análise de aminoácidos revelou a presença dos seguintes resíduos: glicina, ácido glutâmico ou glutamina e β -alanina. Ao lado desses aminoácidos foi detectado um composto contendo um grupo amina revelado por reação com ninidrina, que não foi identificado por análise de aminoácidos. A estrutura de 5-S-GAD foi determinada por ressonância magnética nuclear (RMN), e o composto desconhecido foi identificado como sendo cisteinildopa, que é destruída por hidrólise com HCl 6N (Leem *et al.*, 1996). A diferença entre a massa molecular obtida por espectrometria de massa e a da soma de uma cisteína e um ácido aspártico, dois aminoácidos que compõem a mygalomorphina, é de 197,6 Da. A massa molecular de L-Dopa (dihidroxifenilalanina) é de 197,2 Da, o que nos leva a supor que mygalomorphina apresente uma cisteinildopa em sua composição, tal como 5-S-GAD. Estas análises também sugerem

fortemente que mygalomorphina seja composta por ácido aspártico e não por asparagina.

Outro peptídeo dos hemócitos, a gomesina (**AGH2**), é um peptídeo com 18-resíduos de aminoácidos, apresentando quatro resíduos de cisteína envolvidos em duas pontes dissulfeto (**Cys²¹-Cys¹⁵⁴** e **Cys⁶²-Cys¹¹³**), um ácido piroglutâmico na extremidade N-terminal, e uma arginina α -amidada como resíduo C-terminal. Sua estrutura cíclica com terminação aberta apresentando um ácido piroglutâmico N-terminal e a amidação C-terminal possivelmente protegem o peptídeo contra degradação por proteases. Gomesina é um peptídeo altamente básico (pI calculado de 12,7) com seis resíduos de aminoácidos carregados positivamente (cinco argininas e uma lisina). Pesquisa em Banco de Dados de Proteínas (Swiss Protein, Blast, Matrix BLOSUM80), mostrou que a gomesina tem um alto grau de similaridade com a família dos peptídeos básicos de limúlídeos: taquiplesinas e polifemusinas (46%) (Nakamura *et al.*, 1988; Miyata, *et al.*, 1989). A gomesina também mostra similaridade de 31% em sequência com androctonina, um peptídeo antimicrobiano de escorpião, com duas pontes dissulfeto (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996). Gomesina mostra uma grande similaridade com a protegrina (42%), um peptídeo antimicrobiano de vertebrados, isolado de leucócitos de porcos (Kokryakov *et al.*,

1993) ([Figura 21](#)). A comparação de gomesina com os peptídeos antimicrobianos relacionados mostra que os quatro resíduos de cisteína e dois resíduos básicos (**Lys**⁸ e **Arg**¹⁸) são conservados. Além disso, observa-se outros resíduos de aminoácidos conservados no grupo de peptídeos considerados: um aminoácido básico (**Arg**⁴) e um resíduo de aminoácido hidrofóbico (**Leu**⁵). Os resíduos de **Val**¹² e **Gly**¹⁷ de gomesina são conservados nas protegrinas. A arginina na posição 10 da gomesina, no “loop” determinado pelas pontes dissulfeto, entre as cisteínas **Cys**⁶**2** e **Cys**¹¹**3**, também é encontrada nesta posição na androctonina e na protegrina PG-1 ([Figura 21](#)). Todos esses peptídeos, exceto a androctonina, o peptídeo de escorpião, apresentam uma arginina α -amidada na posição C-terminal. A amidação de um resíduo básico (arginina) aumenta a eletropositividade do peptídeo o que pode facilitar a interação do peptídeo com as membranas dos microorganismos.

A disposição das pontes dissulfeto, **Cys1-Cys4** e **Cys2-Cys3**, é idêntica para todos os peptídeos, sugerindo que a gomesina pode adotar uma estrutura “**b-hairpin**” como a encontrada nas taquiplesinas (Kawano *et al.*, 1990; Tamamura *et al.*, 1993), protegrinas (Aumelas *et al.*, 1996; Fahrner *et al.*, 1996), e androctonina (Mandard *et al.*, 1999). Resultados recentes da

análise de gomesina em solução por ressonância magnética nuclear (RMN) comprovam a ocorrência dessa estrutura na molécula (Vovelle *et al.*, manuscrito em preparação).

Protegrinas e os peptídeos dos limulídeos originam-se de grandes precursores por maturação proteolítica (Shigenaga *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 1994). Amplificação por PCR de mRNA de hemócitos revelou que gomesina também é sintetizada como uma molécula precursora (Lorenzini *et al.*, 2000).

Usando gomesina sintética mostrou-se que gomesina apresenta atividade antibacteriana efetiva contra a maioria das bactérias testadas. Vinte e quatro das 27 espécies de bactérias testadas foram suscetíveis à gomesina, metade delas em concentrações inferiores a 1,6 μM , 42% com concentrações entre 1,6 e 6,25 μM e, em concentrações superiores a 6,25 μM para duas espécies, *B. cereus* e *E. faecalis*. O peptídeo também tem efeito bactericida sobre *M. luteus* A270 e *E. coli* D31.

Quando a gomesina sintética foi incubada com *M. luteus* A270 e *E. coli* D31 em concentração 12,5 vezes maior que seus respectivos MCIs, nenhuma bactéria viva foi detectada após 1 minuto de incubação com ambas as bactérias. O efeito bactericida da gomesina aparece em tempos bastante curtos (menos de 1 min de incubação) e difere da androctonina onde esses tempos são de

10 min contra *M. luteus* e mais de 2 h contra *E. coli*, (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996)]. Tal efeito bactericida foi também observado para taquiplesinas e polifemusinas dos limúlídeos, sobre *S. aureus* e *E. coli* K12 (Katsu *et al.*, 1993). Além disso, foi observado que a protegrina PG-1 tem também um efeito bactericida contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, resistentes a meticilina. Esta rápida ação bactericida pode oferecer vantagens significativas sobre os antibióticos não peptídicos convencionais que requerem longos períodos de exposição para uma ação efetiva (Steinberg *et al.*, 1997).

O crescimento de uma grande variedade de fungos filamentosos e de leveduras é afetado por gomesina em baixas concentrações ($< 3,15 \mu\text{M}$). As espécies mais resistentes foram, *B. bassiana*, um fungo entomopatogênico, MCI de 12,5-25 μM e a levedura filamentosa *C. glabrata* com MCI de 12,5-25 μM . Quando *Neurospora crassa* é incubada na presença de gomesina sintética, em uma concentração 12,5 vezes maior que seu respectivo MCI, nenhum crescimento de esporos foi observado após 30 min de incubação (dado não mostrado), mostrando que este peptídeo apresenta atividade fungicida. A atividade de gomesina sobre *N. crassa* não foi afetada por concentração salina fisiológica. Alguns peptídeos antimicrobianos têm sua atividade diminuída quando

ensaiados em condições fisiológicas (Tam *et al.*, 2000). Uma atividade antimicrobiana para ser clinicamente relevante deve se expressar sob condições fisiológicas e a conservação da atividade da gomesina nessas condições indica que esse peptídeo pode ser testado como antibiótico em mamíferos e possivelmente em seres humanos.

Quando a atividade antimicrobiana de gomesina amidada e não amidada são comparadas pode-se verificar que a gomesina amidada apresenta maior atividade que a não amidada contra a maioria dos organismos testados, sugerindo que a amidação seja importante para atividade do peptídeo ([Tabela II](#)).

Taquiplesinas e polifemusinas apresentam atividade pronunciada contra duas linhagens de levedura (*C. albicans* M9 e *C. neoformans* IMF40040) com MCI = 0,7-2,6 μ M (Miyata *et al.*, 1989) e uma baixa atividade contra três fungos fitopatogênicos (*A. favus*, *F. graminearum*, e *F. moniliforme*) com MCI = 21-34 μ M (Rao, 1999). Já a atividade de protegrina-1 é moderada contra a levedura *C. albicans* em concentração de 3,72 μ M (Steinberg *et al.*, 1997).

As atividades antifúngicas e antibacterianas da gomesina são similares às aquelas encontradas para protegrinas, polifemusinas e taquiplesinas. A atividade de gomesina, quando comparada com

aquela de androctonina, é sempre mais alta, com exceção da atividade contra *A. viridans* (Tabela II).

Gomesina apresentou certa atividade hemolítica contra eritrócitos humanos ([Figura 16](#)) e de camundongos (não mostrado). A atividade hemolítica máxima observada para ambos os peptídeos (amidado e não amidado) foi 28,4%, em uma concentração de 100 μM , similar ao seu análogo taquipesina (Rao, 1999). Essa atividade hemolítica é baixa quando comparado à melitina, um conhecido peptídeo hemolítico, com o qual foi obtido lise total das células sangüíneas com uma concentração de 10 μM (Rao, 1999). Entretanto, a androctonina escorpiônica não é hemolítica mesmo em altas concentrações como 150 μM (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996). Por outro lado, gomesina afeta a viabilidade do promastigota de *Leishmanina (L) amazonensis*. Na presença de 2,5 μM de gomesina somente 50% de promastigotas permaneciam viáveis. Tal efeito foi também observado com um peptídeo híbrido cecropinaA-melitina, quando testado contra promastigotas de *Leishmania donovani* (Díaz-Achirica *et al.*, 1998). A atividade de gomesina e do peptídeo híbrido cecropinaA-melitina sobre promastigotas de *Leishmania* pode ser atribuída a presença na membrana plasmática desses organismos de uma alta porcentagem de fosfolipídeos negativamente carregados comparada com aquela da membrana

plasmática das células de mamíferos, e também devido a presença de ergosterol em lugar de colesterol (Wassef *et al.*, 1985).

Considerando 100% de recuperação após a etapa final de purificação, a quantidade total de gomesina purificada de 1 ml de hemolinfa foi estimada em 0,35 μ M. Se considerarmos que toda gomesina é liberada dos hemócitos após uma infecção, esta concentração (0,35 μ M) é suficiente para matar a maioria das linhagens bacterianas investigadas nos ensaios de inibição de crescimento em meio líquido. O fato de observarmos atividades antibacterianas similares devida a gomesina nos hemócitos de aranhas imunizadas experimentalmente e não imunizadas, sugere que a síntese de gomesina não é induzida. Muito provavelmente ocorra com gomesina o que acontece com a defensina MGD1 de *Mytilus galloprovincialis* (molusco) e com as penaeidinas de *Penaeus vannamei* (camarão) para as quais foi demonstrado, através da quantificação de mRNA, que estas são continuamente sintetizadas e armazenadas em grânulos nos hemócitos de forma constitutiva. Foi demonstrado que os níveis de mRNA diminuem nos hemócitos circulantes logo após o desafio bacteriano e que ocorre concomitantemente um aumento da concentração da defensina MGD1 e das penaeidinas no plasma, devido a desgranulação dos hemócitos (Mitta *et al.*, 1999 ; Destoumieux *et al.*, 2000).

Devido a similaridade na seqüência primária da gomesina com as taquiplesinas e protegrinas, e sua comparável atividade antimicrobiana, as propriedades de gomesina podem estar relacionadas a uma idêntica estrutura anfipática resultante da distribuição de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos (principalmente aminoácidos básicos). Estudos de ressonância nuclear magnética (RNM) de gomesina confirmam essa similaridade estrutural (Vovelle *et al.*, manuscrito em preparação). A presença de um grande número de aminoácidos positivamente carregados (cinco argininas e uma lisina) na gomesina contribui para uma alta especificidade do peptídeo por células procarióticas devido a estas serem mais eletronegativas quando comparadas com células eucarióticas (Oren e Shai, 1998). A participação dos resíduos hidrofóbicos na interação devem ocorrer após a interação inicial, resultando na lise bacteriana (Oren e Shai, 1998).

Embora apresente uma certa atividade hemolítica, gomesina apresenta grande potencial para aplicações terapêuticas devido ao seu forte e amplo espectro de atividade (afetando bactéria, fungos, leveduras e parasitas eucarióticos) e propriedades estruturais que conferem alta estabilidade à molécula. Além disso, ela conserva sua atividade em condições fisiológicas. Este conjunto de propriedades mostram que gomesina é uma molécula muito promissora para ser

utilizada em terapia humana.

Uma outra molécula purificada a partir dos hemócitos foi acanthoscurrina (**AGH3**). As análises por MALDI-MS de acanthoscurrina revelaram a presença de duas isoformas com 10.132 Da e 10.249 Da respectivamente. A diferença entre elas possivelmente deve-se a presença de um ácido aspártico (135 Da), que também explicaria a diferença de carga entre as duas formas detectadas por eletroforese capilar ([Figura 17](#)).

Considerando 100% de recuperação após a etapa final de purificação, a quantidade total de acanthoscurrina purificada foi estimada, a partir dos dados de análise de microseqüenciamento, em 0,9 μ M. Considerando-se que toda acanthoscurrina é liberada dos hemócitos após uma infecção, esta concentração é suficiente para matar as linhagens microbianas investigadas nos ensaios. Além disso, o fato de não se obter qualquer aumento de atividade antibacteriana nos hemócitos de aranhas imunizadas experimentalmente, sugere que a síntese de acanthoscurrina não é induzida. A gomesina e a acanthoscurrina devem ser continuamente sintetizadas e armazenadas em grânulos nos hemócitos e liberadas no curso da infecção microbiana, como observado para a defensina MGD1 e para as penaeidinas (Mitta *et al.*, 1999 ; Destoumieux *et al.*, 2000).

A comparação de acanthoscurrina com outras proteínas mostrou um alto grau de similaridade com proteínas antifúngicas de insetos (holotricina 3, tenecina 3 e AFP) (Lee *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1995; Iijima, Kurata & Natori, 1993) ([Figura 22A](#)) e proteínas de defesa de plantas (GRP PETHY) ([Figura 22B](#)). Elas apresentam um alto conteúdo de glicina: acanthoscurrina, 71%; GRP PETHY, 67%; holotricina3, 63%; tenecina3, 41%; e AFP 31,4%. A similaridade entre as seqüência é dada principalmente devido ao alinhamento dos resíduos de glicina. Entretanto, diferentemente de acanthoscurrina e das proteínas de defesa de plantas, as proteínas holotricina3, tenecina3, e AFP contém alta quantidade de histidina (15,5%, 18%, e 21%, respectivamente). Análise de hidropaticidade revelou que acanthoscurrina mostra alguns domínios hidrofóbicos repetitivos regulares de forma semelhante às proteínas de defesa das plantas, enquanto que tais domínios estão ausentes nos outros peptídeos antifúngicos (holotricina3, tenecina3 e AFP).

A acanthoscurrina tem efeito bactericida e fungicida sobre *E.coli* e *C. albicans* em uma concentração de 5,6 μ M e 2,36 μ M, respectivamente. Outros peptídeos antifúngicos (holotricina3, tenecina3 e AFP) apresentam atividade anti *C. albicans* (Lee *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1995; Iijima, Kurata & Natori, 1993). Não foi

pesquisado se holotricina³ e tenecina³ apresentam atividade antibacteriana, enquanto que AFP não tem qualquer efeito sobre a viabilidade tanto de *E.coli* como de *Staphilococcus aureus* em concentração de 14,3 μ M (Iijima, Kurata & Natori, 1993).

A atividade biológica das proteínas ricas em glicina de plantas (GRP) não é conhecida. Contudo, sabe-se que as plantas superiores apresentam mecanismos de proteção em várias situações de estresse, tais como ataque de patógenos, ferimentos, presença de produtos químicos incluindo fitohormônios, metais pesados, poluentes do ar e raios ultravioletas, entre outras. Nesta reação, conhecida como resposta de defesa das plantas superiores, uma série de proteínas são ativamente sintetizadas e por isso, são chamadas de “proteínas relacionadas com defesa”. Em particular, proteínas protetoras em plantas especificamente, induzidas em situações patológicas ou situações correlatas, têm sido estudadas intensivamente devido ao interesse agrícola e são chamadas “proteínas relacionadas com patogenias” (“pathogenesis-related proteins: PRs”) (Bowles, 1990). Foi mostrado que a regulação da expressão do gene para GRP PETHY (GRP: proteína rica em glicina,) é determinada por alterações ambientais e relacionadas ao desenvolvimento (Condit & Meagher, 1987) e que a expressão dos genes de Hvgrp2 e Hvgrp3 é induzida por fungos patogênicos

(Molina *et al.*, 1997). Hvgrp2 tem um domínio rico em cisteína e um rico em glicina semelhante à citoqueratina, e Hvgrp3 tem como característica, um domínio de ligação com RNA em adição a um C-terminal rico em glicina (Molina *et al.*, 1997).

Poderia-se considerar, para acanthoscurrina, alguma função semelhante no reparo da cutícula das aranhas ao lado da atividade antimicrobiana, tal como sugerido para as tachicitinas e penaeidinas (Kawabata *et al.*, 1996; Destoumieux *et al.*, 2000).

Concluindo, este trabalho demonstra a presença, na hemolinfa da aranha caranguejeira *A. gomesiana*, de diversas moléculas que servem como elementos na defesa deste artrópode contra microorganismos invasores. De especial interesse está a identificação da gomesina uma molécula estreitamente relacionada com a família das taquiplesinas (taquiplesinas e polifemusinas), androctonina e protegrinas, que apresenta um notável espectro de atividade contra fungos e bactérias, além de em baixas concentrações atuar fortemente sobre a viabilidade de promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis*. O sucesso na síntese química e a possibilidade de obtenção de organismos recombinantes expressando este peptídeo prepara o caminho para futuros estudos sobre o uso desta molécula como antibiótico de alto espectro.

Não devemos deixar de assinalar também a descoberta do que parece ser uma nova classe de peptídeo antimicrobiano, a theraphosinina, que não apresenta similaridade com outras moléculas antimicrobianas. O estudo aprofundado de sua estrutura e de seu modo de atuação mostra-se muito promissor.

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREU, D. & RIVAS, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, **47**(6):415-433.

AUMELAS, A.; MANGONI, M.; ROUMESTAND, C.; CHICHE, L.; DESPAUX, E.; GRASSY, G.; CALAS, B. & CHAVANIEU, A. (1996) Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur J Biochem*, **237**(3):575-583.

BOMAN, H. G. (1991) Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell*, 65:205-207.

BOMAN, H. G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**, 61-92.

BOMAN, H. G. & HULTMARK, D. (1987) Cell free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**:103-126.

BOWLES, D.J. (1990) Defense-related proteins in higher plants.

Annu. Rev. Biochem., **59**:873-907.

BULET P.; DIMARCQ J.L.; HETRU C.; LAGUEUX M.; CHARLET

M.; HEGY G.; VAN DORSSELAER A & HOFFMANN J.A.

(1993) A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. J. Biol. Chem., **268**:14893-14897.

BULET, P.; C. HETRU; J. L. DIMARCQ & D. HOFFMANN. (1999)

Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev Comp Immunol., **23**(4-5):329-44.

BULET, P.; COCIANCICH, S.; DIMARCQ, J. L.; LAMBERT, J.;

REICHHART, J. M.; HOFFMANN, D.; HETRU, C. &

HOFFMANN, J. A (1991). Insect Immunity: isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. J.Biol.Chem., **266**:24520-24525.

BULET, P.; COCIANCICH, S.; REULAND, M.; SAUBER, F.; BISCHOFF, R.; HEGY, G.; VAN DORSSELAER, A.; HETRU, C. & HOFFMANN, J. A. (1992) A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata). Eur J Biochem, **209**(3):977-984.

COCIANCICH S.; DUPONT A.; HEGY G.; LANOT R.; HOLDER F.; HETRU C.; HOFFMANN J.A. & BULET P. (1994) Novel Inducible Antibacterial Peptides from a Hemipteran Insect, The Sap-Sucking Bug *Pyrrhocoris apterus*. Biochemical Journal, **300**(2),567-575.

COCIANCICH, S.; GOYFFON, M.; BONTEMS, F.; BULET, P.; BOUET, F.; MÉNEZ, A. & HOFFMAN, J. (1993) Purification and characterization of a scorpion defensin, a 42kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. Biochem. Biophys. Res. Comm., **194**(1):17-22.

CONDIT, C. M. & MEAGHER, R. B. (1987) Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. *Mol Cell Biol.*, **7**:4273-4279.

COOKE, J. A. L.; ROTH, V. D. & MILLER, F. H. (1972) The urticating hairs of theraphosid spiders. *Amer. Mus. Novitates.*, **2498**:1-43.

DAFFRE, S. & FAYE, Y. (1997). Lipopolysaccharide interaction with hemolin, na insect member of the Ig-superfamily. *FEBS Lett.*, **408**:127-130.

DESTOUMIEUX, D., BULET, P., LOEW, D., VAN DORSSELAER, A., RODRIGUEZ, J., AND BACHÈRE, E. (1997) Penaeidins: A new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.*, **272**:28398-28406.

DESTOUMIEUX, D.; MUÑOZ, M.; COSSEAU, C.; RODRIGUEZ, J.; BULET, P.; COMPS, M. & BACHÈRE, E. (2000) Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J Cell Sci.*, **113** (Pt 3):461-469.

DIAZ-ACHIRICA, P.; UBACH, J.; GUINEA, A.; ANDREU, D. &

RIVAS, L. (1998) The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide. *Biochem J*, **330**(Pt 1):453-460.

EHRET-SABATIER, L.; LOEW, D.; GOYFFON, M.; FEHLBAUM,

P.; HOFFMANN, J.A.; VAN DORSSELAER, A.; BULET, P. (1996) Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J. Biol. Chem.*, **271**(47):29537-29544.

ENGSTRÖM, Y. 1998 Insect immune gene regulation. In *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects* (ed. P.T. Brey and D. Hultmark), pp. 211-244. London: Chapman & Hall.

FAHRNER, R. L.; DIECKMANN, T.; HARWIG, S. S.; LEHRER, R.

I.; EISENBERG, D. & FEIGON, J. (1996) Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem Biol.*, **3**(7):543-550.

FAYE, I. & HULTMARK, D. (1993) The insect immune proteins regulation of their genes. In: Beckage NE, Thompson SN, Federici BA (eds) Parasites and pathogens of insects, vol.2, Pathogens. Academic Press, San Diego, pp 25-53.

FEHLBAUM, P.; BULET, P.; MICHAUT, L.; LAGUEUX, M.; BROEKAERT, W. F.; HETRU, C. & HOFFMAN, J. A (1994). Insect Immunity. Septic injury of drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. J. Biol. Chem., **269**:33159-33163.

FOELIX, R. F. (1996) Biology of Spiders. Harvard University Press, Cambridge/Massachusetts/London, 305 pp.

FOGACA, A. C., P. I. DA SILVA, JR., M. T. M. MIRANDA, A. G. BIANCHI, A. MIRANDA, P. E. RIBOLLA, AND S. DAFFRE. (1999) Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in

GANZ, T. & LEHRER, R. I. (1999) Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol. Med. Today*, **5**:292-297.

HAEBERLI, S.; KUHN-NENTWIG, L.; SCHALLER, J. & NENTWIG, W. (2000) Characterisation of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Toxicon*, **38**(3):373-80.

HANCOCK, R. E. & R. LEHRER. (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.*, **16**(2):82-8.

HOFFMANN, J. A., KAFATOS, F. C., JANEWAY, C. A., AND EZEKOWITZ, R. A. (1999) Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science*, **284**:1313-1318.

HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M. & HETRU, C. (1996) Innate immunity in higher insects. *Curr. Opin. Immunol.*, **8**: 8-13.

HULTMARK, D. (1993) Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *TIG*, **9**(5), 178-183.

HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, Å.; BENNICH, H.; KAPUR, R. & BOMAN, H. G. (1982) Insect immunity. Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae. *Eur. J. Biochem.*, **127**:207-217.

HULTMARK, D.; STEINER, H.; RASMUSON, T. & BOMAN, H. G. (1980) Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*, **106**:7-16.

IIJIMA R, KURATA S, NATORI S.(1993) Purification, characterization and cDNA cloning of na antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae.*J.Biol.Chem.* **268**:12055-12061.

IWANAGA, S.; KAWABATA, S. I. & MUTA, T. (1998) New types of clotting factors and defense molecules found in Horseshoe Crab hemolymph: Their structures and functions. *J. Biochem.* **123**: 1-15.

JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E. & HYNES, W. L. (1998) Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor*

variabilis (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. J Med. Entomol., 35(4):458-464.

JUNG, Y. H.; PARK, B. Y.; LEE, D. K.; HAHN, Y. S. & CHUNG, J. (1995) Biochemical and molecular characterization of na antifungal protein from *Tenebrio molitor*. Mol.Cell.Biol. 5:289-92.

KATSU, T.; NAKAO, S. & IWANAGA, S. (1993) Mode of action of an antimicrobial peptide, tachyplesin I, on biomembranes. Biol Pharm Bull, 16(2):178-181.

KAWABATA, S.; MUTA, T. & IWANAGA, S. (1996) Clotting cascade and defense molecules found in hemolymph of horseshoe crab. In: New Directions in Invertebrate Immunology. Eds.: Soderhall, K.; Iwanaga, S.; Vasta, G. R. pp. 255-284, SOS Publications, Fair Haven, NJ.

KAWABATA, S. & IWANAGA, S. (1999) Role of lectins in innate immunity of horseshoe crab. Dev. Comp. Immynology. 23:391-400.

KAWANO, K.; YONEYA, T.; MIYATA, T.; YOSHIKAWA, K.;

TOKUNAGA, F.; TERADA, Y. & IWANAGA, S. (1990)

Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). NMR determination of the beta-sheet structure. *J Biol Chem*, **265**(26):15365-15367.

KIDERLEN, A. F. & KAYE, P. M. (1990) A modified colorimetric

assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites. *J Immunol Methods*, **127**(1):11-18.

KING, D. S.; FIELDS, C. G.; FIELDS, G. B. (1990) A cleavage

method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res.*, **36**(3):255-66.

KOKRYAKOV, V. N.; HARWIG, S. S.; PANYUTICH, E. A.;

SHEVCHENKO, A. A.; ALESHINA, G. M., SHAMOVA, O. V.;

KORNEVA, H. A. & LEHRER, R. I. (1993) Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of

corticostatic defensins and tachyplesins. FEBS Lett., **327**(2):231-236.

LAMBERTY, M.; ADES, S.; UTTENWEILER-JOSEPH, S.; BROOKHART, G.; BUSHEY, D., HOFFMANN, J. A. & BULET, P. (1999) Insect immunity. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. J Biol Chem, **274**(14):9320-9326.

LEE, S. Y.; MOON, H. J.; KURATA, S.; NATORI, S. & LEE, B. K. (1995) PURIFICATION AND CDNA CLONING OF NA ANTIFUNGAL PROTEIN FROM THE HEMOLYMPH OF *Holotrichia diomphalia* LARVAE. BIOL.PHARM.BULL., **18**:1049-1052.

LEEM, J. Y.; C. NISHIMURA; S. KURATA; I. SHIMADA; A. KOBAYASHI & S. NATORI. (1996) Purification and characterization of N-beta-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of

Sarcophaga peregrina (flesh fly). *J Biol Chem.*, **271**(23):13573-13577.

LIDHOLM, D. A.; G. H. GUDMUNDSSON; K. G. XANTHOPOULOS & H. G. BOMAN. (1987) Insect immunity: cDNA clones coding for the precursor forms of cecropins A and D, antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia* . *FEBS Lett.*, **226**(1):8-12.

LORENZINI, D.; P. I. SILVA JR.; P. BULET & S. DAFFRE (2000)
Gomesin, an Antimicrobial Peptide of the Spider Hemocytes: Spectrum of Activity and cDNA Cloning. *Resumos do XXI International Congress of Entomology, Foz de Iguaçu, Brasil*, 678.

LUCAS, S. M.; SILVA JR., P. I.; BERTANI, R. & CARDOSO, J. L. C. (1994) Mygalomorph spider bites: A report of 91 cases in the State of São Paulo, Brazil. *Toxicon*, **32**(10),1211-1215.

MANDARD, N.; SY, D.; MAUFRAIS, C.; BONMATIN, J. M.; BULET, P.; HETRU, C. & VOVELLE, F. (1999) Androctonin, a novel antimicrobial peptide from scorpion *Androctonus australis*: solution structure and molecular dynamics

simulations in the presence of a lipid monolayer. *J Biomol Struct Dyn*, **17**(2):367-380.

MANETTI, A. G. O.; ROSETTO, M. & MARCHINI, M. (1998)

Antibacterial peptides of the insect reproductive tract. In *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects* (ed. P.T. Brey and D. Hultmark), pp. 67-91. London: Chapman & Hall.

MENDOZA, H. L. & FAYE, I. (1999) Physiological Aspects of

Immunoglobulin Superfamily in Invertebrates. *Dev. Comp. Immunology*. **23**:359:374.

MITTA, G.; F. HUBERT; T. NOEL & P. ROCH. (1999) Myticin, a

novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem*. **265**(1):71-8.

MITTA, G.; VANDENBULCKE, F.; HUBERT, F. & ROCH, P. (1999)

Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci*. **112** (23), 4233-4244.

MIYATA, T.; TOKUNAGA, F.; YONEYA, T.; YOSHIKAWA, K.;; IWANAGA, S.; NIWA, M.; TAKAO, T. & SHIMONISHI, Y. (1989) Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. J Biochem (Tokyo), **106**(4):663-668.

MOLINA, A.; MENA, M.; CARBONERO, P. & GARCIA-OLMEDO, F. (1997) Diferencial expression of pathogen-responsive genes encoding two types of glycine-rich proteins in barley. Plant Mol. Biol., **33**(5):803-810.

MORATO CASTRO, (1987) Estudo das manifestações alérgicas provocadas por pêlos urticantes de aranhas caranguejeiras como moléstia ocupacional. Rev. Bras. Alerg. Imunol., **10** (1): 21-24.

MOSMANN, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, **65**(1-2):55-63.

NAKAMURA, T.; FURUNAKA, H.; MIYATA, T.; TOKUNAGA, F.; MUTA, T.; IWANAGA, S.; NIWA, M.; TAKAO, T. & SHIMONISHI, Y. (1988) Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. J Biol Chem, **263**(32):16709-16713.

OREN, Z. & SHAI, Y. (1998) Mode of Action of Linear Amphipatic α -Helical Antimicrobial Peptides. Biopolymers, **47**(6):451-433.

RAO, A. G. (1999) Conformation and antimicrobial activity of linear derivatives of tachyplesin lacking disulfide bonds. Arch Biochem Biophys, **361**(1):127-134.

SELDEN, P.; SHEAR, W. A. & BONAMO, P. M. (1991) A spider and other arachnids from the Devonian of New York, and reinterpretations of Devonian Araneae. Paleontology, **34**:241.

SHEAR, W. A.; PALMER, J. M.; CODDINGTON, J. A. & BONAMO, P. M. (1989) A Devonian spinneret: early evidences of spiders and silk use. Science, **246**:479.

SHIGENAGA, T.; MUTA, T.; TOH, Y.; TOKUNAGA, F. & IWANAGA, S. (1990) Antimicrobial tachyplesin peptide precursor. cDNA cloning and cellular localization in the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). J Biol Chem., **265**(34):21350-4.

SÖDERHÄLL, K., & SMITH, V. J. (1983) Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev Comp Immunol., **7**(2):229-39.

SÖDERHAL, K. & CERENIUS, L (1998) Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunol., **10**:23-28.

STEINBERG, D. A.; HURST, M. A.; FUJII, C. A.; KUNG, A. H.; HO, J. F.; CHENG, F. C. ; LOURY, D. J. & FIDDES, J. C. (1997) Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. Antimicrob Agents Chemother, **41**(8):1738-1742.

SUN, S. C.; LINDSTRŠM, I.; BOMAN, H. G.; FAYE, I. & SCHMIDT, O. (1990) Hemolin: An insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science*, **250**:1729-1732.

TAM, J. P.; LU, Y. & YANG, J. (2000) Marked increase in Membranolytic Selectivity of Novel Cyclic Tachyplesins Constrained with an Antiparallel Two- B Strand Cystine Knot Framework. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **267**:783-790

TAMAMURA, H.; KURODA, M.; MASUDA, M.; OTAKA, A.; FUNAKOSHI, S.; NAKASHIMA, H.; YAMAMOTO, N.; WAKI, M.; MATSUMOTO, A. & LANCELIN, J. M. (1993) A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-polyphemusin II), determined by nuclear magnetic resonance. *Biochim Biophys Acta*, **1163**(2):209-216.

TANG, Y. Q.; YUAN, J.; OSAPAU, G.; OSAPAY, G.; TRAN, D., MILLER, C. J., OUELLETTE, A. J. & SELSTED, M.E. (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):498-502

UTTENWEILER-JOSEPH, S.; MONIATTE, M.; LAMBERT, J.; VAN

DORSSELAER, A. & BULET, P. (1997) A matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry approach to identify the origin of the glycan heterogeneity of dipteracin, an O-glycosylated antibacterial peptide from insects. *Anal Biochem*, **247**(2):366-375.

VOVELLE, F.; SILVA JR., P. I.; BULET, P. & DAFFRE, S.

Gomesin, a antimicrobial peptide from spider *Acanthoscurria gomesiana*: solution structure and molecular dynamics simulations in the presence of a lipid monolayer. (**manuscrito em preparação**).

WASSEF, M. K.; FIORETTI, T. B. & DWYER, D. M. (1985) Lipid

analyses of isolated surface membranes of *Leishmania donovani* promastigotes. *Lipids*, **20**(2):108-115.

WILSON, R.; CHEN, C. & RATCLIFFE, N. A. (1999) Innate

Immunity in Insects: The role of Multiple, Endogenous Serum Lectins in the Recognition of Foreign Invaders in the

Cockroach, *Blaberus discoidalis*. The Journal of Immunology, **162**:1590-1596.

YAN, L. & ADAMS, M. E. (1998) Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. J Biol Chem., **273**(4):2059-66.

ZHAO, C.; LIU, L. & LEHRER, R. I. (1994) Identification of a new member of the protegrin family by cDNA cloning. FEBS Lett, **346**(2-3):285-288.

[índice](#)

VI - FIGURAS E TABELAS

Figura 01 – Esquema do sistema ativador da pró-fenoloxidase em artrópodes.

Este sistema consiste de uma série de proteínas como proteases, inibidores de proteases e moléculas que reconhecem componentes de bactérias e fungos (Söderhäll & Cerenius, *Current Opinion in Immunology*, 1998)

[índice](#)

Figura 02 – Esquema do sistema de defesa em hemócitos de limulídeos.

Os hemócitos detectam LPS das bactérias Gram-negativas e iniciam a exocitose dos grânulos grande e pequenos. Os fatores de coagulação então liberados são ativados por LPS ou por (1,3)- β -D-glucanos dos patógenos, que resultam na coagulação da hemolinfa. Os patógenos são aglutinados por ação de várias lectinas e subsequente morte por substâncias antibacterianas, tais como taquiplesinas, fator anti-LPS, big-defensina, taquicitina e taquistatinas. Os grânulos grandes também contêm inibidores de protease. A coagulação é ativada por uma cascata de serina-proteases, semelhante aquela da pró-fenoloxidase. (Iwanaga & Kawabata, Frontiers in Bioscience, 1998).

[índice](#)

Figura 03 – Aranha *Acanthoscurria gomesiana* (Mygalomorphae, Theraphosidae, Theraphosinae).

[índice](#)

R.F. Foelix, Biology of Spiders (1996)

Figura 04 –Detalhes da região dorsal do abdome da aranha *Acanthoscurria gomesiana*.

- a)** esquema mostrando o sistema circulatório de aranhas, com destaque para o vaso dorsal (coração) (Foelix, 1996);
- b)** a seta indica o vaso dorsal de uma aranha, que pode ser visto por transparência após a remoção dos pêlos urticantes.

[Índice](#)

Figura 05 – Primeira etapa da purificação dos peptídeos AGP1 e AGP2.

Extrato ácido obtido do plasma da aranha *A. gomesiana* submetido a extração por fase sólida utilizando-se colunas do tipo Sep-Pak C₁₈. A fração eluída com 40% acetonitrila (ACN), na etapa anterior, foi analisada utilizando se uma coluna Aquapore RP-300 C₈ com um gradiente linear de 2 to 60% de ACN em água acidificada por 120 min, sob um fluxo de 1,3 ml/min. Duas frações apresentaram atividade contra *Micrococcus luteus* A270, AGP 1 e 2. A absorbância foi monitorada a 225 nm e a atividade antibacteriana foi detectada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido.

[Índice](#)

Figura 06 – Segunda etapa da purificação dos peptídeos AGP1 e AGP2.

A fração com atividade antibacteriana AGP2 (atividade total), obtida no gradiente de 2 a 60% de acetonitrila passou por uma segunda etapa de purificação por HPLC utilizando-se uma coluna de fase reversa analítica do tipo RP300 C8 (250mm x 4.6mm, BrownleeTM) em um gradiente linear bifásico de 2 a 18% (10 min) e 18 a 28% (50 min) de acetonitrila em água acidificada, sob um fluxo de 0,8 ml/min. A absorbância foi monitorada a 225nm e a atividade antibacteriana detectada por ensaios de inibição de crescimento em meio líquido. A fração indicada foi ativa contra *M. luteus* A270.

[índice](#)

Figura 07– Espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS) de AGP2 (Theraphosinina).

A análise da fração contendo o fator antibacteriano purificado revelou dois picos, um correspondente ao íon monoisotópico carregado com valor de m/z igual a 4053,5 e o outro ao íon duplamente carregado com valor de m/z igual a 2027,7.

[índice](#)

Figura 08– Primeira etapa da purificação dos peptídeos AGH1, AGH2 e AGH3.

Extrato ácido obtido de hemócitos de *A. gomesiana* submetido a extração por fase sólida utilizando se colunas do tipo Sep-Pak C₁₈. A fração eluída com 40% acetonitrila (ACN), na etapa anterior, foi analisada utilizando se uma coluna Aquapore RP-300 C₈ com um gradiente linear de 2 a 60% de ACN em água acidificada, por 120 min, sob um fluxo de 1,3 ml/min. Três frações apresentaram atividades contra *E. coli* SBS363, **AGH1, 2 e 3**. **AGH2**, também foi ativo contra *M. luteus* A270. A absorbância foi monitorada a 225 nm e a atividade antimicrobiana detectada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido.

[Índice](#)

Figura 09 – Segunda etapa da purificação do peptídeo AGH1.

A fração contendo o fator AGH1 ([Figura 8](#)) foi submetida a uma Segunda etapa de purificação por cromatografia de filtração utilizando-se uma coluna Superdex Peptide HR 10/30 (300 x 7,5 mm, Pharmacia Biotech). A eluição foi realizada sob condições isocráticas com acetonitrila 30% em água acidificada sob um fluxo de 0,5ml/min e, a absorbância monitorada a 225 nm. A atividade antimicrobiana detectada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido e a fração referente a este pico apresentou atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* SBS 363.

[Índice](#)

Figura 10 – A análise por MALDI-TOF-MS de AGH1 (Mygalomorphina).

A análise de AGH1 purificado ([Figura 9](#)) revelou um único pico correspondente ao íon monoisotópico com valor de m/z igual a 416,95.

[índice](#)

Figura 11 – Segunda etapa de purificação de AGH2.

A fração contendo o fator **AGH2** ([Figura 8](#)) foi submetida à cromatografia de filtração utilizando-se duas colunas do tipo HPLC-SEC (Colunas Ultraspherogel SEC3000 e SEC2000, 300 x 7,5 mm, BeckmanTM) ligadas em série. A eluição foi realizada sob condições isocráticas com acetonitrila 30% em água acidificada sob um fluxo de 0,4 ml/min e, a absorbância monitorada a 225 nm. A fração contendo atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* SBS 363 e a bactéria Gram-positiva *M.luteus* A270 está marcada como **AGH2**.

[Índice](#)

Figura 12 – A análise por MALDI-TOF-MS do fator antibacteriano AGH2 (Gomesina).

A análise de **AGH2** purificado ([Figura 11](#)) revelou um único pico correspondente ao íon monoisotópico com valor de m/z igual a 2271,34.

[índice](#)

Figura 13 - Análise comparativa, por MALDI-TOF-MS, de gomesina nativa com as gomesinas sintéticas amidada e não amidada.

A massa molecular monoisotópica da molécula nativa 2270,9 Da ($m/z = 2271,9$) é igual à massa molecular monoisotópica da molécula sintética amidada 2270,5 Da ($m/z = 2271,5$). A massa molecular da forma não amidada é igual a 2271,6 Da ($m/z = 2272,6$).

[índice](#)

Figura 14 - Cinética de morte de *M. luteus* A270 e *E. coli* D22 por gomesina.

Uma solução de gomesina sintética (10 μ M, linha cheia) ou água (controle, linha tracejada) foi adicionada a uma cultura em sua fase exponencial de *M. luteus* (círculos negros) ou *E. coli* D22 (triângulos negros). Alíquotas foram removidas em tempos diferentes, semeadas em meio Luria Bertani (LB) com agar 1,5% e o número de unidade formadoras de colônias (UFC) determinado após incubação por 18 horas a 37°C.

[Índice](#)

Figura 15 – Atividade de gomesina contra promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis*.

Gomesina sintética foi incubada com parasitas por 1 hora a 22°C em concentrações de 0,3 a 80 μM (barra em negro) e utilizando água como controle (barra em branco). A viabilidade do parasita (%) foi realizada utilizando-se o ensaio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio] como descrito por Mosmann (1983) e adaptado para *Leishmania* spp (Kiderlen & Kaye, 1990). O valor de viabilidade das células tratadas com água foi tomado como 100%.

[Índice](#)

Figura 16 – Atividade de gossypol sobre eritrócitos humanos.

Tanto gossypol sintética amidada como a não amidada foram utilizadas. As gossypols foram incubadas com eritrócitos humanos em concentrações variando de 0,1 a 100 μM, por 1 hora a 37°C. O percentual de hemólise foi expresso em relação a um controle com 100% de lise (eritrócitos incubados com 0,1% de SDS).

[Índice](#)

Figura 17 – Espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS) de AGH3 (Acanthoscurrina).

Espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS) de **AGH3**. A análise da fração contendo o fator antibacteriano purificado revelou três pares de picos, um par correspondente aos íons monoisotópicos com valores de m/z iguais a 10133,4/10250,1, outro ao íons duplamente carregados com valores de m/z igual a 5066,3/5123,7 e outro aos íons triplamente carregados com valores de m/z iguais a 3282,0/3414,8.

[Índice](#)

Figura 18 – Eletroforese capilar da fração contendo AGH3 parcialmente purificado.

A fração contendo **AGH3** ([Figura 8](#)) foi submetida a eletroforese capilar. O volume injetado sob vácuo foi de 2 nl e a separação feita do anodo para o catodo, sob uma voltagem de 20 kV a 30⁰C, utilizando-se o tampão citrato 20 mM (pH 2,5). A análise da corrida eletroforetica foi realizada pela medida da absorção de luz a 200nm. Esta análise revela que a fração que continha **AGH3** era composta por duas moléculas diferentes (I e II).

[índice](#)

Figura 19 – Segunda etapa de purificação de AGH3 (Acanthoscurrina).

A fração contendo **AGH3** ([Figura 8](#)) segunda etapa de purificação por HPLC utilizando-se uma coluna de fase reversa analítica do tipo RP300 C8 (250mm x 4.6mm, BrownleeTM) em um gradiente linear bifásico de 2 a 22% (10 min) e 22 a 32% (50 min) de acetonitrila em água acidificada, sob um fluxo de 0,8 ml/min. A absorbância foi monitorada a 225nm e a atividade antibacteriana detectada por ensaios de inibição de crescimento em meio líquido. O material eluído no pico majoritário apresentou atividade contra *M. luteus* A270 e contra *E. coli* SBS363.

[Índice](#)

Gomesina			1	Z	C	—	—	R	R	L	C	Y	K	Q	R	—	—	C	V	T	Y	C	R	G	R	*	18
Taquiplesina I	K	W	C	—	—	F	R	V	C	Y	R	—		G	I	C	Y	R	R	C	—	—	R	*			
Polifemusina II	R	R	W	C	—	—	F	R	V	C	Y	K	—		G	F	C	Y	R	K	C	—	—	R	*		
Androctonina	R	S	V	C	R	Q	I	K	I	C	—	R	R	R	G	G	C	Y	Y	K	C	T	N	R	P	Y	
Protegrina PG-1	R	G	G	R	L	C	—	—	—	—	Y	C	—	R	R	R	—	F	C	V	—	—	C	V	G	R	*

Figura 21 – Comparação da seqüência de aminoácidos da gomesina com taquiplesina, polifemusina, androctonina e protegrina

Gomesina foi comparada com taquiplesina I e polifemusina II dos limúlídeos *Tachypleus tridentatus* e *Limilus polyphemus*, respectivamente (Nakamura *et al.*, 1988; Miyata *et al.*, 1989); com androctonina do escorpião *Androctonus australis* (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996); e com protegrina (PG-1) de leucócitos de suínos (Kokryakov *et al.*, 1993). Z representa um ácido piroglutâmico e os asteríscos indicam a amidação C-terminal. Foram introduzidos espaços entre aminoácidos para otimizar os alinhamentos e os resíduos idênticos e conservados estão assinalados por negrito. A localização das pontes dissulfeto são mostradas abaixo da figura.

[índice](#)

A																																											
	10										20										30										40												
ACANTHOSCURRINA	D	V	Y	K	G	G	G	G	R	Y	G	G	G	R	Y	G	G	G	G	Y	G	G	G	L	G	G	G	L	G	G	G	L	G	G	G	K	G	L	42				
HOLOTRICINA 3	Y	G	P	G	D	G	H	G	G	G	H	G	G	H	G	G	G	H	G	N	G	Q	G	G	G	H	G	H	P	G	G	G	F	G	G	H	G	G	G	42			
TENECINA 3	D	H	H	D	G	H	L	G	G	G	H	Q	T	G	H	Q	G	G	Q	Q	G	G	H	L	G	G	Q	G	H	L	G	G	H	Q	G	G	Q	P	G	H	G	42	
AFP	Q	H	G	H	G	G	Q	D	Q	H	G	Y	G	H	G	Q	Q	A	V	Y	G	K	G	H	E	G	H	G	V	N	N	L	G	Q	D	G	H	G	Q	H	G	Y	42
	50										60										70										80												
ACANTHOSCURRINA	G	G	G	G	L	G	G	G	G	L	G	G	G	L	G	G	G	G	L	G	G	G	G	L	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	62	
HOLOTRININA 3	H	G	G	G	R	G	G	G	S	G	G	G	G	S	P	G	H	G	A	G	G	G	Y	P	G	G	H	G	G	G	H	H	G	G	Y	Q	T	H	G	Y	84		
TENECINA 3	L	G	G	H	Q	G	G	I	G	G	T	G	G	Q	H	G	Q	H	G	P	G	T	G	A	G	H	Q	G	G	Y	K	T	H	G	H							78	
AFP	A	H	G	H	S	D	Q	H	G	H	G	G	Q	H	G	Q	H	D	G	Y	K	N	R	G	Y																	67	
B																																											
	10										20										30										40												
ACANTHOSCURRINA	D	V	Y	K	G	G	G	G	R	Y	G	G	G	R	Y	G	G	G	G	Y	G	G	G	L	G	G	G	L	G	G	G	L	G	G	G	L	G	G	G	K	G	L	42
GRP2 PETHY	F	G	A	G	G	G	V	G	G	G	A	G	G	G	L	G	G	G	V	G	G	G	G	G	S	G	G	G	G	G	I	G	G	G	S	G	H	G	G	G	F	42	
	50										60										70										80												
ACANTHOSCURRINA	G	G	G	G	L	G	G	G	G	L	G	G	G	L	G	G	G	G	L	G	G	G	G	L	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	62
GRP2 PETHY	G	A	G	G	G	V	G	G	G	V	G	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	L	G	G	G				76

Figura 22 – Comparação da sequência de aminoácidos de acanthoscurrina com proteínas ricas em glicina.

Comparação da sequência de aminoácidos de acanthoscurrina com proteínas ricas em glicina. **(A)** Sequências de proteínas antifúngicas de insetos: AFP de *Sarcophaga bulatta* (diptera) (Iijima, *et al.*, 1993), Holotricina-3 de *Holotrichia diomphalia* (coleoptera)(Lee *et al.*, 1995); Tenecina-3 de *Tenebrio molitor* (coleoptera)(Jung *et al.*, 1995); e **(B)** GRP PETHY uma proteína de planta relacionada com defesa (Condit & Meagher, 1987).

[Índice](#)

Tabela I. Espectro de atividade antimicrobiana dos extratos ácidos de plasma e hemócitos.

Microorganismos	Atividade Antimicrobiana	
	Plasma	Hemócitos
Bactérias Gram-positivas		
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341 A)	+	+
<i>Bacillus megaterium</i> (ATCC 10778)	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	-	+
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 7080)	-	+
Bactérias Gram-negativas		
<i>Escherichia coli</i> D31	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i> b-12	-	+
<i>Serratia marcesens</i> (ATCC 4112)	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (IAL 1025)	-	+
Fungos		
<i>Candida albicans</i> (MDM8)	+	+
<i>Aspergillus nidulans</i> (UT 196)	+	+

Foram utilizados ensaios de zona de inibição de crescimento para bactérias e ensaios de inibição de crescimento em meio líquido para os fungos.

(+) inibição de crescimento (-) sem inibição de crescimento.

[Índice](#)

Tabela II - Espectro de atividade de gomesina Z18Ra (amidata) e Z18R (não amidada) comparada com androctonina

Microorganismos	Mínima Concentração Inibitória (mM)		
	Z18Ra	Z18R	Androctonina
Bactérias Gram-positivas			
<i>Aerococcus viridans</i>	0,8-1,6	0,8-1,6	0,3-0,6
<i>Bacillus cereus</i>	6,2-12,5	12,5-25	n.d.
<i>Bacillus megaterium</i>	0,2-0,4	0,4-0,8	n.m.
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1,6-3,15	3,15-6,25	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	6,2-12,5	n.m.	n.m.
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,8-1,6	3,15-6,25	n.m.
<i>Micrococcus luteus</i>	0,4-0,8	0,4-0,8	0,6-1,5
<i>Pediococcus acidolactici</i>	3,15-6,25	3,15-6,25	n.m.
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,6-3,15	3,15-6,25	15-30
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,8-1,6	3,15-6,25	n.m.
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0,8-1,6	1,6-3,15	n.m.
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0,8-1,6	1,6-3,15	n.m.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,6-3,15	3,15-6,25	n.m.
<i>Nocardia asteroides</i>	1,6-3,15	3,15-6,25	n.m.
Bactérias Gram-negativas			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	>100	n.m.	n.m.
<i>Escherichia coli</i> 1106	0,8-1,6	1,6-3,15	6-15
<i>Escherichia coli</i> D22	0,4-0,8	0,4-0,8	6-15
<i>Escherichia coli</i> D31	0,8-1,6	0,8-1,6	3-6
<i>Escherichia coli</i> SBS363	0,4-0,8	0,4-0,8	n.m.
<i>Erwinia carotovora carotovora</i>	3,15-6,25	3,15-6,25	n.d.
<i>Enterobacter cloacae</i> b-12	3,15-6,25	6,25-12,5	n.d.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,15-6,25	6,25-12,5	n.d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,6-3,15	1,6-3,15	n.m.
<i>Salmonella thyphimurium</i>	0,8-1,6	0,8-1,6	3-6
<i>Serratia marcescens</i> Db11	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Xantomonas campestris</i> pv <i>orizae</i>	3,15-6,25	6,25-12,5	n.d.

n.d: atividade não detectada no intervalo de concentração testado até 100µM para Z18Ra e Z18R, e 50 µM para androctonina. n.m: atividade não medida.

Tabela II - **Espectro de atividade de gomesina Z18Ra (amidada) e Z18R (não amidada) comparada com androctonina (continuação)**

Microorganismos	Mínima Concentração Inibitória (mM)		
	Z18Ra	Z18R	Androctonina
Fungos			
<i>Alternaria brassicola</i>	0,4-0,8	0,4-0,8	3-6
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,6-3,15	1,6-3,15	25-50
<i>Beauveria bassiana</i>	12,5-25	25-50	n.m.
<i>Fusarium culmorum</i>	0,4-0,8	0,4-0,8	3-6
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,4-0,8	0,8-1,6	6-12
<i>Neurospora crassa</i>	0,4-0,8	0,4-0,8	6-12
<i>Nectria haematococca</i>	0,2-0,4	0,2-0,4	6-12
<i>Tricoderma viridae</i>	0,4-0,8	0,4-0,8	6-12
<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	0,8-1,6	0,8-1,6	n.m.
Leveduras			
<i>Candida glabrata</i>	12,5-25	12,5-25	n.m.
<i>Candida tropicalis</i>	3,15-6,25	n.m.	n.m.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,8-1,6	n.m.	n.m.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,6-3,15	1,6-3,15	n.m.

n.m: atividade não medida.

[Índice](#)

Tabela III - Espectro de atividade antimicrobiana de acanthoscurrina.

Microorganismos	Inibição de Crescimento
	MCI (μ M)
Bactéria Gram-positiva	
<i>Micrococcus luteus</i> A270	n.d.
Bactéria Gram-negativa	
<i>Escherichia coli</i> SBS363	2,3-5,6
Fungo	
<i>Candida albicans</i> MDM8	1,15-2,3

Foram utilizados ensaios de inibição de crescimento em meio líquido.

n.d.: atividade não detectada no intervalo de concentração testada até 5,6 μ M.

[índice](#)

Tabela IV – Peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*.

Peptídeos	Fonte	Massa Molecular	Atividade Antimicrobiana	Seqüência de aminoácidos	Similaridade
Theraphosinina	Plasma	4.052,5 Da	Bactéria Gram-positiva: <i>M. luteus</i> A270	ETDXEAHRXRASRGPLVNDINGXENGXYNPN (31 aminoácidos – seqüência parcial)	Não apresenta similaridade com proteínas e peptídeos antimicrobianos
Mygalomorphina	Hemócitos	415,9 Da	Bactéria Gram-negativa: <i>E. coli</i> SBS363	Cys-Asx..... (seqüência parcial)	5-S-GAD de dípteros
Gomesina	Hemócitos	2.270 Da	Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, Fungos e <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	Z*CRRLCYKQRCVTYCRGR (18 aminoácidos – seqüência total) *Z – ácido piruglutâmico	Taquiplesinas e Polifemusinas (limulídeos), Androctonina (escorpião) e Protegrina (suínos)
Acanthoscurrina (2 isoformas)	Hemócitos	10.132 Da 10.249 Da	Bactéria Gram-negativa: <i>E. coli</i> SBS363 e Fungo: <i>C. albicans</i>	DVYKGGGGGGRYGGGGRYGGGGYGGGLGGGGLGGGLGGGKGLGGGGLGGGLGGGLGGGGLG (62 aminoácidos – seqüência parcial)	Peptídeos ricos em glicina: a) relacionados com defesa em plantas e, b) antifúngicos de insetos

[índice](#)

PI0001870-8

NÃO tem valor (21)
DEPÓSITO

(Uso exclusivo do INPI)

DEPÓSITO Pedido de Patente ou de Certificado de Adição	depósito Espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito)
---	--

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):		
1.1	Nome: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	
1.2	Qualificação: Universidade Brasileira	
1.3	CNPJ: 63.025.530/0001-04	
1.4	Endereço completo: Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – 05508-900 – Cidade Universitária – São Paulo - SP	
1.5	Telefone: () FAX: () () continua em folha anexa	
2. Natureza:		
(x) 2.1	Invenção () 2.1.1. Certificado de Adição () 2.2 Modelo de Utilidade	
Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza Desejada: PRIVILÉGIO DE INVENÇÃO		
3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54): "PEPTÍDEO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEO, FORMULAÇÃO COMPREENDENDO PEPTÍDEO, MÉTODO DE PREVENÇÃO DE CRESCIMENTO DE PARASITAS, FUNGOS E BACTÉRIAS, ANTICORPOS, SISTEMA DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE PARA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO, MÉTODO PARA INATIVAR A ENDOTOXINA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS" () continua em folha anexa		
4. Pedido de Divisão do Pedido n.º, _____, de ____/____/____		
5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade: N.º de depósito _____ Data de Depósito _____ (66)		
6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):		
País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito
() continua em folha anexa		

Inventor (72):) Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s) (art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo n.º 127/97)					
7.1	Nome: (1) Sirlei Daffre – Brasileira, Pesquisadora Doutora em Ciências Biológicas (2) Pedro Ismael da Silva Junio – Brasileiro, Pesquisador Científico formado em Ciências Biológicas (3) Philippe Bulet – Francês, Pesquisador Doutor em Ciências Biológicas				
7.2	Endereço: (1) Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – 05508-900 – Cidade Universitária – São Paulo – SP (2) Rua Padre Pacheco, 136 – 05627-020 – São Paulo – SP (3) 15 Rue René Descartes Cedex – 67084 – Estrasburgo - França				
7.3	CEP: 7.4 Telefone: () () continua em folha anexa				
8. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo n.º 127/97 () em anexo					
9. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça): (art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo n.º 127/97): () em anexo					
10. Procurador (74): 10.1 Nome e CPF/CGC: FRANCISCO CARLOS RODRIGUES SILVA, brasileiro, casado, engenheiro INPI Nº 507 10.2 Endereço: Av. Brigadeiro Faria Lima, 1485 - 12º andar – São Paulo – SP 10.3 CEP: 01452-002 10.4 Telefone: (011) 38.19.45.45					
11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas): (Deverá ser indicado o n.º total de somente uma das vias de cada documento)					
☒	11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	12 fls.
☐	11.2 Procuração	fls.	☒	11.6 Reivindicações	06 fls.
☐	11.3 Documentos de prioridade	fls.	☒	11.7 Desenhos	04 fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	01 fls.
☐	11.9 Outros (especificar):				fls.
☒	11.10 Total de folhas anexadas:				24 fls.
12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras					
São Paulo, 29/05/2000 Local e Data			FRANCISCO CARLOS RODRIGUES SILVA INPI Nº 507		

Formulário 1.01 – Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 2/2)

PEPTÍDEO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEO, FORMULAÇÃO COMPREENDENDO PEPTÍDEO, MÉTODO DE PREVENÇÃO DE CRESCIMENTO DE PARASITAS, FUNGOS E BACTÉRIAS, ANTICORPOS, SISTEMA DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE PARA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO, MÉTODO PARA INATIVAR A ENDOTOXINA DE BACTÉRIAS GRAM -NEGATIVAS.

A presente invenção refere-se a peptídeos pequenos, com baixa atividade hemolítica, que apresentam atividades antiparasítica, antifúngica e antibacteriana de mesma ordem de grandeza.

Muitos peptídeos extraídos de animais e plantas tem revelado atividade contra infecção. O pedido PCT WO9503325 publicado em 02 de fevereiro de 1995 menciona peptídeos denominados protegrinas, além de uma revisão da literatura acerca deste assunto, incluindo referências sobre taquipesinas, polifemusinas, defensinas, β -defensinas, e defensinas de insetos. A patente americana US5.994.306 se refere a protegrinas mais específicas.

O pedido PCT WO9702287 publicado em 23 de janeiro de 1997 revelam peptídeos denominados parevinas e taquitegrinas, semelhantes às protegrinas exceto pelas cisteínas nas posições 6 e 15.

A presente invenção tem por escopo novos peptídeos pequenos que, em alguns aspectos são semelhantes às protegrinas, às taquitegrinas e às parevinas, porém apresentam atividades antiparasíticas, antibacterianas e antifúngicas de mesma ordem de grandeza, além de baixa atividade hemolítica, assim como processos de obtenção e suas aplicações. Trata-se de um peptídeo denominado gomesina, configurado com uma estrutura tipo grampo formado por duas folhas beta-pregueadas antiparalelas unidas por uma dobra tipo beta, contendo 4 resíduos invariáveis de cisteína que formam duas pontes de dissulfeto, com a seguinte fórmula geral(1):

FÓRMULA GERAL (1)

onde:

- Z_1 é:
 - na ausência de X_{19} , um resíduo com amino terminal livre ou com amino grupo terminal bloqueado, através de metilação, carbamilação e acilação e preferencialmente sendo ácido piroglutâmico, propiciando resistência à atividade de proteases;
 - na presença de X_{19} , um resíduo básico, hidrofóbico, polar/grande ou pequeno, com amino grupo terminal livre disponível para o fechamento das pontas da molécula, por exemplo glutamina.
- C_2 , C_6 , C_{11} e C_{15} são independentemente cisteína, homocisteína ou penicilamina;
- P_1 e P_2 são pontes de dissulfeto entre C_2 e C_{15} , e C_6 e C_{11} , respectivamente;
- A_3 , A_4 , A_5 , A_{12} , A_{13} , A_{14} , A_{16} , A_{17} são independentemente resíduos básicos, hidrofóbicos, polar/grandes ou pequenos, sendo:
 - A_3 , A_4 e A_{16} preferencialmente resíduos de aminoácidos básicos,
 - A_5 , A_{12} e A_{14} preferencialmente resíduos hidrofóbicos, e
 - A_{17} preferencialmente resíduo pequeno,
- A_7 até A_{10} são resíduos capazes de efetuar um dobra do tipo beta, e podem ser independentemente básicos, hidrofóbicos, polar/grandes ou pequenos, sendo ao menos um deles básico e ao menos um deles hidrofóbico, sendo preferencialmente A_8 e A_{10} resíduos de aminoácidos básicos,
- A_{18} é:
 - na ausência de X_{19} : um resíduo básico, hidrofóbico, polar/grande ou pequeno, preferencialmente básico, tendo um grupo carboxila livre ou formando um sal aceitável como potássio, sódio, cálcio, magnésio ou de outro de ion inorgânico ou orgânico, ou ser amidado por uma amina de fórmula NH_3 ou RNH_2 ou R_2NH , onde R é, independentemente, uma hidrocarbila de um a seis carbonos,

saturada ou insaturada, por exemplo metila, etila, isopropila, t-butila, n-pentila, ciclohexila, 2-ciclohexenila, 3-ciclohexenila, 4-hexinila, e semelhantes;

- na presença de X_{19} : um resíduo básico, hidrofóbico, polar/grande ou pequeno, preferencialmente básico, cujo grupo carboxila terminal livre está envolvido no fechamento de pontas da molécula do peptídeo.
- X_{19} pode estar ausente ou presente, e estando presente é ou uma ligação química entre Z_1 e A_{18} ou uma molécula ou estrutura química presente entre Z_1 e A_{18} e ligada a ambos, fechando as pontas da cadeia de aminoácidos do peptídeo da invenção.
- entre cerca de 15% e cerca de 50% de todos os resíduos de aminoácidos devem ser básicos;
- apresentar carga positiva de ao menos +1 em pH fisiológico.

Alguns dos peptídeos da invenção podem ser obtidos por extração de animais, por exemplo da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, que em função dessa origem denominam-se gomesinas. De outra forma podem ser produzidos sinteticamente, e quando contém somente aminoácidos geneticamente codificados podem ser produzidos recombinantemente. Os peptídeos da invenção tem utilidade no tratamento e prevenção de infecção de animais e plantas, provocadas por parasitas, bactérias e/ou fungos. Em outro aspecto, o DNA codificador dos peptídeos da invenção pode ser expresso *in situ*, em animais ou plantas, para combater infecções. Os peptídeos da invenção podem ser também usados como padrões em testes antimicrobianos e na ligação com endotoxinas.

Os peptídeos da invenção podem ser obtidos recombinantemente pro expressão do cDNA codificador do peptídeo em sistemas heterólogos bem conhecidos na literatura.

A invenção também é direcionada para composições úteis contra bactérias, fungos e parasitas, utilizadas no combate a tais organismos.

Os peptídeos da invenção diferenciam-se genericamente de outros conhecidos no estado da técnica, entre outras razões, por apresentar as seguintes qualidades até agora não encontradas concomitantemente:

- estrutura pequena, portanto com expectativa de melhor distribuição nos tecidos, sendo menos imonogênicos;
- ter atividade bactericida, fungicida e parasítica, de aproximadamente mesma ordem de grandeza (enquanto que protegrinas, por exemplo, são menos eficientes contra fungos);
- ter baixa atividade hemolítica, principalmente na configuração cíclica de pontas fechadas.

Os peptídeos da invenção contem uma dobra tipo beta conectando duas folhas beta-pregueadas. Como sabe um técnico no assunto, uma dobra tipo beta se refere tipicamente a um segmento de um peptídeo contendo resíduos de quatro aminoácidos que reverte a direção da cadeia dos aminoácidos. As cisteínas nas posições 2, 6, 11 e 15 propiciam de maneira marcante a existência da dobra do tipo beta pela formação das pontes de dissulfeto entre si, ou seja, entre C₂ e C₁₅, e C₆ e C₁₁.

Conforme conhecido na literatura, as ditas pontes de dissulfeto podem ser substituídas por pontes de lactama, ou qualquer outra que exerça função equivalente.

Os peptídeos da invenção podem, em uma alternativa de realização, apresentar estrutura cíclica de pontas fechadas da cadeia peptídica. A metodologia de obtenção de peptídeos cíclicos fechados é conhecida no estado da técnica.

Nos peptídeos não ciclizados, como é do conhecimento do técnico do assunto, os terminais amino e carboxi podem estar derivatizados. Nos peptídeos da invenção, o amino grupo terminal pode estar metilado, carbamilado, acilado ou sob forma de ácido piroglutâmico. Os peptídeos da invenção podem, através da adição, na carboxila terminal das moléculas, estar sob forma de sais inorgânicos como cloreto, brometo, iodeto, fluoreto, sulfato, nitrato, fosfato, etc., ou orgânicos como acetato, formato, benzoato, etc. A aceitabilidade de cada um dos ditos sais é dependente da utilização desejada, fato corriqueiramente entendido. A carboxila terminal pode também apresentar-se amidaa. As reações de derivação são conhecidas.

Conforme utilização neste texto, os resíduos de aminoácidos dos peptídeos da invenção são definidos em termos das seguintes características:

- ácido: o resíduo tem uma carga negativa devido à perda do ion H em pH fisiológico e o resíduo é atraído por solução aquosa de modo a buscar posições superficiais na conformação de um peptídeo no qual está contido quando este está em meio aquoso em pH fisiológico;
- básico: o resíduo tem uma carga positiva devido à associação com o ion H em pH fisiológico, e o resíduo é atraído por solução aquosa de modo a buscar posições superficiais na conformação de um peptídeo no qual está contido quando este está em meio aquoso em pH fisiológico;
- hidrofóbico: o resíduo não está carregado em pH fisiológico e é repelido por solução aquosa de modo a buscar posições mais internas na conformação de um peptídeo no qual está contido quando o peptídeo está em meio aquoso;
- polar/grande: o resíduo não está carregados em pH fisiológico, mas não é suficientemente repelido por solução aquosa de modo que poderia buscar posições mais internas na conformação de um peptídeo no qual está contido quando o peptídeo está em meio aquoso;
- pequeno: resíduo neutro uma vez que suas cadeias laterais não são suficientemente grandes, mesmo se grupos polares estão ausentes, para conferir hidrofobicidade. Contém 4 carbonos ou menos quando pelo menos um grupo polar aparece na cadeia lateral, e 3 carbonos ou menos quando isso não acontece.

Com relação a aminoácidos de proteínas de ocorrência natural, conforme utilização nos termos deste texto, é utilizada a classificação abaixo:

- ácidos: ácido aspártico, ácido glutâmico
- básicos: - não cíclicos – arginina, lisina
 - cíclicos: histidina
- pequenos: glicina, serina, alanina, treonina
- polar/grande: asparagina, glutamina
- hidrofóbicos: tirosina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptofano.

Aminoácidos comumente encontrados, não codificados no código genético, ou quaisquer outros que se adequem às definições apresentadas podem ser equivalentemente utilizados nos peptídeos da invenção.

Cisteína e outros resíduos de aminoácidos contendo sulfidril – SH não estão contemplados na lista acima uma vez que sua capacidade de formar pontes de dissulfeto provendo estrutura secundária é crítica para os compostos da presente invenção.

Sem criar qualquer limite ao escopo da invenção, entende-se que a ação do peptídeo da invenção contra microrganismos e parasitas é privilegiada em presença de maior número de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos.

Dentro de formas particulares de realização, os componentes da fórmula geral (1) do peptídeo da invenção são:

- a) estando X_{19} ausente
 - Z_1 é ácido piroglutâmico;
 - A_3, A_4, A_8, A_{10} e A_{16} são resíduos básicos, preferencialmente sendo A_3, A_4, A_{10} , e A_{16} arginina, e A_8 lisina;
 - A_{18} é um resíduo básico, preferencialmente arginina amidada, opcionalmente não amidada;
 - A_5, A_7, A_{12}, A_{14} são resíduos hidrofóbicos, preferencialmente sendo A_5 leucina, A_7 e A_{14} tirosina, e A_{12} valina;
 - A_9 é um resíduo polar/grande, preferencialmente glutamina;
 - A_{13} e A_{17} são resíduos pequenos, sendo preferencialmente A_{13} treonina e A_{17} glicina.
- b) estando X_{19} presente, e sendo os componentes do peptídeo da invenção os mesmos que acima, exceto:
 - Z_1 é um resíduo de aminoácido básico, hidrofóbico, polar/grande ou pequeno com amino grupo terminal livre, por exemplo glutamina.
 - A_{18} é um resíduo básico, com grupo carboxila terminal livre envolvido na fechamento das pontas do peptídeo.
 - X_{19} é uma estrutura química presente entre Z_1 e A_{18} , ligada a ambos, fechando as pontas da cadeia do peptídeo

EXEMPLOS DE PROCESSOS DE OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS DA INVENÇÃO

1) EXTRAÇÃO DA GOMESINA A PARTIR DA ARANHA *Acanthoscurria gomesiana*.

Com o processo descrito a seguir obtém-se a gomesina que corresponde particularmente à seguinte estrutura, dentro da fórmula geral

(1), incluindo as duas pontes de dissulfeto (representação espacial esquemática apenas para fins ilustrativos):

onde:

Z = ácido piroglutâmico

C = cisteína

R = arginina

L = leucina

Y = tirosina

K = lisina

Q = glutamina

V = valina

T = treonina

G = glicina

R_a = arginina com o grupo carboxila terminal amidado

Hemolinfa (aproximadamente 0,4ml/aranha) de animais de ambos os sexos em diferentes estágios de desenvolvimento foi coletada a partir de animais pré-resfriados por punção cardíaca com seringa apirogênica, e coletada em presença de tampão de citrato de sódio 30mmol/L, pH 4.6, contendo NaCl 450mmol/L EDTA 10 mmol/L e glicose 100mmol/L. Os hemócitos são removidos do plasma por centrifugação a 800 x g, durante 10 minutos a 4°C. Hemócitos íntegros são lavados uma vez com tampão de citrato de sódio e lisados por concentração em uma centrífuga a vácuo.

Após a concentração, os hemócitos são ressuspensos em um certo volume de ácido acético 2M suplementados com aprotidina (20µg/ml) como inibidor de protease, foram homogeneizados em um equipamento Dounce (máximo 152 µ, mínimo 76µ). Uma segunda homogeneização é efetuada por sonicação (3 x 30s) em intensidade média, mantido em um banho de água e gelo, e a extração efetuada durante 30 minutos a 4°C sob agitação suave. O

material sobrenadante, obtido por centrifugação a 13.800 x g durante 30 minutos a 6°C, é diretamente submetido a pré-purificação por extração em fase sólida.

Os extratos de ácidos citosólico e organela são aplicados em colunas de fase sólida ligadas em série, equilibradas em água acidificada (0,05% ácido trifluoroacético). Três eluições são efetuadas sucessivamente com acetonitrila 5%, 40% e 80% em água acidificada. A fração 40% de acetonitrila é concentrada em centrífuga a vácuo, reconstituída com água MilliQ e aplicada a cromatografia de fase reversa numa cuja coluna é equilibrada com acetonitrila 2% em água acidificada. Efetua-se eluição com um gradiente linear de acetonitrila de 2 a 60% em água acidificada durante 120 min., sob fluxo de 1,3ml/min.

A fração ativa contra a bactéria testada *Micrococcus luteus* dos hemócitos (AGH2) é adicionalmente purificada por cromatografia de filtração. A eluição é efetuada sob condições isocráticas com acetonitrila 30% em água acidificada com fluxo de 0,4ml/min.

Efetua-se purificação com HPLC (cromatografia líquida de alta pressão) em temperatura ambiente. O efluente da coluna é monitorado pela absorbância em 225 nm. Frações correspondentes aos picos de absorbância são coletadas, concentradas a vácuo e reconstituídas em água MilliQ. Atividade antibacteriana das frações coletadas na cromatografia é determinada pelo ensaio líquido de inibição de crescimento de acordo com J. Biol. Chem., **268**, 14893-14897 (1993) usando *Micrococcus luteus* como bactéria teste.

2) SÍNTESE DA GOMESINA

Peptídeos da invenção foram sintetizados de acordo com procedimento descrito em J.Biol.Chem., **271**, 29537-29544 (1996), de acordo com procedimento Fmoc clássico.

Para fins de comparação com a gomesina obtida por extração conforme mencionado mais atrás, foi sintetizado o seguinte peptídeo:

onde a única diferença em relação à gomesina natural mencionada mais atrás é a arginina não amidada em uma das pontas da cadeia.

A figura 1 em anexo ilustra uma tabela relativa ao espectro de atividade da gomesina, tanto forma não amidada quanto amidada, contra bactéria, fungos e leveduras. A avaliação das atividades bactericida e fungicida foi realizada de acordo com o descrito em J.Biol.Chem., 271, 29537-29544 (1996).

Na tabela n.d. significa “não detectado” para a faixa de concentrações testadas até 100 µM e 50 µM de gomesina, e n.m. significa não medido.

Verifica-se pela tabela que os peptídeos da invenção tem propriedades antibacterianas. A gomesina ilustrada (do exemplo 2 acima) tem efeito contra a maioria das cepas testadas, sendo que 24 das 27 cepas foram suscetíveis à gomesina em MIC (mínima concentração inibitória) abaixo de 1,6 µM para metade delas, em concentrações entre 1,6 e 6,25 µM (42%).

Também se verificam propriedades bactericidas nos peptídeos da invenção, por exemplo pelas mortandade de *Micrococcus luteus* e *Entamoeba coli* D22 ilustrada na figura 2 em anexo. 10 µM de gomesina do exemplo 2 (linha sólida) ou água (linhas pontilhadas) foram adicionadas a uma cultura em fase exponencial de *M. luteus* (círculos) ou *E. coli* (triângulos). Foram removidas alíquotas de tempos em tempos, e o número de CFU (unidades de formação de colônias) foi determinado em placas de agar Luria Bertani após incubação durante uma noite a 37°C. A velocidade de ação da gomesina, como se pode ver após aproximadamente 1 minuto, é uma das vantagens da invenção.

ATIVIDADE ANTIPARASÍTICA

Dentro de um exemplo de atividade antiparasítica, foi avaliada a viabilidade celular de *Leishmania (leishmania) amazonensis* (MRPO/BR/72/M 1841-LV-79) utilizando o ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolila-2)-2,5-difenil tetrazolio] conforme descrito em *J. Immunol. Methods* **65**,55-63 (1983) e adaptado para *Leishmani spp*, conforme *J. Immunol. Methods* **127**,11-18 (1990).

Quantidades entre 0,1-100 μ M foram testadas contra o parasita *Leishmania (leishmania) amazonensis*. Após uma hora de incubação, verificou-se que a viabilidade do parasita era dependente da concentração da gomesina utilizada, conforme ilustra a figura 3 anexa. Naquele gráfico gomesina sintética do exemplo 2, mostrado como barras sólidas, e um fragmento de hemoglobina (33-61 de alfa-hemoglobina bovina) mostrado como barras hachuradas utilizada como controle positivo, foram incubadas com os parasitas por 1h a 22°C em concentrações entre 0,3 e 80 μ M. A viabilidade do parasita (%) foi medida utilizando o ensaio de MTT descrito em *J. Immunol. Methods* **65**,55-63 (1983) e adaptado para *Leishmania spp*, conforme *J. Immunol. Methods* **127**,11-18 (1990).

ANTICORPOS

Anticorpos aos peptídeos da presente invenção podem ser produzidos utilizando técnicas imunológicas padrões para a produção de anticorpos policlonais, e se desejado imortalizando as células produtoras de anticorpos do hospedeiro imunicado para fontes de produção de anticorpos monoclonais.

FORMULAÇÕES CONTENDO GOMESINA

Os peptídeos da invenção podem ser usados numa série de composições que atuam contra bactérias, fungos e parasitas. Podem ser utilizados individualmente, em mistura com outros peptídeos da invenção, em mistura com outros agentes microbicidas, ou com ambos, e em conjunto com outros ingredientes conhecidos na técnica, por exemplo princípios ativos do tipo eritromicina, tetraciclina, azitromicina, cefalosporinas, etc., e ingredientes em geral como carreadores, diluentes, excipientes, etc.

Os peptídeos da invenção podem ser formulados para uso farmacêutico ou veterinário.

As formas de apresentação das formulações da invenção podem ser quaisquer, adaptadas como sabe o técnico no assunto ao fim que se destinam, por exemplo para uso tópico como cremes, óleos, unguentos, pós, gels, etc., ou adequadamente para administração oral, transdérmica, transmucosal, intramuscular, intravenosa, subcutânea, etc.

REIVINDICAÇÕES

1. PEPTÍDEO caracterizado pela fórmula geral:

onde:

- Z_1 é:
 - na ausência de X_{19} , um resíduo com amino terminal livre ou com amino grupo terminal bloqueado, propiciando resistência à atividade de proteases;
 - na presença de X_{19} , um resíduo básico, hidrofóbico, polar/grande ou pequeno, com amino grupo terminal livre disponível para o fechamento das pontas da molécula.
- C_2 , C_6 , C_{11} e C_{15} são independentemente cisteína, homocisteína ou penicilamina;
- P_1 e P_2 são pontes de dissulfeto entre C_2 e C_{15} , e C_6 e C_{11} , respectivamente;
- A_3 , A_4 , A_5 , A_{12} , A_{13} , A_{14} , A_{16} , A_{17} são independentemente resíduos básicos, hidrofóbicos, polar/grandes ou pequenos.
- A_7 até A_{10} são resíduos capazes de efetuar um dobra do tipo beta, e podem ser independentemente básicos, hidrofóbicos, polar/grandes ou pequenos, sendo ao menos um deles básico e ao menos um deles hidrofóbico;
- A_{18} é:
 - na ausência de X_{19} : um resíduo básico, hidrofóbico, polar/grande ou pequeno, tendo um terminal grupo carboxila livre ou formando um sal aceitável, ou amidado por uma amina de fórmula NH_3 ou RNH_2 ou R_2NH , onde R é, independentemente, uma hidrocarbila de um a seis carbonos, saturada ou insaturada,
 - na presença de X_{19} : um resíduo básico, hidrofóbico, polar/grande ou pequeno, cujo grupo carboxila terminal livre está envolvido no fechamento de pontas da molécula do peptídeo.
- X_{19} pode estar ausente ou presente, e estando presente é ou uma ligação química entre Z_1 e A_{18} ou uma molécula ou estrutura presente entre Z_1 e A_{18} e ligada a ambos, fechando as pontas da cadeia de aminoácidos do peptídeo da invenção.

- entre cerca de 15% e cerca de 50% de todos os resíduos de aminoácidos devem ser básicos;
 - apresentar carga positiva de ao menos +1 em pH fisiológico.
2. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que, na ausência de X_{19} , Z_1 é preferencialmente ácido piroglutâmico.
 3. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que, na presença de X_{19} , Z_1 é preferencialmente um resíduo de glutamina.
 4. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que preferencialmente A_3 , A_4 , A_8 , A_{10} e A_{16} são resíduos de aminoácido básico.
 5. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que preferencialmente A_5 , A_7 , A_{12} e A_{14} são resíduos de aminoácido hidrofóbico.
 6. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que preferencialmente A_{13} e A_{17} são resíduos de aminoácido pequeno.
 7. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que preferencialmente A_8 e A_{10} são ambos resíduos de aminoácidos básicos.
 8. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que, na ausência de X_{19} , A_{18} é preferencialmente um resíduo de aminoácido básico.
 9. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que, na presença de X_{19} , A_{18} é preferencialmente um resíduo de aminoácido básico cujo grupo carboxila terminal livre está envolvido no fechamento de pontas da molécula do peptídeo.
 10. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 4 caracterizado pelo fato de que o resíduo de aminoácido básico é preferencialmente escolhido dentro do grupo composto por arginina, lisina e histidina.
 11. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de que o resíduo de aminoácido hidrofóbico é preferencialmente escolhido do grupo composto por leucina, valina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano e tirosina.

12. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que o resíduo A₉ é polar, mais preferencialmente escolhido dentro do grupo composto por glutamina e asparagina.

13. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que os resíduos de aminoácidos pequenos são escolhidos dentro do grupo composto por treonina, glicina, serina e alanina.

14. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que

- A₃, A₄, A₁₀, A₁₆ e A₁₈ são arginina;
- A₅ é leucina;
- A₇ e A₁₄ são tirosina;
- A₈ é lisina;
- A₉ é glutamina;
- A₁₂ é valina;
- A₁₃ é treonina
- A₁₇ é glicina
- A₁₈ é arginina amidada
- Z₁ é ácido piroglutâmico
- X₉ não está presente

15. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de tratar-se de uma cadeia cíclica de pontas fechadas onde

- A₃, A₄, A₁₀, A₁₆ e A₁₈ são arginina;
- A₅ é leucina;
- A₇ e A₁₄ são tirosina;
- A₈ é lisina;
- A₉ é glutamina;
- A₁₂ é valina;
- A₁₃ é treonina
- A₁₇ é glicina
- A₁₈ é arginina
- Z₁ ácido glutâmico
- X₉ é uma ligação ou uma estrutura química ligando Z₁ e A₁₈.

16. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEO por extração da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, caracterizado por compreender as etapas de:

- coleta da hemolinfa
- separar os hemócitos do plasma
- obter um extrato ácido dos hemócitos
- isolar o peptídeo preferencialmente por HPLC

17. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEO que corresponda à fórmula geral

de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de se utilizar a técnica de síntese química Fmoc.

18. FORMULAÇÃO COMPREENDENDO PEPTÍDEO para combate a infecções em humanos, animais e plantas, principalmente no combate a bactérias, fungos e parasitas, caracterizado pelo fato de compreender, entre outros componentes, o peptídeo de fórmula geral

de acordo com a reivindicação 1.

19. Sistema de expressão recombinante para produção de peptídeo de fórmula geral

de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato do dito sistema de expressão compreender a seqüência de nucleotídeos que codifica o dito peptídeo ligado à uma seqüência controle que regula a dita expressão.

19. MÉTODO DE PREVENÇÃO DE CRESCIMENTO DE PARASITAS, FUNGOS E BACTÉRIAS caracterizado pelo fato de colocar os ditos parasitas, fungos e bactérias em contato com uma quantidade efetiva de um peptídeo de acordo com a reivindicação 1.
20. MÉTODO DE PREVENÇÃO DE CRESCIMENTO DE PARASITAS, FUNGOS E BACTÉRIAS de acordo com a reivindicação 19 caracterizado pelo fato de que o parasita é preferivelmente um protozoário.
21. MÉTODO DE PREVENÇÃO DE CRESCIMENTO DE PARASITAS, FUNGOS E BACTÉRIAS de acordo com a reivindicação 19 caracterizado pelo fato de que o parasita é preferivelmente uma *Leishmania*.
22. MÉTODO PARA INATIVAR A ENDOTOXINA DE BACTÉRIAS GRAM - NEGATIVAS caracterizado pelo fato de colocar em contato a dita endotoxina com uma quantidade de um peptídeo de acordo com a reivindicação 1 efetiva para desativar a dita endotoxina.
23. ANTICORPO caracterizado pelo fato de ser especificamente reactivo ao peptídeo da reivindicação 1.

FIGURA 1

Microorganismo	MIC = mínima concentração inibitória	
	GOMESINA	
	não amidada (EXEMPLO 2)	amidada (EXEMPLO 1)
bactérias gram-positivas		
<i>Aerococcus viridans</i>	0.8-1.6	0.8-1.6
<i>Bacillus cereus</i>	6.25-12.5	12.5-25
<i>Bacillus megaterium</i>	0.2-0.4	0.4-0.8
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1.6-3.15	3.15-6.25
<i>Enterococcus faecalis</i>	6.2-12.5	n.m.
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.8-1.6	3.15-6.25
<i>Micrococcus luteus</i>	0.4-0.8	0.4-0.8
<i>Pediococcus acidolactici</i>	3.15-6.25	3.15-6.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.6-3.15	3.15-6.25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.8-1.6	3.15-6.25
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0.8-1.6	1.6-3.15
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0.8-1.6	1.6-3.15
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.6-3.15	3.15-6.25
<i>Nocardia asteroides</i>	1.6-3.15	3.15-6.25
bactérias gram-negativas		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	n.d.	n.d.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	>100	n.m.
<i>Escherichia coli</i> 1106	0.8-1.6	1.6-3.15
<i>Escherichia coli</i> D22	0.4-0.8	0.4-0.8
<i>Escherichia coli</i> D31	0.8-1.6	0.8-1.6
<i>Escherichia coli</i> SBS363	0.4-0.8	0.4-0.8
<i>Erwinia carotovora carotovora</i>	3.15-6.25	3.15-6.25
<i>Enterobacter cloacae</i> β12	3.15-6.25	6.25-12.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.15-6.25	6.25-12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.6-3.15	1.6-3.15
<i>Salmonella thyphimurium</i>	0.8-1.6	0.8-1.6
<i>Serratia marcescens</i> Db11	n.d.	n.d.
<i>Xantomonas campestris</i> pv <i>orizae</i>	3.15-6.25	6.25-12.5
Fungos		
<i>Alternaria brassicola</i>	0.4-0.8	0.4-0.8
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.6-3.15	1.6-3.15
<i>Beauveria bassiana</i>	12.5-25	25-50
<i>Fusarium culmorum</i>	0.4-0.8	0.4-0.8
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.4-0.8	0.8-1.6
<i>Neurospora crassa</i>	0.4-0.8	0.4-0.8
<i>Nectria haematococca</i>	0.2-0.4	0.2-0.4
<i>Tricoderma viridae</i>	0.4-0.8	0.4-0.8
<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	0.8-1.6	0.8-1.6
leveduras		
<i>Candida albicans</i>	0.15-0.3	0.15-0.3
<i>Candida glabrata</i>	12.5-25	12.5-25
<i>Candida tropicalis</i>	3.15-6.25	n.m.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.8-1.6	n.m.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.6-3.15	1.6-3.15

FIGURA 2

FIGURA 3

RESUMO

PEPTÍDEO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEO, FORMULAÇÃO COMPREENDENDO PEPTÍDEO, MÉTODO DE PREVENÇÃO DE CRESCIMENTO DE PARASITAS, FUNGOS E BACTÉRIAS, ANTICORPOS, SISTEMA DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE PARA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO, MÉTODO PARA INATIVAR A ENDOTOXINA DE BACTÉRIAS GRAM -NEGATIVAS.

A presente invenção refere-se a peptídeos pequenos, com baixa atividade hemolítica, que apresentam atividades antiparasítica, antifúngica e antibacteriana de mesma ordem de grandeza.

Trata-se mais especificamente de um peptídeo denominado gomesina, com 18 resíduos de aminoácidos, configurado com uma estrutura tipo grampo formado por duas folhas beta-pregueadas antiparalelas unidas por uma dobra tipo beta, contendo 4 resíduos invariáveis de cisteína que formam duas pontes de dissulfeto, e que pode se configurar como uma cadeia cíclica de pontas fechadas.

[índice](#)

Isolation and Characterization of Gomesin, an 18-Residue Cysteine-rich Defense Peptide from the Spider *Acanthoscurria gomesiana* Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family*

Received for publication, February 23, 2000, and in revised form, August 4, 2000
Published, JBC Papers in Press, August 14, 2000, DOI 10.1074/jbc.M001491200

Pedro I. Silva, Jr.‡§, Sirlei Daffre§¶, and Philippe Bulet¶

From the ‡Laboratório de Artrópodes, Instituto Butantan, Avenue Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, Brazil, the §Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenue Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil, and the ¶Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR 9022, CNRS, "Réponse Immunitaire et Développement chez les Insectes," 15, rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

We have purified a small size antimicrobial peptide, named gomesin, from the hemocytes of the unchallenged tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. Gomesin has a molecular mass of 2270.4 Da, with 18 amino acids, including a pyroglutamic acid as the N terminus, a C-terminal arginine α -amide, and four cysteine residues forming two disulfide bridges. This peptide shows marked sequence similarities to antimicrobial peptides from other arthropods such as tachyplesin and polyphemusin from horseshoe crabs and androctonin from scorpions. Interestingly, it also shows sequence similarities to protegrins, antimicrobial peptides from porcine leukocytes. Gomesin strongly affects bacterial growth, as well as the development of filamentous fungi and yeast. In addition, we showed that gomesin affects the viability of the parasite *Leishmania amazonensis*.

Antimicrobial peptides are ubiquitously produced throughout the phylogenetic tree. The widespread occurrence of these antimicrobial substances suggests that they play a key role in innate immunity against microorganisms and other pathogens (1–3). Despite the diversity in their structure, most of these antimicrobial substances are small (less than 10 kDa) cationic and amphipathic peptides (for reviews see Refs. 4–6). Over the past 20 years several of these antimicrobial peptides were isolated and characterized from the hemolymph of invertebrates including two chelicerates: horseshoe crabs (merostomata) (for a review see Ref. 7) and scorpions (arachnida) (8, 9). In fact, the hemocytes of horseshoe crabs contain various cysteine-rich cationic peptides (tachyplesin, polyphemusin, tachycitin, tachystatin, and big defensin) with inhibitory effects on the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. In addition, two non-cysteine-rich proteins, anti-lipopolysaccharide factor, and factor D, with antimicrobial proper-

ties mainly against Gram-negative bacteria are produced in response to a microbial infection (7). The tachyplesin family of antimicrobial peptides, including polyphemusins, is located in the small granules of the hemocytes, as also are tachycitin and tachystatin, whereas the anti-lipopolysaccharide factor and factor D are found in the large granules and the big defensin in both types of granules. In addition to this group of chelicerates, several antimicrobial peptides were characterized in the hemolymph of the scorpions *Leiurus quinquestriatus* (8) and *Androctonus australis* (9). Among these peptides, two are members of the widespread invertebrate defensin family (for a review see Ref. 10). These scorpion defensins are mainly active against Gram-positive bacteria. Although only a defensin type molecule was found in *L. quinquestriatus* (7), three distinct antimicrobial peptides have been characterized from the hemolymph of unchallenged scorpions of the species *A. australis*: an insect defensin-like molecule (as mentioned above) and two additional cysteine-containing peptides, androctonin and buthinin (9). Androctonin is a 25-residue peptide with four cysteine residues, active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. Androctonin shows sequence similarities to tachyplesin and polyphemusin. In contrast, buthinin, a 34-amino acid peptide with three internal disulfide bridges, shows no sequence similarities with known antimicrobial peptides. Buthinin was found to be active only against bacteria.

Interestingly, in addition to strictly antimicrobial peptides found in chelicerates, additional molecules with antibacterial properties have been recently isolated from the venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. In this spider, two toxins (lycotoxins I and II) containing 25–27 amino acids and deprived of cysteine residues exhibit antimicrobial properties. Surprisingly, they show marked sequence similarities to some frog antimicrobial peptides such as magainin, adenoregulin, and dermaseptins. In addition to having antimicrobial activity, they dissipate ion and voltage gradients across the membranes of excitable cells and probably contribute to paralysis of venomous prey (11).

Nevertheless, no report of a strictly antimicrobial peptide from spiders is available in the literature. To understand whether spiders are able to mount an immune response through the production of antimicrobial substances as observed in insects, we started to investigate such possibility in the mygalomorph spider *Acanthoscurria gomesiana*. The characterization of antimicrobial peptides in this class of chelicerates would be of great value to understand the evolutionary aspects of innate immunity. On this basis, the use of mygalomorph spiders as an experimental model is very useful, because they

* This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil), and from Center National de la Recherche Scientifique (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The protein sequence reported in this paper has been submitted to the Swiss-Prot Data Bank with accession number P82358.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 55-11-38187272; Fax: 55-11-38187417; E-mail: sidaffre@icb.usp.br.

are one of the oldest species in the order *Araneae*.

In this paper, we report the isolation and full characterization of a small size antimicrobial peptide from hemocytes of unchallenged *A. gomesiana*. This peptide, named gomesin from the species *gomesiana*, has 18 amino acids and two disulfide bridges. This open-ended cyclic peptide shows marked sequence similarities to tachyplesin and polyphemusin from horseshoe crabs (12, 13) and to androctonin from the scorpion *A. australis* (9). More interestingly, gomesin shares also structural similarities with protegrins, antimicrobial peptides from porcine leukocytes (14). In addition to being effective against the growth of Gram-positive and -negative bacteria, synthetic gomesin was found to be strongly efficient against the growth of filamentous fungi and yeast and moderately active against the viability of the parasite *Leishmania amazonensis*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and Hemolymph Collection

The common spider (*A. gomesiana*) was obtained from the Arthropods Laboratory of the Butantan Institute (São Paulo, Brazil). *A. gomesiana* is a tarantula spider of the *Theraphosidae* family. The hemolymph (approximately 0.4 ml/spider) from animals of either sex at different stages of development was collected from prechilled animals by cardiac puncture with an apyrogenic syringe. To avoid hemocyte degranulation and coagulation, the hemolymph was collected in the presence of sodium citrate buffer, pH 4.6 (2:1, v/v) (15). The hemocytes were removed from plasma by centrifugation at $800 \times g$ for 10 min at 4 °C. Entire hemocytes were washed once with sodium citrate buffer and lysed by concentration in a vacuum centrifuge (Savant Instruments, Inc). For experimental spider immunization, 50 μ l of the Gram-negative bacteria *Enterobacter cloacae* (2×10^8 cells) were injected into the dorsal abdomen of the animals. The hemolymph was collected 48 h after injection.

Peptide Extraction and Purification

After concentration, the hemocytes collected from the hemolymph (1.8 ml) of unchallenged spiders were homogenized in a Dounce apparatus (maximum, 152 μ m; minimum, 76 μ m) in 1.5 ml of 2 M acetic acid supplemented with aprotinin (20 μ g/ml) as protease inhibitor. A second homogenization was performed by sonication (3 $\times$ 30 s) at medium power (Branson Ultrasonics Annemasse, France) in an ice-cold water bath, and extraction was performed over a period of 30 min at 4 °C under gentle shaking. The supernatant, obtained by centrifugation at $13,800 \times g$ for 30 min at 6 °C, was directly subjected to prepurification by solid phase extraction.

The combined cytosolic and organelle acid extracts were loaded onto serially linked classic Sep-Pak C₁₈ cartridges (Waters Associates) equilibrated in acidified water (0.05% trifluoroacetic acid). Three stepwise elutions were successively performed with 5%, 40%, and 80% acetonitrile in acidified water. The 40% Sep-Pak fraction was concentrated in a vacuum centrifuge, reconstituted with MilliQ water, and applied to reversed phase chromatography on a semipreparative Aquapore RP-300 C₈ column (250 $\times$ 7.0 mm, BrownleeTM) equilibrated with 2% acetonitrile in acidified water. Elution was performed with a linear 2–60% gradient of acetonitrile in acidified water over 120 min at a flow rate of 1.3 ml/min.

The active fraction from hemocytes (AGH2) was further purified by size exclusion chromatography using two serially linked HPLC-SEC¹ columns (Ultraspherogel SEC 3000 and SEC 2000 columns, 300 $\times$ 7.5 mm, BeckmanTM) protected by a precolumn (Ultraspherogel SEC, 40 $\times$ 7.5 mm, BeckmanTM). Elution was performed under isocratic conditions with 30% acetonitrile in acidified water at a flow rate of 0.4 ml/min.

HPLC purification was carried out at room temperature on a Beckman Gold HPLC system equipped with a Beckman 168 photodiode array detector. The column effluent was monitored for absorbance at 225 nm. Fractions corresponding to absorbance peaks were hand collected, concentrated under vacuum, and reconstituted in MilliQ water. The presence of antibacterial activity was determined by a liquid growth inhibition assay.

¹ The abbreviations used are: HPLC, high pressure liquid chromatography; MALDI-TOF-MS, matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; MIC, minimal inhibitory concentration; MOPS, 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid.

Structural Characterization

Capillary Zone Electrophoresis—Peptide purity was ascertained by capillary zone electrophoresis. Analysis was performed in a Model 270A-HT capillary electrophoresis system (Perkin Elmer Applied Biosystems) equipped with a fused silica tube (length, 72 cm; internal diameter, 50 μ m) as described previously (9).

MALDI-TOF-MS and Electrospray Ionization Mass Spectrometry—MALDI-TOF-MS was performed with a Bruker BIFEX[®] (Bremen, Germany) mass spectrometer operating in a positive linear mode as described previously (16).

The electrospray ionization mass spectrometry data were obtained using a Finnigan LCQTMDuo mass spectrometer (ThermoQuest) at a mass to charge (*m/z*) range of 2000. The peptides dissolved in water/acetonitrile (50:50, v/v) were introduced in the spectrometer by flow injection at 5 μ l/min and analyzed in the positive mode. Calibration was performed using the following mixture of standard substances: caffeine (*m/z* 195.2), L-methionyl-arginyl-phenylalanyl-alanine acetate H₂O (*m/z* 524.3), and Ultramark 1621 (*m/z* 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822, and 1922).

Reduction and Alkylation—Purified peptide (2 nmol) was subjected to reduction and S-pyridylethylation using a procedure described previously (17). The S-pyridylethylated peptide was desalted/purified on an Aquapore RP300 C₈ column (220 $\times$ 4.6 mm, BrownleeTM) using a linear gradient of 2–60% acetonitrile in acidified water over 120 min at a flow rate of 0.8 ml/min.

Synthetic amidated peptide (90 nmol) was reduced and S-carboxyamidomethylated by iodoacetamide (18). The S-carboxyamidomethylcysteine peptide was desalted/purified on a Vydac C₁₈ column (250 $\times$ 4.6 mm, Vydac[®]) using a linear gradient of 2–80% acetonitrile in acidified water over 60 min at a flow rate of 1.0 ml/min.

Pyroglutamate Aminopeptidase Treatment—The pyridylethylated peptide to be cleaved with pyroglutamate aminopeptidase (Roche Molecular Biochemicals) was dissolved in 100 mM sodium phosphate buffer containing 10 mM EDTA, 5 mM dithioerythritol and 5% glycerol (v/v), pH 8, using the procedure recommended by the manufacturer. The deblocked peptide was purified by HPLC onto a microbore reversed phase column (100 $\times$ 1 mm, Aquapore RP-300 C₈, BrownleeTM) using a linear 2 to 60% acetonitrile gradient in acidified water over 60 min at a flow rate of 80 μ l/min at 35 °C. The eluted peaks were analyzed by MALDI-TOF-MS, and the fraction corresponding to the deblocked peptide was subjected to sequencing by Edman degradation.

Determination of the Cysteine Arrangement by Trypsin Digestion—Native peptide was treated with trypsin (Roche Molecular Biochemicals) at an enzyme/substrate ratio of 1:20 (w/w) in a 40- μ l reaction medium containing 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5. Incubation was carried out overnight at 37 °C. The reaction was stopped by acidification with formic acid (final concentration, 3%). Peptide fragments were separated by HPLC on a narrowbore reversed phase column (Delta Pak HPI C₁₈, 2 $\times$ 150 mm; WatersTM) using a linear 2–80% acidified acetonitrile gradient over a period of 90 min at a flow rate of 200 μ l/min at 30 °C. The various peptide fragments obtained were analyzed by MALDI-TOF-MS, and the fragments of interest were subjected to microsequencing by Edman degradation.

Microsequence Analysis—Automated Edman degradation of the deblocked pyridylethylated peptide and of the peptide fragments and detection of phenylthiohydantoin-derivatives were performed using a pulse liquid automatic sequencer (Perkin Elmer 32 Applied Biosystems model 473A).

Peptide Synthesis

Nonamidated and amidated peptides were synthesized according to a procedure previously described (9). Briefly, the peptides were synthesized according to classical Fmoc (*N*-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl) chemistry. At the end of the process, the peptides (25 μ mol) were taken up to 2.5 liters in 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 8.5, and allowed to renature by air oxidation overnight at room temperature under stirring. After renaturation, the pH was adjusted to 4 with acetic acid and the peptide solution loaded onto Sep-Pak Vac C₁₈ cartridges (Waters Associates) equilibrated with acidified water. The peptides were eluted with 60% acetonitrile in acidified water, concentrated in a vacuum centrifuge and purified to homogeneity by reversed phase chromatography using a preparative column (Aquapore RP 300 C₈, 150 $\times$ 10 mm, BrownleeTM).

Bioassays

The microbial strains were those used in previous studies (19–22). The following additional fungal and bacterial strains were generous

gifts from different colleagues: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. hemeolyticus* (H. Monteil, Institute of Bacteriology, University of Strasbourg, France), *Nocardia asteroides* (Y. Piémont, Institute of Bacteriology, University of Strasbourg, France), *Serratia marcescens* Db11 (H.G. Boman, Department of Microbiology, University of Stockholm, Stockholm, Sweden), *Beauveria bassiana* (INRA, St-Christol-les-Ales, France), and *Tricophyton mentagrophytes* and *Candida tropicalis* (H. Koenig, Laboratory of Mycology, University of Medicine, Strasbourg, France).

During the purification procedure, antibacterial activity was monitored by a liquid growth inhibition assay against *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli* SBS363 as described in Ref. 23. The MIC of the synthetic peptides was determined against fungi and bacterial strains using a procedure described previously (9). When the antifungal activity assay was performed in the presence of salt, the culture medium was prepared in phosphate-buffered saline, 137 mM NaCl. MICs are expressed as the [a] – [b] interval of concentrations, where [a] is the highest concentration tested at which the microorganisms are growing and [b] is the lowest concentration that causes 100% growth inhibition.

The bactericidal assay was monitored against *M. luteus* and *E. coli* D22 as described in Ref. 9. The final concentration of amidated gomesin tested was 10 μ M. For the fungicidal assay, spores of *Neurospora crassa* were incubated in the presence of 10 μ M amidated gomesin. After 0.5, 1, 2, 4, and 8 h, the culture medium containing the peptide was removed and replaced with fresh medium. After 48 h the cultures were examined microscopically and spectrometrically.

The hemolytic activity assay was monitored against human erythrocytes. Two times serial dilutions of synthetic gomesin from concentrations of both forms of gomesin of 0.1 to 100 μ M were incubated in Eppendorf tubes with a suspension of erythrocytes (0.4%) in phosphate-buffered saline. As a positive control (100% lysis), the erythrocytes were incubated with 0.1% SDS. After 1 h at 37 °C, the samples were centrifuged (320 $\times$ g, 5 min), and the absorbance of the supernatant (50 μ l) was measured at 405 nm using a microtiter plate reader.

For the antiparasitic assay, cell viability of *L. (Leishmania) amazonensis* (MPRO/BR/72/M 1841-LV-79) was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay as described (24) and adapted for *Leishmania* spp. (25). Briefly, 5 $\times$ 10⁶ stationary phase promastigotes suspended in buffered saline (116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 5.5 mM D-glucose, 10 mM MOPS, pH 7.2) were incubated with two times serial dilutions of synthetic gomesin and hemoglobin fragment (33–61 of bovine α -hemoglobin) (26) from 0.3 to 80 μ M. After a 1-h incubation at 22 °C, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide was added to a final concentration of 1 mg/ml, and the reaction was measured after 40 min in a microtiter plate reader at 595 nm.

RESULTS

Purification and Primary Structure Determination of Gomesin—We first performed a pilot experiment to compare the antibacterial activity against *M. luteus* of crude extracts of hemocytes from unchallenged and bacteria-challenged *A. gomesiana* spiders. Because no increase in antibacterial activity was found in the immunized spiders, we decided to purify the antimicrobial compounds from native spider hemocytes.

The antimicrobial compounds from the hemocytes were extracted under acidic conditions after sonication. The acidic extract was prepurified by solid phase extraction. The three eluted fractions obtained (5, 40, and 80%) were submitted to reversed phase HPLC and to the antibacterial assay. Among the different fractions obtained from the 40% Sep-Pak fraction, three were found to have activity against *M. luteus* and *E. coli*, the two bacterial strains used for the bioassay (Fig. 1A). In the present study, we focused our attention on fraction AGH2, which has activity against both strains of bacteria. MALDI-MS analysis of fraction AGH2 revealed the presence of three different molecules with molecular masses of 413.4, 2270.4, and 7179.8 Da. To separate these molecules, the second step of purification was performed using size exclusion chromatography (Fig. 1B). Among the different fractions obtained, only one peak was found to be active against *M. luteus* and *E. coli*. Because a single molecular mass of 2270.4 Da was obtained by

FIG. 1. Purification of gomesin from spider hemocytes by reversed phase and size exclusion HPLC. An acidic extract obtained from *A. gomesiana* hemocytes was submitted to solid phase extraction on Sep-Pak C₁₈ cartridges. The fraction eluted with 40% ACN was analyzed on an Aquapore RP-300 C₈ column with a linear 2 to 60% acetonitrile gradient in acidified water over 120 min (dotted line), at a flow rate of 1.3 ml/min (A). Three fractions were active against *E. coli* SBS363, AGH 1–3 (shaded rectangle). Gomesin present in fraction AGH2, also active against *M. luteus* (open rectangle), was purified by size exclusion chromatography using two serially connected Ultraspherogel SEC 3000 and SEC 2000 columns. Elution was performed under isocratic conditions with 30% acetonitrile in acidified water at a flow rate of 0.4 ml/min (B). Absorbance was monitored at 225 nm, and antibacterial activity was detected by liquid growth inhibition assay.

mass spectrometry, the molecule was considered to be pure enough for sequencing by Edman degradation.

Because no PTH-derivative signal was observed in the 25 cycles of Edman degradation, this molecule was supposed to be a N-terminally blocked peptide. To verify this hypothesis, the reduced and S-pyridylethylated molecule was subjected to pyroglutamate aminopeptidase digestion to remove a potential pyroglutamic acid. After purification by reversed phase HPLC of the digestion products, two fractions were obtained (data not shown). Mass spectrometry analysis revealed a difference of 111 Da between the two molecules that corresponded to the exact molecular mass of a pyroglutamic acid. For this reason, only the compound with the smallest molecular mass (2583.8 Da) was subjected to Edman degradation. The following 17-residue sequence was obtained: C*RRLC*YKQRC*VTYC*RGR, where C* stands for a pyridylethylated cysteine residue. The identification of the four pyridylethylated cysteine residues after Edman degradation is in agreement with the increased mass (424.3 Da) of the native peptide following reduction/alkylation with vinyl pyridine (2694.7 Da). From the primary se-

quence obtained and assuming pyroglutamic acid (Z) as the first residue and four cysteine residues involved in two disulfide bridges, the mass calculated as 2269.7 Da differs only by approximately +1 Da from the mass measured by MALDI-TOF-MS (2270.4 Da). This observation indicates a possible amidation of the C-terminal arginine of the peptide.

To define the cysteine array, the native molecule (ZC*RRLC*YKQRC*VTYC*RGR) was subjected to tryptic digestion. Following digestion, several fragments were separated by reversed phase HPLC. A peak with a molecular mass at 1006.9 Da was sequenced by Edman degradation, and the following sequence was obtained: Leu-Val-(Tyr/Thr)-(Tyr/Lys). The presence of two clear PTH-derivatives at positions 3 and 4 at the same intensity clearly demonstrated the presence of a double sequence in this fraction. This observation, associated with the primary structure established, is in agreement with the linkage of the tetrapeptide Leu⁵-Cys⁶-Tyr⁷-Lys⁸ to the sequence Cys¹¹-Val¹²-Thr¹³-Tyr¹⁴. Therefore, the two intramolecular disulfide bridges are between Cys²¹ and Cys¹⁵⁴ and between Cys⁶² and Cys¹¹³.

To confirm our hypothesis concerning the terminal amidation of this peptide, amidated and non-amidated molecules were prepared chemically. After renaturation and purification to homogeneity, the identity and integrity of both compounds were confirmed by mass spectrometry and capillary zone electrophoresis (data not shown). When the native molecule and the two synthetic forms were analyzed by MALDI-TOF-MS, the monoisotopic molecular mass of the native molecule (2270.9 Da) was in perfect agreement with the monoisotopic molecular mass of the synthetic amidated molecule (2270.5 Da) compared with the molecular mass of the non-amidated form (2271.6 Da). This confirmed that the native peptide presents a C-terminal arginine α -amide. This 18-residue amidated peptide was named gomesin in reference to the species name of the spider *A. gomesiana*.

Antimicrobial Activity Spectrum of the Amidated Gomesin—The MIC of gomesin purified from spider hemocytes against *M. luteus* was 0.25–0.5 μ M, similar to the MIC found for the synthetic peptides (0.4–0.8 μ M) (Table I). The amidated synthetic gomesin had a strong activity against almost all Gram-positive bacteria tested (MICs < 3.15 μ M), except *Pediococcus acidolactici* (MIC = 3.15–6.25 μ M) and *Bacillus cereus* and *E. faecalis* (MIC = 6.25–12.5 μ M). Therefore, the synthetic gomesin can be considered equivalent to the native one. Synthetic gomesin showed also high activity against almost all Gram-negative bacteria tested with the exception of the insensitive strain *Agrobacterium tumefaciens* and the entomopathogenic bacteria *S. marcescens*. The most sensitive strains were *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella thyphimurium* (MICs < 3.15 μ M). The other strains were affected by gomesin at MICs between 3.15 and 6.25 μ M. Only a partial growth inhibition of *Alcaligenes faecalis* was observed at concentrations of 50–100 μ M.

All filamentous fungi tested were highly sensitive to gomesin (MIC < 3.15 μ M), with the exception of *B. bassiana* (MIC = 12.5–25 μ M). Gomesin was also found to have a marked activity against most of the yeast strains tested such as *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, and *Saccharomyces cerevisiae* (MIC < 6.25 μ M) and moderate activity against *C. glabrata* (MIC = 12.5–25 μ M). When the antifungal activity assay was performed under salt conditions (137 mM ion strength), the activity was found to be identical to that recorded under normal conditions (data not shown).

To ascertain the role of the disulfide bonds on gomesin antibacterial activity, we have determined the antibacterial activity of the reduced/S-carboxyamidomethylated peptide. The mo-

TABLE I
Antimicrobial activity spectrum of gomesin

The activity of amidated gomesin was compared to a non-amidated form (gomesin-fa) and to androctonin a four cysteine-rich antimicrobial peptide from the scorpion *A. australis* (9).

Microorganisms	Minimal inhibitory concentration		
	Gomesin	Gomesin-fa	Androctonin
	μ M		
Gram-positive bacteria			
<i>Aerococcus viridans</i>	0.8–1.6	0.8–1.6	0.3–0.6
<i>Bacillus cereus</i>	6.25–12.5	12.5–25	ND ^a
<i>Bacillus megaterium</i>	0.2–0.4	0.4–0.8	NM ^b
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1.6–3.15	3.15–6.25	ND
<i>Enterococcus faecalis</i>	6.2–12.5	NM	NM
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.8–1.6	3.15–6.25	NM
<i>Micrococcus luteus</i>	0.4–0.8	0.4–0.8	0.6–1.5
<i>Pediococcus acidolactici</i>	3.15–6.25	3.15–6.25	NM
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.6–3.15	3.15–6.25	15–30
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.8–1.6	3.15–6.25	NM
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0.8–1.6	1.6–3.15	NM
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0.8–1.6	1.6–3.15	NM
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.6–3.15	3.15–6.25	NM
<i>Nocardia asteroides</i>	1.6–3.15	3.15–6.25	NM
Gram-negative bacteria			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ND	ND	ND
<i>Alcaligenes faecalis</i>	>100	NM	NM
<i>Escherichia coli</i> 1106	0.8–1.6	1.6–3.15	6–15
<i>Escherichia coli</i> D22	0.4–0.8	0.4–0.8	6–15
<i>Escherichia coli</i> D31	0.8–1.6	0.8–1.6	3–6
<i>Escherichia coli</i> SBS363	0.4–0.8	0.4–0.8	NM
<i>Erwinia carolovorana carolovorana</i>	3.15–6.25	3.15–6.25	ND
<i>Enterobacter cloacae</i> β 12	3.15–6.25	6.25–12.5	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.15–6.25	6.25–12.5	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.6–3.15	1.6–3.15	NM
<i>Salmonella thyphimurium</i>	0.8–1.6	0.8–1.6	3–6
<i>Serratia marcescens</i> Db11	ND	ND	ND
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. orizae	3.15–6.25	6.25–12.5	ND
Fungi			
<i>Alternaria brassicola</i>	0.4–0.8	0.4–0.8	3–6
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.6–3.15	1.6–3.15	25–50
<i>Beauveria bassiana</i>	12.5–25	25–50	NM
<i>Fusarium culmorum</i>	0.4–0.8	0.4–0.8	3–6
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.4–0.8	0.8–1.6	6–12
<i>Neurospora crassa</i>	0.4–0.8	0.4–0.8	6–12
<i>Nectria haematococca</i>	0.2–0.4	0.2–0.4	6–12
<i>Tricoderma viridae</i>	0.4–0.8	0.4–0.8	6–12
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0.8–1.6	0.8–1.6	NM
Yeasts			
<i>Candida albicans</i>	0.15–0.3	0.15–0.3	1.6–3.15
<i>Candida glabrata</i>	12.5–25	12.5–25	NM
<i>Candida tropicalis</i>	3.15–6.25	NM	NM
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.8–1.6	NM	NM
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.6–3.15	1.6–3.15	NM

^a ND means not detected in the range of the concentrations tested up to 100 μ M (gomesin) and 50 μ M (androctonin).

^b NM means not measured.

lecular mass measured by electrospray ionization mass spectrometry showed that 100% of amidated gomesin was reduced and alkylated after treatment with dithiothreitol and iodoacetamide (data not shown). Using a calibrated solution of synthetic peptide, the amount of reduced/alkylated gomesin has been estimated by HPLC and the MICs determined against *M. luteus* and *E. coli* SBS363. The MICs observed for both strains at 12.5–25 μ M are significantly lower than the one observed for the non-modified gomesin (0.4–0.8 μ M; Table I).

Bactericidal and Fungicidal Effect of Gomesin—When synthetic gomesin was incubated with *M. luteus* and *E. coli* D31 at concentrations 12.5 times higher than the respective MICs, no living bacteria were detected after a 1-min incubation with both tested strains (Fig. 2). In the presence of synthetic gomesin at a concentration 12.5 times higher than the respective MIC, no growth of *N. crassa* spores was observed after a 30-min incubation (data not shown).

FIG. 2. Kinetics of *M. luteus* and *E. coli* D22 killing by gomesin. Synthetic gomesin (10 μM , solid lines) or water (control, dotted lines) was added to an exponential phase culture of *M. luteus* (circle) or *E. coli* D22 (triangle). Aliquots were removed at various times, and the number of colony forming units (CFU) was determined on Luria Bertani agar plates after overnight incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$.

Activity of Gomesin against Eukaryotic Cells—To determine the effect of gomesin against eukaryotic cells, various concentrations of synthetic peptide (0.1–100 μM) were tested against the parasite *L. (L.) amazonensis* and human erythrocytes using viability and hemolytic assays, respectively. After 1 h of incubation, the viability of the parasite was found to be dependent on the gomesin concentration used (Fig. 3). Using as control a hemoglobin fragment (33–61 of bovine α -hemoglobin) (26), which exhibits some effect on the viability of the parasite at high concentrations (>40 μM), gomesin was found to strongly reduce viability even at concentration as low as 2.5 μM . In addition, in an hemolytic assay against human erythrocytes, the percentage of cell lysis was found to be dependent of the gomesin (amidated and non-amidated) concentrations tested. From 0.1 μM (the lowest concentration tested) up to 0.2 μM , the percentage of hemolysis remains rather low (<5%), whereas increasing the peptide concentration up to 1 μM results in a rapid and significant elevation of the percentage of cell lysis (up to approximately 16%). However, an increase in the concentration of gomesin of 2 orders of magnitude (final concentration tested of 100 μM) has only little effect on human erythrocyte lysis (Fig. 4). This contrast to the gomesin activity against the parasite *L. (L.) amazonensis* where cell viability was found to be almost linearly dependent of the peptide concentration (see Fig. 3).

DISCUSSION

To gain information on the involvement of antimicrobial peptides in arachnid immunity, we started to investigate the antimicrobial peptides of the tarantula spider *A. gomesiana*, which can live over 23 years (Butantan Institute, São Paulo, registration book). We have purified and characterized from *A. gomesiana* hemocytes an antimicrobial peptide that we named gomesin. The level of antibacterial activity found in the hemocytes has not changed in bacteria-challenged spiders, such as scorpions (9), ticks (26), shrimps (27), and bivalve mollusks (28), suggesting that the antimicrobial peptides are in fact stored in the spider hemocytes and may be released into the plasma upon infection, as established in mollusks (28). This remains to be confirmed by gomesin mRNA quantification.

Gomesin is an 18-residue peptide with four cysteine residues engaged in disulfide bridges, a pyroglutamic acid as the N terminus, and an Arg α -amide as C-terminal residue. The

FIG. 3. Activity of gomesin against *L. (L.) amazonensis* promastigotes. The synthetic gomesin (solid bar) and a hemoglobin fragment (33–61 of bovine α -hemoglobin) (hatched bar) used as positive control were incubated with the parasites for 1 h at 22 $^{\circ}\text{C}$ at concentrations ranging from 0.3 to 80 μM . Parasite viability (%) was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay as described previously (24) and adapted for *Leishmania* spp. (25).

FIG. 4. Activity of gomesin against human erythrocytes. Both forms of synthetic gomesin: amidated (circle) and nonamidated (triangle) were incubated with human erythrocytes at concentrations ranging from 0.1 to 100 μM for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. The hemolysis percentage was expressed in relation to a 100% lysis control (erythrocytes incubated with 0.1% SDS).

presence of two internal disulfide bridges plus a C-terminal amidation certainly contributes to the stability of the peptide to proteases within the hemocytes or if released into the hemolymph. Gomesin has six positively charged residues (five Arg and one Lys for a calculated pI of 12.7) and showed similarities to (i) antimicrobial peptides from horseshoe crabs: tachyplesins and polyphemusins (50%, determined by using Clustal V method with PAM250 residue weight table) (12, 13), (ii) androctonin (23%), from scorpions (9), and finally (iii) protegrins (17%), porcine leukocyte antimicrobial peptides (14) (Fig. 5). In gomesin, the four cysteine residues form two disulfide bridges linking Cys² to Cys¹⁵ and Cys⁶ to Cys¹¹. Such a disulfide array (Cys1-Cys4 and Cys2-Cys3) is identical for all antimicrobial peptides (Fig. 5). Interestingly, in gomesin an equal number of three residues is observed on each segment upstream and downstream the disulfide bridge Cys2-Cys3 (Arg³-Arg⁴-Leu⁵ and Val¹²-Thr¹³-Tyr¹⁴, gomesin numbering) as in tachyplesin I and polyphemusins II. A similar balance in the number of amino acids between the two disulfide bridges is also found in protegrin PG-1 (one residue in each segment). Unlike gomesin, the horseshoe crab peptides and protegrin PG-1, androctonin presents an unequal number of residues: five residues (Arg-Gln-Ile-Lys-Ile) upstream Cys2 and three amino acids (Tyr-Tyr-Lys) downstream Cys3. This suggests that gomesin will adopt a β -hairpin structure close to the one found in tachyplesin (29,

FIG. 5. Amino acid sequence comparison of gomesin to vertebrate and invertebrate antimicrobial peptides. Gomesin was compared with (i) tachyplesin I and (ii) polyphemus II from the horseshoe crabs *Tachyplesus tridentatus* and *Limulus polyphemus*, respectively (12, 13); (iii) androctonin from the scorpion *A. australis* (9); and (iv) protegrin PG-1 from porcine leukocytes (14). Z stands for pyroglutamic acid, and asterisks indicate a C-terminal α -amide. Identical and conserved residues are shaded.

30) and protegrin (31, 32) rather than the one observed for androctonin (33). In fact, the main differences that can strongly modify the properties (physico-chemical and bioactivity) are located at (i) the level of the turn, between Cys2 and Cys3 and (ii) at the N-terminal segment upstream the first cysteine residue, whereas the C-terminal has almost the same physico-chemical properties with the exception of androctonin (Fig. 5). In the turn, the net charge is rather different from one molecule to the other and this can modify the activities since this is exposed to the external environment as pointed out by the different three-dimensional structures available (29–33). The size of the N-terminal segment upstream Cys1 varies from one amino acid (pyroglutamic acid) for gomesin to two and three amino acids for tachyplesin and polyphemus/androctonin, respectively and up to five residues for the longest one in PG-1 (Fig. 5). Gomesin has no charge in this segment, whereas one positive charge is observed in androctonin and tachyplesin and two in polyphemus and protegrin. Comparison of gomesin to the horseshoe crab antimicrobial peptides shows that the four cysteine residues, three basic residues (Arg⁴, Lys⁸, and Arg¹⁶, gomesin numbering), one hydrophobic residue (Leu⁵ in gomesin versus Val in the horseshoe crab peptides), and a tyrosine residue (Tyr⁷) are conservative and that most conserved residues are arranged in a same cluster (Arg⁴ to Lys⁸) in gomesin and tachyplesin/polyphemus. Finally, all peptides except androctonin have a C-terminal arginine α -amide. This amidation of the basic residue increases the electropositivity of the peptide and probably facilitate the interaction of the peptide with the membrane of the microorganisms.

Gomesin is effective against the majority of the bacterial strains tested. 24 of the 27 bacterial strains tested were susceptible to gomesin at MICs (i) below 1.6 μ M for half of them, (ii) between 1.6 and 6.25 μ M (42%), and (iii) between 6.25–12.5 μ M for two strains (*B. cereus* and *E. faecalis*). Gomesin is bactericidal on *M. luteus* and *E. coli* within 1 min (Fig. 2), and this differs from androctonin (10 min against *M. luteus* and over 2 h against *E. coli*) (9). Such a bactericidal effect was also observed for tachyplesins and polyphemusins, on *S. aureus* and *E. coli* (34) and for protegrin PG-1 on methicillin-resistant *S. aureus* and *P. aeruginosa* (35). This “fast killing” of gomesin may offer significant advantages over conventional nonpeptide antimicrobial agents that require longer periods of exposure.

In addition to being antibacterial, gomesin has marked activity against a variety of fungi at a rather low concentration (<3.15 μ M), the most resistant strain being the entomopathogenic fungus *B. bassiana* and the filamentous yeast *C. glabrata* (Table I). Tachyplesins and polyphemusins have also a pronounced activity against yeast (13) and a lower activity

against filamentous fungi (36). When compared with androctonin, the antimicrobial activity of gomesin is always higher, with the exception of *A. viridans* (Table I). Interestingly, the activity of gomesin on *N. crassa* was not affected at physiological salt concentrations. In addition, the synthetic amidated gomesin is slightly more active than the non-amidated form, suggesting that amidation has no effect on the activity of the peptide (Table I).

Finally, the pronounced decrease in activity observed against *M. luteus* and *E. coli* following reduction/alkylation of the gomesin disulfide bridges suggests the importance of the disulfide bridges for the biological activity of the molecule. Similarly, studies with tachyplesin analogs, where the SH groups were chemically protected to prevent cyclization or when cysteine residues were replaced by alanine residues, suggested that the disulfide bridge were also essential for antibacterial activity (37). In fact, replacements of the cysteine residues by various amino acids were in favor of the necessity to maintain the hydrophobic-hydrophilic balance in the peptide to retain its biological activity (36). Protegrin and its reduced form were active in the absence of high salt at comparable concentrations, but the disulfide bridges were essential for activity in media containing salt concentrations comparable with those found in sera and extracellular fluids (38).

Moreover, even if gomesin has evident hemolytic activity against human erythrocytes at a rather low concentration (16% at 1 μ M), the effect on these human cells does not increase, whereas the peptide concentration reaches 100 μ M. This is in contrast to the hemolytic effect of tachyplesin, a response which was found to be linearly dependent on the peptide concentration tested, 5% up to 20 μ M up to 100% hemolysis at 100 μ M (34). Surprisingly, Rao (36) observed only 30% hemolysis with 100 μ M of tachyplesin. On the other hand, the scorpion androctonin is not hemolytic even at high 150 μ M (9). The differences in hemolytic activity observed between androctonin and gomesin and tachyplesin, could be attributed to (i) a longest C terminus and (ii) charge differences in this section of the molecule. Gomesin was found to be more toxic to *Leishmania (L.) amazonensis* promastigote than to human erythrocytes. In fact in the presence of 2.5 μ M gomesin only 50% of promastigotes were viable. Such effect was also observed with the cecropin A-melittin hybrid peptide when tested against *Leishmania donovani* promastigotes (39). This activity on *Leishmania* promastigotes could be attributed to a higher percentage of anionic phospholipids in their plasma membrane of compared with the plasma membrane of mammalian cells and of ergosterol instead of cholesterol (40). The presence of a large number of positively charged amino acids (five Arg and one Lys) in gomesin contributes to a higher specificity of the peptide for prokaryotic cells because of a higher electronegativity of prokaryotic cells when compared with the eukaryotic cell membrane. The participation of hydrophobic residues in the interaction may occur during later events, resulting in bacterial lysis. To obtain a better understanding of the mode of action of gomesin, its three-dimensional structure should be elucidated using NMR spectroscopy.

In conclusion, gomesin appears to have an interesting potential for therapeutic application because of its strong and broad activity spectrum (affecting bacteria, fungi, yeasts, and eukaryotic parasites) and structural properties conferring high stability to the molecule. In addition, the conservation of the activity in a physiological condition supports the possibility to develop this peptide as a new drug for human therapy. Despite hemolytic activity of the gomesin against human erythrocytes, this activity could be decreased or abolished through the modifica-

tion by molecular biology and/or chemical approach as obtained in tachyplesin analogs (41).

Acknowledgments—We are grateful to Dr. Sandrine Uttenweiler-Joseph for mass spectromotography analysis of native gomesin and José Mario de Freitas Balanco for antiparasitic assay.

REFERENCES

- Boman, H. G. (1995) *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 60–65
- Ganz, T., and Lehrer, R. I. (1999) *Mol. Med. Today* **5**, 292–297
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. (1999) *Science* **284**, 1313–1318
- Hwang, P. M., and Vogel, H. J. (1998) *Biochem. Cell Biol.* **76**, 235–246
- Andrew, D. (ed) (1998) *Biopolymers (Peptide Sci.)* **47**, 415–491
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., and Hoffmann, D. (1999) *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 329–344
- Iwanaga, S., Kawabata, S., and Muta, T. (1998) *J. Biochem. (Tokyo)* **123**, 1–15
- Cociancich, S., Goyffon, M., Bontems, F., Bulet, P., Bouet, F., Menez, A., and Hoffmann, J. A. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 17–22
- Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Goyffon, M., Fehlbaum, P., Hoffmann, J. A., Van Dorsselaer, A., and Bulet, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 29537–29544
- Dimarcq, J. L., Bulet, P., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (1998) *Biopolymers (Peptide Sci.)* **47**, 465–477
- Yan, L., and Adams, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 2059–2066
- Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., and Shimonishi, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16709–16713
- Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., and Shimonishi, Y. (1989) *J. Biochem. (Tokyo)* **106**, 663–668
- Kokryakov, V. N., Harwig, S. S., Panyutich, E. A., Shevchenko, A. A., Aleshina, G. M., Shamova, O. V., Korneva, H. A., and Lehrer, R. I. (1993) *FEBS Lett.* **327**, 231–236
- Söderhall, K., and Smith, V. J. (1983) *Dev. Comp. Immunol.* **7**, 229–239
- Uttenweiler-Joseph, S., Moniatte, M., Lambert, J., Van Dorsselaer, A., and Bulet, P. (1997) *Anal. Biochem.* **247**, 366–375
- Bulet, P., Cociancich, S., Reuland, M., Sauber, F., Bischoff, R., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 977–984
- Aitken, A., and Learmonth, M. (1996) in *The Protein Protocols Handbook* (Walker, J. M., ed) pp. 339–340, Humana Press, Totowa, NJ
- Bulet, P., Cociancich, S., Dimarcq, J.-L., Lambert, J., Reichhart, J.-M., Hoffmann, D., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 24520–24525
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 33159–33163
- Cociancich, S., Dupont, A., Hegy, G., Lanot, R., Holder, F., Hetru, C., Hoffmann, J. A., and Bulet, P. (1994) *Biochem. J.* **300**, 567–575
- Lamberty, M., Ades, S., Uttenweiler-Joseph, S., Brookhart, G., Bushey, D., Hoffmann, J. A., and Bulet, P. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 9320–9326
- Bulet, P., Dimarcq, J. L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., and Hoffmann, J. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14893–14897
- Mosmann, T. (1983) *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63
- Kiderlen, A. F., and Kaye, P. M. (1990) *J. Immunol. Methods* **127**, 11–18
- Fogaça, A. C., da Silva, P. I., Jr., Miranda, M. T., Bianchi, A. G., Miranda, A., Ribolla, P. E., and Daffre, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25330–25334
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., and Bachere, E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28398–28406
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., and Roch, P. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 4233–4244
- Kawano, K., Yoneya, T., Miyata, T., Yoshikawa, K., Tokunaga, F., Terada, Y., and Iwanaga, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 15365–15367
- Tamamura, H., Kuroda, M., Masuda, M., Otaka, A., Funakoshi, H., Nakashima, N., Yamamoto, N., Waki, M., Matsumoto, J. M., Lancelin, D., Kohda, D., Tate, S., Inagaki, F., and Fujii, N. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 209–216
- Aumelas, A., Mangoni, M., Roumestand, C., Chiche, L., Despau, E., Grassy, G., Calas, B., and Chavanieu, A. (1996) *Eur. J. Biochem.* **237**, 575–583
- Fahrner, R. L., Dieckmann, T., Harwig, S. S., Lehrer, R. I., Eisenberg, D., and Feigon, J. (1996) *Chem. Biol.* **3**, 543–550
- Mandard, N., Sy, D., Maufrais, C., Bonmatin, J., Bulet, P., Hetru, C., and Vovelle, F. (1999) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **17**, 367–380
- Katsu, T., Nakao, S., and Iwanaga, S. (1993) *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 178–181
- Steinberg, D. A., Hurst, M. A., Fujii, C. A., Kung, A. H., Ho, J. F., Cheng, F. C., Loury, D. J., and Fiddes, J. C. (1997) *Antimicrob. Agents Chemot.* **41**, 1738–1742
- Rao, A. G. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **361**, 127–134
- Tamamura, H., Ikoma, R., Niwa, M., Funakoshi, S., Murakami, T., and Fujii, N. (1993) *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 978–980
- Harwig, S. S. L., Waring, A., Yang, H. J., Cho, Y., Tan, L., and Lehrer, R. I. (1996) *Eur. J. Biochem.* **240**, 352–357
- Diaz-Achirica, P., Ubach, J., Guinea, A., Andreu, D., and Rivas, L. (1998) *Biochem. J.* **330**, 453–460
- Wassef, M. K., Fioretti, T. B., and Dwyer, D. M. (1985) *Lipids* **20**, 108–115
- Tam, J. P., Lu, Y.-A., and Yang, J.-L. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 783–790