Aline Harumi Fukuzawa

**Envolvimento dos hemócitos na
resposta imune da aranha
caranguejeira *Acanthoscurria
gomesiana***

Tese (Doutorado) apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

São Paulo

2007

Aline Harumi Fukuzawa

**Envolvimento dos hemócitos na
resposta imune da aranha
caranguejeira *Acanthoscurria
gomesiana***

Tese (Doutorado) 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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sirlei Daffre

São Paulo

2007

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

© reprodução total

Fukuzawa, Aline Harumi.

Envolvimento dos hemócitos na resposta imune da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana* / Aline Harumi Fukuzawa. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Sirlei Daffre.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.
Linha de pesquisa: Bioquímica e Imunologia de Artrópodes.

Versão do título para o inglês: The role of hemocytes on the immunity of the spider
Acanthoscurria gomesiana.

Descritores: 1. Imunidade Inata 2. Aranha 3. Hemócitos 4. Coagulação 5. Peptídeos
antimicrobianos I. Daffre, Sirlei II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. III. Título.

ICB/SBIB185/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Harumi Fukuzawa.

Tese: Envolvimento dos hemócitos na resposta
imune da aranha caranguejeira *Acanthoscurria*
gomesiana .

Orientador: Sirlei Daffre.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a) Assinatura
 Nome
 Instituição

Examinador(a) Assinatura
 Nome
 Instituição

Examinador(a) Assinatura
 Nome
 Instituição

Examinador(a) Assinatura
 Nome
 Instituição

Presidente Assinatura
 Nome
 Instituição.....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091-7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº **049/03**, sobre o projeto intitulado **“Imunolocalização e secreção da gomesina, peptídeo antimicrobiano dos hemócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana*”**, sob a responsabilidade de **Sirlei Daffre**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de **16/06/2003**.

(We certify that the protocol nº **049/03**, about **“Imunolocalization and secretion of gomesin, an antimicrobial peptide of the spider *Acanthoscurria gomesiana*”** agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in **16/06/2003** meeting.)

São Paulo, 17 de junho de 2003.

Prof. Dra. Sonia Malheiros L. Sanjoto
Coordenadora da CEEA

Prof. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender
Secretária da CEEA

Aos Meus Pais,
por toda compreensão, suporte e carinho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Sirlei pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho. Quero aproveitar para deixar o meu: “MUITO OBRIGADA!”, por ter me acolhido em seu laboratório e por participar do meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço por todo carinho e amizade ao longo destes quase sete anos de convivência!

Aos meus queridos colaboradores que sempre dedicaram um pouco do seu tempo para o meu trabalho:

À Dra. Rosa Maldonato pelo auxílio nos experimentos de Bio. Mol.

Ao Dr. Renato Mortara pela ajuda nas análises em Microscopia Confocal.

Ao Dr. José Roberto e a todos em seu laboratório (Bruno, Emília e Leandro) por toda ajuda com as análises morfológicas dos hemócitos.

À Dra. Elaine Rodrigues e à sua aluna Thaísa pela ajuda com os ensaios de migração celular.

Aos técnicos que me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho: Edson (laboratório de fotografia), Emília (como já citei), Gaspar (preparação dos cortes para MET), Gerson (*in memorian*), Manoel (produção dos anticorpos em camundongos) e Susana (todos os dias em que estive no laboratório!). Foi tanta amolação da minha parte que acabamos nos tornando bons amigos!

Aos amigos do laboratório que carrego em meu coração para sempre! Ao Pedro pelo início dos trabalhos com a aranha, pela sua

amizade e alegria; ao Dani, que através de discussões mirabolantes conseguimos ter boas idéias; ao Ernesto, que sempre esteve do meu lado, principalmente nas análises em ESI-MS; à Susana, que apesar de todas as dificuldades sempre conseguiu encarar a vida com bom humor! Ao Lourival, meu amigo iluminado! Sempre conseguiu nos mostrar o lado bom das coisas e das pessoas; às minhas amigas “gordinhas”: Déa, Eli e Fê, que através de conselhos e palavras amigas me ensinaram a ser uma pessoa melhor (ou pelo menos tentaram)!

Aos colegas do departamento que mesmo em conversas rápidas de corredor pudemos trocar muitas experiências e palavras amigas!

Aos meus amigos de fora, Bana, Déa, Mari e colégas da Bio, que sempre entenderam minhas ausências mesmo não entendendo nada de aranha, hemolinfa e etc...

À minha família que sempre esteve do meu lado, apoiando minhas decisões, mesmo quando eu mesma não sabia qual decisão tomar! Ao seu apoio incondicional... Muito obrigada!

Ao Kenji, que durante toda esta minha jornada foi meu companheiro, riu com as minhas alegrias, chorou com meu sofrimento e me deu forças quando precisei...Te amo!

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

FUKUZAWA, A. H. **Envolvimento dos hemócitos na resposta imune da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana***. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Os invertebrados previnem o estabelecimento de uma infecção através de uma resposta imune eficiente. Esta resposta é composta por reações celulares como a fagocitose e a formação de cápsulas e nódulos, e por reações humorais, através das cascatas de serina proteinases que participam da coagulação e da melanização, além da produção de peptídeos antimicrobianos (PAMs) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Existem ainda poucas informações na literatura sobre a resposta imune das aranhas. O presente trabalho teve como objetivo, estabelecer o papel dos hemócitos e dos PAMs na resposta imune da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, após uma infecção. Inicialmente foi mostrado que a gomesina é direcionada aos grânulos dos hemócitos na forma de um pró-peptídeo, sendo que seu processamento deve ocorrer no interior dos hemócitos ou no plasma, após sua secreção. Além disso, foi visto que a maioria dos hemócitos (58%) armazena os dois PAMs, gomesina e acanthoscurrina. Foi verificado ainda que a inoculação de partículas de látex na perna da aranha ativou a cascata de coagulação. Observou-se também uma alteração na população dos hemócitos no coração da aranha que havia sido desafiada com leveduras, sugerindo a ocorrência da migração dos granulócitos (hemócitos com grânulos) para o local da inoculação. Este resultado foi confirmado em experimentos *in vitro*, onde as leveduras e o LPS foram capazes de atrair os hemócitos. Ainda que a fagocitose seja uma resposta celular bastante conservada no reino animal, na aranha este mecanismo parece ter um papel secundário na infecção, uma vez que foram obtidos baixos índices fagocíticos (2%). A fagocitose deve ter um papel na eliminação de restos celulares e remodelagem dos tecidos danificados. Em contrapartida, foi verificado que a gomesina é secretada de forma dose-

dependente pelos hemócitos desafiados com LPS. Assim sendo, nossos resultados sugerem que durante uma infecção, os hemócitos migram para o local da injúria e secretam peptídeos antimicrobianos e componentes da cascata de coagulação para o aprisionamento e eliminação dos microorganismos.

Palavras-chave: imunidade inata; aranha; hemócitos; coagulação; peptídeos antimicrobianos.

ABSTRACT

FUKUZAWA, A. H. **The role of hemocytes on the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana***. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Invertebrates avoid the infection establishment through an efficient immune response. This response consists in cellular reactions such as phagocytosis, encapsulation and nodule formation and, humoral reactions including serine protease cascades participating in melanization and coagulation, and production of killing factors such as antimicrobial peptides (AMPs) and reactive oxygen and nitrogen species. Few data are available concerning the immune response in spiders. The main aim of this study was to determine the role of hemocytes and AMPs on the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. Firstly, we have shown that gomesin is addressed to the hemocyte granules as a propeptide. The processing of progomesin might be within the cell or in the plasma, after propeptide release. We also have showed that mostly hemocytes (58%) store both AMPs gomesin and acanthoscurrin. In addition, the injection of beads into the spider leg activated the coagulation cascade. Interestingly, we have observed an alteration in the hemocyte population in the yeast-challenged spider heart suggesting the migration response of granulocytes (hemocytes with granules) to the site of injection. This hypothesis was confirmed by *in vitro* assay, where yeast and LPS have attracted hemocytes. Even though phagocytosis is a well-conserved cellular immune response, this mechanism might have a secondary role in spiders because of the low phagocytic index observed (2%). Phagocytosis is probably responsible for clearance of cellular debris and remodeling of damaged tissues. On the other hand, the presence of LPS stimulated hemocytes to secrete gomesin in a dose-dependent manner. In conclusion, our results showed that after microbial infection, hemocytes possibly migrate to the infection site and release not only

components of the coagulation cascade but also antimicrobial peptides to trap and killing the invading microorganisms.

Key-words: innate immunity; spider; hemocytes; coagulation; antimicrobial peptides.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs: absorbância
ACN: acetonitrila
AF: ácido fórmico
ASB: Albumina de soro bovino
DNA: ácido desoxi-ribonucléico
EDC: 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreto
EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético
ERN: Espécies reativas de nitrogênio
ERO: Espécies reativas de oxigênio
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
ESI: ionização por "spray" de elétrons
GST: Glutathione S-transferase
Imd: "Immune deficiency"
IPTG: isopropil β -D-galactopiranosídeo
LB: Luria-Bertani
LPS: lipopolissacarídeo
MES: 2-[N-morfolino]etano ácido sulfônico
MRFA: metilarginilfenilalanina
MS: espectrometria de massas
PAM(s): Peptídeo(s) antimicrobiano(s)
PBS: tampão fosfato salino
PCR: reação em cadeia de polimerase
PMAP: padrão molecular associado a patógenos
RP-HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
RPR: receptor de padrão de reconhecimento
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) contendo dodecilssulfato de sódio (SDS)
SIM: "single ion monitoring"
TFA: ácido trifluoroacético
Xgal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ilustração de um corte longitudinal da aranha	42
FIGURA 2. Ilustração da perna da aranha mostrando seus artículos	42
FIGURA 3. Seqüência do cDNA da gomesina.....	50
FIGURA 4. Avaliação da expressão de proteínas das bactérias induzidas por IPTG.....	51
FIGURA 5. Purificação do peptídeo pró-domínio C-terminal	52
FIGURA 6. Imunolocalização da gomesina e do pró-domínio C-terminal nos hemócitos.....	53
FIGURA 7. Imunolocalização da gomesina e da acanthoscurrina	54
FIGURA 8. Hemócitos da aranha <i>A. gomesiana</i>	56
FIGURA 9. Avaliação da presença de partículas de látex na perna da aranha	57
FIGURA 10. Comparação dos cortes do coração de aranhas desafiadas e não desafiadas.....	59
FIGURA 11. Respostas celulares ativadas após desafio com leveduras.....	60
FIGURA 12. Viabilidade dos hemócitos mantidos <i>in vitro</i>	61
FIGURA 13. Migração dos hemócitos <i>in vitro</i>	62
FIGURA 14. Exocitose após desafio <i>in vitro</i>	63
FIGURA 15. Quantificação relativa de gomesina secretada após desafio <i>in vivo</i>	64
FIGURA 16. Quantificação da gomesina secretada pelos hemócitos mantidos <i>in vitro</i>	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Coeficientes e variação das amostras de plasma das aranhas antes e após inoculação com leveduras	65
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Moléculas de reconhecimento	19
1.2 Fagocitose e exocitose	20
1.3 Encapsulação/nodulação e melanização	21
1.4 Coagulação	21
1.5 Peptídeos antimicrobianos	22
1.6 As aranhas	25
1.7 Peptídeos antimicrobianos da aranha <i>Acanthoscurria gomesiana</i>	26
2 OBJETIVOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais	30
3.2 Obtenção dos hemócitos	30
3.3 Observação dos hemócitos da aranha	30
3.3.1 Microscopia óptica	30
3.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão	30
3.4 Obtenção do peptídeo recombinante correspondente ao pró-domínio C-terminal do precursor da gomesina	31
3.4.1 Clonagem do cDNA que codifica o pró-domínio C-terminal	31
3.4.1.1 Oligonucleotídeos	31
3.4.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	32
3.4.1.3 Purificação do DNA	33
3.4.1.4 Reação de ligação do DNA aos plasmídeos e transformação de bactérias competentes	33
3.4.1.5 Sequenciamento do DNA	34
3.4.1.6 Purificação dos plasmídeos	35
3.4.2 Expressão do pró-domínio C-terminal	36
3.4.2.1 Indução da expressão do pró-domínio C-terminal	36
3.4.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	36
3.4.2.3 Purificação do pró-domínio C-terminal	37

3.5 Produção de anticorpos policlonais	38
3.5.1 Anti-pró-domínio C-terminal	38
3.5.2 Anti-acanthoscurrina	39
3.5.3 Anti-gomesina	39
3.6 Imunofluorescência	39
3.7 Desafio da resposta imune da aranha.....	41
3.7.1 Ensaios de desafio <i>in vivo</i>	41
3.7.1.1 Experimento 1	41
3.7.1.2 Experimento 2	42
3.7.1.3 Experimento 3	43
3.7.1.3.1 NanoHPLC-ESI/MS	43
3.7.1.4 Experimento 4	44
3.7.2 Ensaios de desafio <i>in vitro</i>.....	45
3.7.2.1 Viabilidade dos hemócitos	45
3.7.2.2 Atividade migratória dos hemócitos	46
3.7.2.3 Atividade fagocítica dos hemócitos	47
3.7.2.4 Atividade secretória dos hemócitos.....	47
4 RESULTADOS	49
4.1 Localização da molécula precursora da gomesina.....	49
4.1.1 Expressão recombinante do pró-domínio C-terminal.....	49
4.1.2 Imunolocalização do pró-domínio C-terminal	53
4.2 Comparação da localização da gomesina e acanthoscurrina.....	53
4.3 Envolvimento dos hemócitos na resposta imune.....	55
4.3.1 Observação dos hemócitos	55
4.3.2 Respostas celulares após desafio <i>in vivo</i>	56
4.3.3 Respostas celulares após desafio <i>in vitro</i>.....	60
4.3.4 Secreção de gomesina após um desafio	63
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXO - Publicações	84

1 INTRODUÇÃO

Os seres vivos estão constantemente em contato com microorganismos potencialmente patogênicos e para conter o estabelecimento de uma infecção contam com uma resposta imune eficiente. Os vertebrados apresentam dois sistemas de defesa que são utilizados para combater e eliminar os organismos invasores: a imunidade adaptativa e a inata. A imunidade adaptativa apresenta receptores que interagem com os antígenos, resultando na produção de imunoglobulinas (anticorpos) específicas. Uma característica importante da resposta imune adaptativa é a memória imunológica, ou seja, a capacidade que o organismo possui de reconhecer determinado antígeno, algumas semanas ou mesmo anos, após a primeira infecção. Desta forma, o sistema de defesa é capaz de responder mais rapidamente caso ocorra uma nova infecção. Ao contrário do sistema imune adaptativo, na imunidade inata não há dependência da ativação antígeno-receptor específica, não havendo, portanto, a produção de anticorpos nem memória imunológica (DU PASQUIER, 2001).

Nos invertebrados, o sistema de defesa é muito semelhante à imunidade inata dos vertebrados, sendo os insetos, o grupo mais bem estudado. Após o rompimento da barreira físico-química constituída pela cutícula e invasão de microorganismos, o sistema de defesa é ativado. A ativação deste sistema é mediada por fatores presentes na hemolinfa, que é composta por células (os hemócitos) e pelo plasma (fluido rico em proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, hormônios e íons). Desta forma, a resposta imune dos invertebrados consiste em reações celulares como a fagocitose, encapsulação e/ ou formação de nódulos, e de reações humorais incluindo as cascatas de serina proteinases que participam da coagulação e da melanização, além da produção de intermediários reativos de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e peptídeos antimicrobianos (PAMs) (RATCLIFFE e WHITTEN, 2004).

A classificação dos hemócitos é bastante complexa, uma vez que a maioria dos autores baseou-se em observações morfológicas para sua classificação. No entanto, a maioria dos invertebrados possui pelo menos

três tipos de hemócitos: (i) os pró-hemócitos, que constituem os hemócitos imaturos; (ii) os plasmatócitos que apresentam citoplasma homogêneo, sem grânulos e (iii) os granulócitos que apresentam numerosos grânulos no citoplasma.

Em limúlideos foram observados dois tipos de hemócitos, os granulócitos e outro tipo celular que não apresenta grânulos. Segundo Coursey e colaboradores (COURSEY *et al.*, 2003), os hemócitos que não apresentam grânulos no citoplasma seriam os pró-hemócitos. Porém, Toh e colaboradores (TOH *et al.*, 1991) denominaram estas células de plasmatócitos. Nestes animais, também foram descritos os cianócitos, que são responsáveis pela produção e armazenamento de hemocianina. Estas células correspondem a menos de 1% da população de hemócitos sendo raramente observadas (FAHRENBACH, 1970).

Em seu trabalho, Sherman caracterizou três tipos celulares na aranha caranguejeira *Eurypelma marxi*: os granulócitos, que correspondem ao tipo celular mais abundante, os cianócitos e os plasmatoцитóides, que são semelhantes aos plasmatócitos descritos em insetos. Foram observadas ainda, formas intermediárias entre os plasmatoцитóides e os granulócitos e, entre plasmatoцитóides e cianócitos. Neste trabalho, o autor afirma que não foi possível separar os plasmatoцитóides dos pró-hemócitos, mas que devido à presença das formas intermediárias é possível que dentro da população descrita como plasmatoцитóides deva haver células indiferenciadas que darão origem aos demais tipos celulares (SHERMAN, 1973; SHERMAN, 1981).

Foi verificado que durante a muda a população de hemócitos nas aranhas muda drasticamente. Nesta fase, é observado o aumento dos leberidiócitos. Estas células apresentam numerosas inclusões de glicogênio e devem ser responsáveis pelo fornecimento de energia para este processo (DEEVEY, 1941).

Em um trabalho mais recente, Sherman faz uma revisão dos tipos de hemócitos descritos para as aranhas: os pró-hemócitos, os plasmatócitos, os

granulócitos, os cianócitos, os oenocitóides e os leberidiócitos (SHERMAN, 1981).

Em outros aracnídeos, tais como nos opiliões *Leiobunum limbatum*, *Mitopus morio* e *Opilio ravennae* além dos três tipos principais (pró-hemócitos, plasmatócitos e granulócitos), também foram caracterizados os esferulócitos e os coagulócitos, sendo que estes últimos devem ser derivados dos granulócitos (DANNHORN e SEITZ, 1987). Já no escorpião *Palamnaeus swammerdami*, também foram descritos os esferulócitos, os adipohemócitos e os cistócitos, além dos pró-hemócitos, plasmatócitos e granulócitos (RAVINDRANATH, 1974). No mosquito *Culex quinquefasciatus*, além dos pró-hemócitos, plasmatócitos e granulócitos, também foram descritos os esferulócitos, os adipohemócitos e os oenocitóides que quando somados, correspondem a apenas 7% da população de hemócitos (BRAYNER *et al.*, 2005).

Os hemócitos podem apresentar diferentes origens. Em *Limulus polyphemus* a origem destas células ainda não está clara, porém foram encontrados pró-hemócitos na hemocela, associados ao tecido conectivo, e no coração. Também foram observados alguns pró-hemócitos associados a um aglomerado de células indiferenciadas livres na hemocela (COURSEY *et al.*, 2003). Nas aranhas, *Tegenaria derhami*, *Epeira quadrata*, *Attus rupicola* e *Cupennius salei*, foi verificado que os hemócitos são formados no coração. Os pró-hemócitos se desprendem da parede do mesmo, sofrem divisões mitóticas até alcançarem a maturação (SHERMAN, 1981). Já no escorpião *Paruroctonus mesaensis*, os hemócitos são originados a partir dos órgãos linfóides e da glândula neural (FARLEY, 1984). Nos embriões de *Drosophila melanogaster*, os hemócitos são formados na porção anterior da mesoderme. No entanto, nos insetos adultos, estas células são formadas nas glândulas linfáticas (EVANS *et al.*, 2003).

1.1 Moléculas de reconhecimento

A ausência do sistema imune adaptativo em invertebrados faz com que um dos maiores desafios desses animais seja a diferenciação do que é próprio e não-próprio. Foram descritos vários receptores de padrões de reconhecimento (RPRs) que se ligam a padrões de moléculas associadas aos patógenos (PMAPs). Dentre os PMAPs estão os lipopolissacarídeos (LPS), as peptidoglicanas e as β 1,3-glicanas que são reconhecidos pelos RPRs nos hemócitos, nos corpos gordurosos ou no plasma dos insetos (LAVINE e STRAND, 2002).

Em limúlídeos foram identificados 19 tipos de lectinas que atuam em sinergismo no reconhecimento e combate aos patógenos. O fator C, dos hemócitos de limúlídeos pode ser considerado um RPR, uma vez que ele se liga ao LPS de bactérias Gram-negativas. Na presença do LPS, este fator sofre uma auto-ativação e inicia a cascata da coagulação (IWANAGA e LEE, 2005). O fator C também é importante para o mecanismo de exocitose, pois a alquilação de um resíduo de histidina de seu sítio catalítico inibiu completamente a secreção do conteúdo granular dos hemócitos (ARIKI *et al.*, 2004).

Foi mostrado ainda, que a TEP1, um RPR presente no plasma de mosquitos, se liga às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e apresenta similaridade com o fator C3 do sistema complemento dos vertebrados e à α -2-macroglobulina. Quando ocorre a depleção da TEP1, via silenciamento do gene, há uma redução na atividade fagocítica dos hemócitos (LEVASHINA *et al.*, 2001).

Embora os receptores do tipo Toll em *Drosophila melanogaster* estejam envolvidos com o reconhecimento dos patógenos, eles não podem ser considerados um RPR, uma vez que foi identificado apenas um ligante deste receptor, a forma clivada da proteína “Spatzler”. Diferentemente de drosófilas, em vertebrados, os receptores do tipo Toll são considerados RPRs, pois eles se ligam diretamente aos PMAPs (LAVINE e STRAND, 2002).

1.2 Fagocitose e Exocitose

A identificação dos microorganismos invasores pelas moléculas de reconhecimento resulta na ativação de diferentes reações intracelulares que levam à eliminação dos invasores. O mecanismo molecular da fagocitose tem sido bastante estudado em vertebrados (UNDERHILL e OZINSKY, 2002). Nos invertebrados, este processo é iniciado quando um PAMP se liga a um receptor da célula fagocítica, levando à formação do fagossomo e na ingestão do microorganismo invasor, através de uma via dependente da polimerização de actina (LAVINE e STRAND, 2002).

Nos opiliões, *Leiobunum limbatum*, *Mitopus morio* e *Opilio ravennae* (DANNHORN e SEITZ, 1987), no carrapato *Boophilus microplus* (PEREIRA *et al.*, 2001), no camarão *Penaeus vannamei* (MUNOZ *et al.*, 2002) e no mosquito *Anopheles albimanus*, (HERNANDEZ *et al.*, 1999) a fagocitose é atribuída aos plasmatócitos. No entanto, no molusco *Mytilus galloprovincialis*, os granulócitos apresentam atividade fagocítica (MITTA *et al.*, 2000b). Uma vez nos fagossomos, os microorganismos são eliminados através de moléculas efetoras tais como os PAMPs e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (LAVINE e STRAND, 2002).

Além da fagocitose, os hemócitos também podem combater os microorganismos através da secreção dos PAMPs, como descrito para os limulídeos (SOLON *et al.*, 1996). A presença de LPS vai ativar o receptor ligado à proteína G. Quando este é ativado, faz com que a fosfolipase C produza 1,4,5 -Inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol. O IP₃ causa aumento do cálcio intracelular levando a exocitose do conteúdo dos grânulos (SOLON *et al.*, 1996). Nestes animais, foi verificado que tanto os PAMPs como os componentes da cascata de coagulação são secretados via exocitose (IWANAGA e LEE, 2005). A secreção de PAMPs também é observada nos leucócitos polimorfonucleares humanos e de suínos e nas células de Paneth, do intestino humano (GANZ, 1987; PANYUTICH *et al.*, 1997; GHOSH *et al.*, 2002).

1.3 Encapsulação/nodulação e melanização

Quando a quantidade de bactérias e fungos é muito grande ou, no caso de protozoários ou de pequenos vermes invadirem a hemocèle, os hemócitos circulantes são induzidos a se organizarem em camadas ao redor do (s) invasor (es) formando cápsulas ou nódulos. O organismo encapsulado é morto devido à asfixia e/ou à ação de fatores tóxicos como ROI, RNI e PAMs (GILLESPIE *et al.*, 1997; NAPPI e OTTAVIANI, 2000).

O processo de encapsulação/nodulação de microorganismos é normalmente acompanhado pela produção de um pigmento de coloração escura resultante da ativação da pró-fenoloxidase, que converte compostos fenólicos em melanina (ASHIDA e BREY, 1998; CERENIUS e SODERHALL, 2004). O processo de melanização é iniciado após o reconhecimento das PMAPs, sendo controlado por uma cascata de serina proteinases, que resulta na clivagem da pró-fenoloxidase para gerar a sua forma ativa. A enzima fenoloxidase catalisa a oxidação de fenóis a quinonas, constituindo o primeiro passo para a produção da melanina. A ativação desta via, também leva à produção de ERN e ERO que auxiliam no combate à infecção (ASHIDA e BREY, 1998; CERENIUS e SODERHALL, 2004).

Trabalhos realizados com limúlídeos mostraram que além da função no transporte de oxigênio, a hemocianina também pode apresentar uma atividade de fenoloxidase. Esta atividade é induzida pela presença do PAM taquiplesina, sendo esta indução dependente da concentração deste peptídeo no meio. A ligação da taquiplesina com a hemocianina deve causar uma mudança conformacional fazendo com que o sítio catalítico seja exposto (NAGAI *et al.*, 2001). Na aranha *Eurypelma californicum*, a atividade de fenoloxidase da hemocianina é observada somente após clivagem com quimiotripsina ou tripsina (DECKER e RIMKE, 1998).

1.4 Coagulação

A coagulação em artrópodes foi bem caracterizada em limúlídeos e crustáceos (THEOPOLD *et al.*, 2004). Em limúlídeos, a ativação da cascata

de coagulação, constituída por várias serina proteinases, é iniciada pelo reconhecimento das PMAPs. Quando o fator C se liga ao LPS, sofre uma modificação em sua estrutura levando a uma auto-ativação (IWANAGA e LEE, 2005). Uma vez ativado, o fator C cliva o fator B, uma outra serina proteinase que, por sua vez, ativará a enzima da pró-coagulação. Finalmente, esta enzima catalisa o último passo proteolítico da via, a clivagem do coagulogênio, resultando na formação da coagulina, que polimeriza formando um gel insolúvel onde o patógeno é aprisionado. A cascata iniciada por β -1,3-glicana ocorre de modo similar, com a diferença de que o fator inicialmente ativado é o fator G, em vez do fator C (IWANAGA e LEE, 2005). Na aranha *Acanthoscurria gomesiana*, a reação da coagulação deve ser bastante parecida com o de limulídeos, uma vez que, com exceção do coagulogênio, todos os componentes da cascata de coagulação foram encontrados na biblioteca de cDNA de seus hemócitos (LORENZINI *et al.*, 2006).

No crustáceo *Pacifastacus leniusculus*, a proteína de coagulação se apresenta na forma de dois monômeros idênticos ligados por uma ponte dissulfeto. A formação da rede insolúvel se dá pela ação da transglutaminase sobre esta proteína (WANG *et al.*, 2001). Diferentemente dos crustáceos, em limulídeos as transglutaminases não participam diretamente da formação do coágulo. Elas atuam na ligação das proteínas de superfície dos hemócitos (proxinas) com a coagulina, dando maior estabilidade ao coágulo (OSAKI *et al.*, 2002).

1.5 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas que fazem parte da imunidade inata e possuem um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. Apresentam pequena massa molecular, em geral, até 10 kDa. Exibem um alto teor de aminoácidos básicos e, pelo menos, 50% de aminoácidos hidrofóbicos. As cargas positivas dos peptídeos facilitam sua interação com as cargas negativas dos fosfolipídeos da membrana dos microorganismos invasores e, o caráter hidrofóbico, facilita

sua inserção na membrana, promovendo a lise dos mesmos (BULET *et al.*, 2004).

Em insetos, a transcrição dos genes dos PAMs nos corpos gordurosos é ativada algumas horas após a infecção. Em *Drosophila melanogaster*, foram descritas duas vias de ativação da transcrição dos PAMs: a via do Toll e a via do Imd (“Immune deficiency”). A presença de bactérias Gram-positivas e fungos ativam a via do receptor Toll que inicia uma cascata de sinalização intracelular que vai culminar na translocação dos fatores de transcrição “Dorsal” e “Dif” para o núcleo dos hemócitos. Uma vez no núcleo, estes fatores irão ativar a transcrição da drosomicina e de outros PAMs que possuem atividade principalmente contra fungos e bactérias Gram-positivas. Já a via do Imd é ativada pela presença de bactérias Gram-negativas e não apresenta fatores comuns aos da via do Toll. A ativação desta via de sinalização intracelular resulta na translocação do fator de transcrição “Relish” para o núcleo, ativando a transcrição da diptericina, além de outros PAMs, que apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas, principalmente (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007).

Diferentemente da maioria dos insetos, em limulídeos (IWANAGA e LEE, 2005), crustáceos (MUNOZ *et al.*, 2002) e moluscos (MITTA *et al.*, 1999; MITTA *et al.*, 2000b), a produção dos PAMs é constitutiva, sendo que estes peptídeos ficam armazenados nos grânulos dos hemócitos. Quando a presença dos PAMs é detectada por estas células, ocorre a secreção dos PAMs para o plasma ou a fusão dos grânulos ao fagossomo.

Em vertebrados, muitos dos PAMs descritos até o momento são sintetizados como precursores. O processamento mais simples consiste na remoção da região amino-terminal, correspondente ao peptídeo sinal, porém é muito freqüente haver a remoção de um ou mais segmentos aniônicos (GANZ e LEHRER, 2001). Da mesma forma, as defensinas de moluscos e as taquipesinas de limulídeos também são traduzidas na forma de moléculas precursoras, que quando proteolisadas liberam o PAM ativo (SHIGENAGA *et al.*, 1990; MITTA *et al.*, 1999).

Nos hemócitos de limúlídeos foram encontrados dois tipos de grânulos, os pequenos e os grandes. Nos grânulos pequenos foram identificadas pelo menos seis moléculas antimicrobianas, sendo quatro peptídeos catiônicos ricos em cisteína: a taquiplesina, a polifemusina, a taquicitina e grande defensina, que apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Nos grânulos grandes são armazenadas mais de 25 proteínas ligadas à defesa, dentre elas os componentes da cascata de coagulação, lectinas e inibidores de proteinases. Na presença dos PMAPs, o mecanismo de exocitose dos grânulos é ativado (IWANAGA e LEE, 2005).

Nos grânulos dos hemócitos do molusco *Mytilus galloprovincialis* foram caracterizados três tipos de peptídeos antimicrobianos catiônicos e ricos em cisteína: as defensinas (MGD, MGD2 e MGD3), as mitilinas e as miticinas. Durante uma infecção, a fagocitose deve ser o primeiro mecanismo a ser ativado, sendo que os hemócitos envolvidos armazenam somente as mitilinas. Neste caso, os grânulos que contêm o peptídeo fundem-se ao fagossomo provocando a morte dos microorganismos. As células que contêm tanto as defensinas quanto as mitilinas devem ser responsáveis pela secreção dos peptídeos para o plasma. No entanto sua ativação deve ocorrer mais tardiamente, uma vez que foi observado um aumento da defensina no plasma, somente 24 horas após a infecção (MITTA *et al.*, 1999; MITTA *et al.*, 2000b).

No camarão *Penaeus vannamei* foram isolados três peptídeos da família das penaedinas (penaedina 1, 2 e 3) que são armazenados nos grânulos dos hemócitos granulares e semigranulares. Numa infecção, estas células migram para o local da injúria e liberam os peptídeos para o plasma. Ao contrário dos limúlídeos, não há evidências da ocorrência de exocitose, no entanto, a morfologia dos grânulos sofre modificações, sugerindo a liberação do conteúdo dos grânulos no citoplasma, seguido da lise dessas células e, conseqüentemente, a liberação de todo conteúdo citoplasmático (BACHERE *et al.*, 2004).

Além dos PAMs encontrados nos hemócitos, alguns artrópodes também apresentam PAMs no veneno. A partir da glândula de veneno do escorpião chinês *Buthus martensii* foi isolado um peptídeo (BmTXKS2) que apresenta similaridade com as defensinas isoladas da hemolinfa dos escorpiões *Leirus* e *Androctonus* (ZHU *et al.*, 2000). No veneno das aranhas do gênero *Lycosa*, foram isoladas as licotoxinas I e II que apresentam atividade de inibição de crescimento de bactérias Gram-negativas e leveduras. Estes peptídeos também foram capazes de dissipar gradientes de voltagem nas membranas musculares dos insetos (YAN e ADAMS, 1998). Além das licotoxinas, as cupienninas e as oxyopininas, isoladas de *Cupennius salei* e *Oxyopes takobius*, respectivamente, também apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas, além da atividade paralisante nos insetos (CORZO *et al.*, 2002; KUHN-NENTWIG *et al.*, 2002).

1.6 As aranhas

As aranhas estão distribuídas por todo o planeta e conquistaram praticamente todos os ecossistemas, exceto o ar e o oceano. Todas as aranhas são carnívoras, sendo o grupo dos insetos a maior fonte de presas, embora outros artrópodes também possam ser consumidos. A maioria das aranhas mede de 0,2 a 1 cm de comprimento, mas as aranhas pertencentes ao grupo das caranguejeiras podem medir até 9 cm. Em geral os machos são menores que as fêmeas (FOELIX, 1996a).

O corpo das aranhas é dividido em duas partes: o cefalotórax e o abdome, que são unidos pelo pedicelo. Na região do cefalotórax está localizado o sistema nervoso central. Nesta região estão concentradas as principais atividades motoras de locomoção e captura de presas. Na região abdominal concentram-se as atividades vegetativas de digestão, respiração, excreção, reprodução, circulação e produção de teias (FOELIX, 1996a).

As aranhas pertencem à Ordem Araneae que é subdividida em três subordens: Mesothelae, que são consideradas as mais primitivas; Mygalomorphae, que abrange todo o grupo das caranguejeiras e Araneomorphae, que inclui cerca de 90% das espécies (FOELIX, 1996a).

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

1.7 Peptídeos antimicrobianos da aranha *Acanthoscurria gomesiana*

Estudos realizados em nosso laboratório com a hemolinfa da aranha caranguejeira *A. gomesiana* não desafiada, resultaram na identificação de três peptídeos com atividade antimicrobiana: a theraphosinina (4.052Da) que foi purificada do plasma (SILVA JR, 2000), a gomesina (2.270Da) e a acanthoscurrina, com duas isoformas (10.111 e 10.225 Da), purificadas dos hemócitos (SILVA JR *et al.*, 2000; LORENZINI *et al.*, 2003a). Embora diferentes tecidos tenham sido analisados (gânglio nervoso, coração, hepatopâncreas, ovários, intestino, músculo e glândulas de veneno), a presença do RNA mensageiro da gomesina e acanthoscurrina só foi detectada nos hemócitos, indicando que a expressão destes PAMs é específica destas células (LORENZINI *et al.*, 2003a; LORENZINI *et al.*, 2003b).

A partir dos hemócitos foi também purificado outro fator antimicrobiano: a mygalina, uma acilpoliamina na qual duas moléculas de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHBA) estão conjugadas, através de seus grupos carboxilas, com as aminas terminais da poliamina formando o composto N1,N8-bis(2,5-dihidroxibenzoil) espermidina. Este fator apresentou atividade contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*, sendo sua atividade completamente inibida na presença de catalase (PEREIRA *et al.*, 2007).

A gomesina é traduzida na forma de um pré-pró-peptídeo de 84 resíduos de aminoácidos, composto por um peptídeo sinal com 23 aminoácidos, a molécula madura contendo 18 aminoácidos e ainda, uma região C-terminal com 43 resíduos de aminoácidos. A região carboxi-

terminal da proteína precursora é composta majoritariamente por aminoácidos de carga negativa, enquanto que a região que corresponde ao peptídeo maduro é composta, principalmente, por aminoácidos de carga positiva.

Uma distribuição semelhante de regiões carregadas diferencialmente foi observada nos precursores da taquiplesina (SHIGENAGA *et al.*, 1990) e das mytilinas (MITTA *et al.*, 2000a). Segundo Mitta *et al.* (MITTA *et al.*, 2000a), esta porção carboxi carregada negativamente pode interagir com a parte catiônica do peptídeo para permitir o processamento proteolítico ou ainda proteger a célula produtora de interações de suas membranas com o peptídeo ativo, evitando assim a atividade tóxica contra a mesma.

Através de reações de imunofluorescência, utilizando o anticorpo contra a gomesina, verificou-se o armazenamento deste peptídeo nos grânulos dos hemócitos (LORENZINI *et al.*, 2003b). A gomesina apresenta uma estrutura em forma de grampo (β -hairpin) constituída por duas folhas β anti-paralelas unidas por duas pontes de dissulfeto nas posições Cis²⁻¹⁵ e Cis⁶⁻¹¹ (MANDARD *et al.*, 2002). Sua seqüência apresentou similaridade com peptídeos da família das taquiplesinas e polifemusinas de limúldeos, com a androctonina do escorpião *A. australis* e com a protegrina PG-1 de suínos (SILVA JR *et al.*, 2000).

A gomesina mostrou-se ativa contra várias cepas de bactérias (SILVA JR *et al.*, 2000), inclusive algumas cepas de bactérias resistentes a antibióticos, isoladas de pacientes: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Enterococcus faecalis* (SOUZA *et al.*, 2004). Além da ação antibacteriana, a gomesina apresentou atividade contra diversas cepas de fungos, sendo observada uma atividade direta contra *Cryptococcus neoformans* e em doses sub-letais, uma atividade sinérgica com o anti-fúngico convencional, fluconazol (BARBOSA *et al.*, 2007). A gomesina apresentou ainda, atividade contra os parasitas *Plasmodium falciparum* (MOREIRA *et al.*, 2007), *Leishmania spp* (SILVA JR *et al.*, 2000; BURGIERMAN *et al.*, 2002) e *Trypanossoma cruzi* (BURGIERMAN *et al.*,

2002). Foi verificado ainda, que a gomesina é capaz de causar de 3 a 40% de hemólise nos eritrócitos humanos, em concentração que variam de 0,19 a 100 μ M (FAZIO *et al.*, 2006).

Através do estudo relacionando a estrutura e atividade da gomesina, foi mostrado que a presença das pontes de dissulfeto é essencial para a manutenção da atividade do peptídeo. A ausência de uma ou das duas pontes provocaram a redução da atividade microbica e hemolítica deste peptídeo, além de reduzir sua estabilidade em soro humano (FAZIO *et al.*, 2006).

O outro peptídeo purificado dos hemócitos da aranha, a acanthoscurrina, apresentou atividade contra a levedura *Candida albicans* e a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (LORENZINI *et al.*, 2003a). Ao contrário da gomesina, a acanthoscurrina é traduzida na forma de um pré-peptídeo, onde a clivagem do peptídeo sinal com 23 resíduos de aminoácidos, já resulta em sua forma ativa. Foram isoladas duas isoformas deste peptídeo, contendo 156 ou 158 resíduos de aminoácidos, sendo a diferença entre elas de dois resíduos de glicina. As duas isoformas possuem caráter catiônico, são ricas em glicina e apresentam similaridade com peptídeos antimicrobianos isolados de plantas e insetos (LORENZINI *et al.*, 2003a). Foi verificado ainda que, três horas após a injeção de bactérias na aranha, a acanthoscurrina foi detectada no plasma, mostrando que este peptídeo é secretado após um desafio. O outro peptídeo, gomesina, não foi detectado no mesmo experimento (LORENZINI *et al.*, 2003a).

2 OBJETIVOS

Embora existam muitos trabalhos sobre a imunidade inata de insetos, crustáceos, limulídeos e moluscos, a resposta imune de outros grupos de invertebrados, como os aracnídeos, ainda é muito pouco conhecida. O entendimento desta resposta é muito importante para a compreensão da evolução dos mecanismos celulares e humorais dos diferentes grupos, bem como as origens dos mesmos.

Até o presente momento, poucos trabalhos sobre a defesa imunológica das aranhas foram realizados. A maioria dos trabalhos é baseada na descrição morfológica dos hemócitos e apenas alguma inferência sobre o papel destas células numa resposta à infecção (SHERMAN, 1981).

Em nosso laboratório foram caracterizados os PAMs da aranha *Acanthoscurria gomesiana* (SILVA JR *et al.*, 2000; LORENZINI *et al.*, 2003a; LORENZINI *et al.*, 2003b) e mais recentemente, foi realizado um levantamento dos genes desta aranha envolvidos na imunidade, utilizando-se uma biblioteca de cDNAs dos hemócitos (LORENZINI *et al.*, 2006). No entanto, nenhum destes trabalhos investigou a resposta imune *in vivo* deste animal.

Assim sendo, o objetivo geral do presente trabalho foi verificar o papel dos hemócitos e dos PAMs na resposta imune da aranha. Os objetivos específicos foram:

- Determinar a distribuição relativa dos dois PAMs, gomesina e acanthoscurrina, nos hemócitos;
- Verificar as respostas nas quais os hemócitos estão envolvidos após um desafio *in vivo* e *in vitro*;
- Verificar a secreção da gomesina após desafio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados exemplares da aranha *Acanthoscurria gomesiana* de ambos os sexos e em estágios diferentes de desenvolvimento, mantidos pelo Instituto Butantã (São Paulo, Brasil).

3.2 Obtenção dos hemócitos

A hemolinfa foi coletada (500 μ L/animal) através da punção do vaso dorsal das aranhas mantidas a -20 °C durante 15 min, na proporção de 2:1 (v/v) com a solução anticoagulante: 30 mM de citrato de sódio, pH 4,6, 450 mM de NaCl, 10 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 10 mM de glicose (SODERHALL e SMITH, 1983). Os hemócitos foram separados do plasma por centrifugação a 800 x g por 10 min a 4 °C. Todos os materiais e soluções foram preparados em condições estéreis e apirogênicas.

3.3 Observação dos hemócitos da aranha

3.3.1 Microscopia óptica

A hemolinfa foi coletada como descrito no item 3.2 e imediatamente depositada em lâminas de vidro, previamente fornadas a 200 °C por 2h e, analisada a fresco em microscópio óptico de fluorescência Axiophot Zeiss com objetivas planacromáticas. Em algumas preparações foram utilizadas objetivas Nomarski para as observações.

3.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A hemolinfa foi coletada como descrito no item 3.2. Os hemócitos foram separados do plasma por centrifugação a 800 x g por 10 min a 4 °C. As células foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído em solução anticoagulante por 10 min no gelo.

Para inclusão em resina Spurr (Sigma-Aldrich), o material fixado foi lavado por quatro vezes de 15 min a 4 °C, em 100 mM de tampão

cacodilato, pH 7,4 e pós-fixado no mesmo tampão contendo 1% de tetróxido de ósmio, por 2 h (protocolo modificado de Toh e colaboradores (TOH *et al.*, 1991)). O material foi então, submetido à desidratação por imersão em etanol num gradiente variando de 70% a 100% (2x10 min em etanol a 70%; 2x10 min em etanol a 95% e 4x15 min em etanol a 100%). Posteriormente, o órgão foi incubado em óxido de polipropileno a 100% à temperatura ambiente por duas vezes de 15 min; seguido de uma mistura de 1:1 (v/v) de óxido de polipropileno e resina, à temperatura ambiente por 12 h. O material foi então, mantido em resina pura por 5 h, à temperatura ambiente e, finalmente colocado em uma nova solução de resina pura a 70 °C por, no mínimo, 72 h. Foram feitos cortes semifinos (300 nm) que foram corados com 0,25% de azul de toluidina para observação ao microscópio óptico (Axiophot Zeiss com objetivas planacromáticas). Em seguida, foram feitos cortes ultrafinos (70 nm) que foram contrastados com 0,5% de acetato de uranila e 0,5% de citrato de chumbo e observados no microscópio eletrônico JEOL 100 CX.

As observações dos hemócitos foram realizadas em colaboração com o Dr. José Roberto Machado da Cunha da Silva da Universidade de São Paulo – Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento.

3.4 Obtenção do peptídeo recombinante correspondente ao pró-domínio C-terminal do precursor da gomesina (pró-domínio C-terminal)

3.4.1 Clonagem do cDNA (*prodom*) que codifica o pró-domínio C-terminal

3.4.1.1 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar o *prodom* foram obtidos a partir da sequência do cDNA da gomesina (Fig. 3, Resultados) (LORENZINI *et al.*, 2003b):

OLIGO BamHI: 5' GGA TCC AGT TTA GAT GAG ACC 3'

OLIGO EcoRI: 5' GAA TTC AAA TAA AAG CTG 3'

Os dois oligonucleotídeos foram adquiridos pela empresa Invitrogen. O oligo BamHI é complementar à região 5' do *prodom* e apresenta sítio de clivagem para a enzima de restrição BamHI. O oligo EcoRI é complementar à região 3' do *prodom* e apresenta sítio de clivagem para a enzima de restrição EcoRI.

Os oligos M13-For e M13-Rev (Gibco/BRL) foram utilizados para verificar a presença do *prodom* no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega):

OLIGO M13-For: 5' CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG 3'

OLIGO M13-Rev: 5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC AC 3'

Os oligos pGEX-2T upper e pGEX-2T lower (Amersham Biosciences) foram utilizados para verificar a presença do *prodom* no plasmídeo pGEX-2T (Amersham Biosciences).

OLIGO pGEX-2T upper: 5' TGT ATG ACG CTC TTG ATG TTG TTT 3'

OLIGO pGEX-2T lower: 5' ACA CCC GCC AAC ACC CGC 3'

3.4.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A clonagem do *prodom* foi realizada através de PCR utilizando-se um termociclador (Applied Biosystems, modelo Gene Amp PCR System), contendo em cada reação: 5 µL de tampão concentrado 10X para Taq DNA polimerase (Gibco/BRL), 1 µL de cada oligonucleotídeo BamHI e EcoRI (concentração final de 2 µM), 1 µL de uma mistura de dNTP (concentração final de 10 mM) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (2,5 U), ambos adquiridos pela empresa Amersham Biosciences. Foi adicionado ainda, 1 µL do cDNA da aranha (LORENZINI *et al.*, 2003b), sendo o volume final de 50 µL completado com água MilliQ. A amplificação foi realizada em 30 ciclos de 45 s a 95 °C, 45 s a 50 °C e 45 s a 72 °C.

A presença do *prodom* no plasmídeo pGEM-T Easy foi verificada através de PCR de colônia utilizando-se em cada reação: 2 µL de tampão concentrado 10X para Taq DNA polimerase, 0,2 µL de cada oligonucleotídeo M13-For e M13-Rev (concentração final de 2 µM), 0,4 µL de uma mistura de dNTP (concentração final de 10 mM) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (2,5 U), sendo o volume final de 20 µL completado com água MilliQ. A

amplificação foi realizada em 20 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 54 °C e 1 min a 72 °C.

Para a verificação da presença do *prodom* no plasmídeo pGEX-2T foi realizada uma PCR de colônia utilizando-se o mesmo protocolo que o descrito para a clonagem do *prodom*, exceto pela adição do cDNA da gomesina.

Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% (m/v), sendo posteriormente corado com brometo de etídeo (EtBr, 0,5 µg/mL) e visualizado no equipamento EagleEye II Still Video System (Stratagene).

3.4.1.3 Purificação do DNA

A banda do gel correspondente ao *prodom* foi cortada, transferida para um tubo de polipropileno, onde foram adicionados 600 µL de 6 M de iodeto de sódio. A mistura foi mantida a 60 °C até a dissolução completa do gel. Acrescentou-se então, 10 µL de "glass milk" (Sigma-Aldrich), que foi mantida sob agitação por 10 min. O DNA associado ao "glass milk" foi precipitado por centrifugação a 16.000 x g por 1 min e lavado por 3 vezes com a solução de 20 mM de Tris[hidroximetilaminometano] (Tris-HCl), pH 7,5; contendo 100 mM de NaCl, 2,0 mM de EDTA em etanol a 50%. Na última lavagem, o excesso da solução foi aspirado do tubo de polipropileno e a amostra (DNA associado ao "glass milk") foi mantida à temperatura ambiente até evaporação total do etanol. O precipitado foi então, suspenso em 22 µL de água Milli-Q, para que o DNA se dissociasse do "glass milk", centrifugado a 16.000 x g por 2 min e, o sobrenadante, que continha o DNA, foi transferido para um novo tubo de polipropileno.

3.4.1.4 Reação de ligação do DNA aos plasmídeos e transformação de bactérias competentes

A reação de ligação foi realizada incubando-se 2,5 µl de tampão de ligação concentrado 2X, 1,5 µL do *prodom*, 0,5 µL do vetor pGEM-T Easy ou pGEX-2T (ambos 0,05 µg/mL) e 0,5 µL de T4 DNA ligase (3 U/µL) por 1h à

temperatura ambiente. Todos os reagentes citados acima, exceto o pGEX-2T (Amersham Biosciences), foram adquiridos pela empresa Promega. A seguir, adicionou-se 50 µl da suspensão de bactérias competentes *E. coli* DH5α a 2,5 µL da mistura da reação descrita acima, mantendo-se por 30 min no gelo, 45 s a 42 °C e 2 min no gelo. Após adicionar 80 µL do meio de cultura LB (Luria-Bertani) à mistura de reação, as células foram incubadas por 1 h a 37 °C.

Quando a transformação de bactérias foi realizada com o plasmídeo pGEM-T Easy, as mesmas foram plaqueadas em meio sólido LB-ágar a 1,5% contendo ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo (X-gal) (0,04 µg/mL) e IPTG (0,5 µmol/mL) (ambos da Invitrogen), sendo incubadas por 16 h a 37 °C. A presença do inserto (*prodom*) nas bactérias transformadas foi confirmada por PCR, usando os oligonucleotídeos M13-for e M13-rev (item 3.4.1.2). No caso da transformação com o plasmídeo pGEX-2T, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido LB-ágar a 1,5%, contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich). Neste caso, a confirmação da presença do inserto por PCR, foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos BamHI e EcoRI (3.4.1.2) e sequenciamento (3.4.1.5).

3.4.1.5 Sequenciamento do DNA

O plasmídeo pGEX-2T contendo o inserto *prodom* foi submetido a uma reação de sequenciamento, utilizando-se os oligos pGEX2T-upper ou pGEX2T-lower. Cada reação continha: 6 µL DNA, 2 µL de BigDye (Applied Biosystem), 1 µL do oligo pGEX2T-upper ou pGEX2T-lower (concentração final de 1 µM) e 5 µL de água MilliQ. O DNA foi precipitado com isopropanol a 75% por 15 min à temperatura ambiente, centrifugado a 16.000 x g por 20 min, suspenso em etanol a 70%. Este procedimento foi repetido por mais uma vez e então, a amostra foi concentrada em centrífuga a vácuo ("Speed Vac", Savant Instruments) por 15 min e suspensa em 20 µL de TSR ("template suppression reaction"; Applied Biosystem). Para o

sequenciamento foi utilizado o seqüenciador ABI Prism 310 (Applied Biosystem).

3.4.1.6 Purificação dos plasmídeos

Uma colônia de bactérias transformadas foi inoculada em 3 mL de LB-amp (LB contendo 10 µg/mL de ampicilina) e incubada por 16 h a 37 °C sob agitação. Transferiu-se então, 1,5 mL do inóculo para um tubo de polipropileno, que foi submetido à centrifugação por 1 min, a 16.000 x g. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 300 µL de 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 10 mM de EDTA e RNase (100 µg/mL). Foram adicionados, a esta reação, 300 µL de 2 M de hidróxido de sódio e 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), mantidos sob agitação, por inversão, à temperatura ambiente, por 2 min e, sem agitação por 5 min. Adicionou-se então, 300 µL de 3 M de acetato de potássio, pH 5,5, mantendo sob agitação, por inversão à temperatura ambiente, por 2 min.

As células rompidas foram centrifugadas a 16.000 x g por 10 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo de polipropileno, onde foram acrescentados 400 µL de isopropanol e, novamente submetidos à centrifugação, na mesma condição que a anterior. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo o plasmídeo, lavado com 600 µL de etanol a 70%, seguido pela centrifugação a 16.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e, o precipitado foi mantido à temperatura ambiente por 10 min, para evaporação total do etanol e, posteriormente, foi suspenso em TE (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 0,1 mM de EDTA). A preparação do plasmídeo foi submetida à digestão com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI por 90 min a 37 °C [3 µL de 10X tampão React 3 (Promega); 1 µL de EcoRI (10 U/µL, Invitrogen), 1 µL de BamHI (10 U/µL, Invitrogen), 4 µL da preparação de plasmídeo e 21 µL de água MilliQ]. A amostra foi então, analisada por eletroforese em gel de agarose a 2,0% (m/v). A banda correspondente ao *prodôm* foi cortada e o DNA purificado (protocolo descrito no item 3.4.1.3).

3.4.2 Expressão do pró-domínio C-terminal

3.4.2.1 Indução da expressão do pró-domínio C-terminal

Uma colônia de bactérias DH5 α transformadas com o plasmídeo pGEx-2T contendo o *prodom* (item 3.4.1.4), foi inoculada em 3 mL de LB contendo ampicilina (100 μ g/mL) e incubada a 37 °C sob agitação por 16 h. Ao final da incubação, 1 mL da cultura foi re-inoculada em 20 mL de LB contendo ampicilina (100 μ g/mL), mantida a 37 °C, sob agitação, até atingir a densidade ótica de 0,6 unidades medida a 595 nm em um espectrofotômetro (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech). Nesta fase, 1 mL da cultura de células foi removido, centrifugado a 16.000 x g e, após retirada do sobrenadante, congelado a -20 °C. Esta amostra foi considerada controle da indução. Os 19 mL restantes da cultura foram induzidos à expressão de proteínas, adicionando-se IPTG para uma concentração final de 0,4 mM e, mantido sob agitação por até 5 h. Ao final de cada hora de incubação, uma alíquota de 1 mL da cultura foi removida e as células, precipitadas por centrifugação, foram congeladas.

3.4.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As alíquotas das bactérias provenientes dos diferentes tempos de indução foram suspensas em 60 μ L de B-Per Reagent (Pierce), mantidas sob agitação por 1 min e, submetidas à centrifugação por 5 min a 16.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de polipropileno (proteínas solúveis). Foram adicionados mais 60 μ L do mesmo reagente ao precipitado (proteínas insolúveis). Alíquotas de 10 μ L de cada amostra foram transferidas para um novo tubo de polipropileno, onde foram acrescentados 10 μ L de tampão de amostra para SDS-PAGE 2x concentrado (120 mM de Tris-HCl, pH 6,8, contendo 5% de SDS; 5% de β -mercaptoetanol; 20% de glicerol; 1 mM de EDTA; 1% de azul de bromofenol).

A análise das proteínas foi realizada através da eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE),

aplicando-se a voltagem constante de 100 V. Utilizou-se ainda, o padrão de alto peso molecular (29 a 205 kDa, Sigma-Aldrich). Finalizada a eletroforese, as proteínas foram coradas com 0,2% de Coomassie Blue R dissolvido em 50% de metanol e 10% de ácido acético e, descoradas em uma solução de metanol 25% e ácido acético 8%.

3.4.2.3 Purificação do pró-domínio C-terminal

Para a obtenção do pró-domínio C-terminal, 800 mL de uma cultura de *E. coli* DH5 α transformada com o plasmídeo pGEx-2T contendo o *prodom* foi induzida à expressão de proteínas por 2 h com 0,4 mM de IPTG e submetida à centrifugação à 16.000 x g por 10 min a 4 °C, como descrito no item 3.4.2.1. As bactérias foram então, suspensas em 20 ml de PBS (8 mM de Na₂HPO₄.12H₂O, 1,5 mM de KH₂PO₄, pH 7,2, 137 mM de NaCl e 2,7 mM de KCl). A suspensão resultante foi lisada por sonicação (5 x 30 s) em aparelho de ultrassom Vibra Cell (Branson Digital Sonifier, modelo 450) ajustado para operar com potência de 30 watts. Após a sonicação, a amostra foi mantida sob agitação na presença de 1% de Triton-X100 durante 30 min, em banho de gelo. O lisado foi então submetido à centrifugação a 16.000 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando-se a resina Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences). Após extensiva lavagem com PBS as proteínas foram eluídas com o tampão de eluição (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0 contendo 10 mM de glutathione reduzida).

Para clivagem da glutathione S-transferase (GST) do pró-domínio C-terminal, a fração eluída foi submetida à incubação com trombina (Amersham Biosciences, 1 U para cada 100 μ g de proteína), por 16 h a 22 °C. Após a clivagem, a amostra foi submetida à uma HPLC (cromatografia líquida de alta performance), utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ analítica (VydacTM, 300 Å, 5 μ m, 4,6 mm x 250 mm) previamente equilibrada com 2% de acetonitrila (ACN) contendo 0,046% de ácido trifluoracético (TFA). A eluição das moléculas ligadas à resina foi realizada por um gradiente linear de 2 a 95% de ACN em TFA 0,046%, em 60 min, com um

fluxo de 1,0 mL/min. As frações eluídas foram concentradas em centrífuga à vácuo ("Speed Vac" , Savant Instruments). A presença do pró-domínio C-terminal nas frações eluídas da cromatografia foi verificada por análise em espectrometria de massas com ionização por "spray" de elétrons (ESI-MS). Para as análises, foi utilizado o espectrômetro LCQ Duo (Thermo Finnigan) com ionização por "spray" de elétrons (ESI). O equipamento foi previamente calibrado com soluções de: cafeína (m/z 192,5); MRFA (m/z 524,3) e Ultramark (m/z 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822 e 1922). As análises foram realizadas no modo positivo e a coleta de dados no modo "full scan" (m/z 300 a 2000).

3.5 Produção dos anticorpos policlonais

3.5.1 Anti-pró-domínio C-terminal

A fração cromatográfica contendo o pró-domínio C-terminal foi concentrado em centrífuga a vácuo e suspensa em PBS estéril. A quantificação do pró-domínio C-terminal foi realizada através da curva padrão construída a partir dos valores de absorbância a 225 nm de quantidades conhecidas de fenilalanina.

O peptídeo recombinante foi então, ligado covalentemente à albumina de soro bovino (ASB). Este acoplamento foi realizado utilizando-se o reagente 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreto (EDC) (Pierce Biotechnology). Soluções de ASB (2 mg/mL) e pró-domínio C-terminal (6 mg/mL) em 0,1 M de tampão 2-[N-morfolino]etano ácido sulfônico (MES), pH 4,7 e EDC (10 mg/mL), em água MilliQ, foram misturadas em uma proporção de 1:5:2,5, respectivamente, para um volume final de 800 µL. A mistura foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 2 h. Após a incubação, a mistura foi diluída para um volume final de 1,5 mL e separada em alíquotas de 150 µL para as imunizações.

Foram utilizados três camundongos da linhagem BALB/c para a produção do soro anti-pró-domínio C-terminal. Os animais foram cedidos e

mantidos pelo biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICBII-USP).

Na primeira imunização, 150 µL do pró-domínio C-terminal ligado à ASB foram emulsionados com adjuvante de Freund Completo. Duas doses reforço foram administradas com o pró-domínio C-terminal acoplado à ASB emulsionados com adjuvante de Freund incompleto, em intervalos de duas semanas. A sangria total foi realizada, 15 dias após a última imunização, através da ruptura da veia cava. O sangue coletado foi mantido a 37 °C, por 1 h, a 4 °C, por 16 h e, posteriormente, centrifugado a 800 x g por 5 min para obtenção do soro. O soro pré-imune foi coletado pelo plexo orbital de cada camundongo antes das imunizações.

3.5.2 Anti-acanthoscurrina

A imunização foi feita a partir da acanthoscurrina purificada dos hemócitos da aranha de acordo com a metodologia utilizada anteriormente pelo grupo (LORENZINI *et al.*, 2003a), em camundongos da linhagem BALB/c, cedidos e mantidos pelo biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICBII-USP).

Alíquotas de 35 µg de acanthoscurrina em 150 µL foram emulsificadas com lipídeo A de *Bordetella pertussis* e utilizadas para as imunizações. Foram realizadas três imunizações em intervalos de 15 dias. A obtenção do soro anti-acanthoscurrina e do soro pré-imune foi realizada como descrito anteriormente (item 3.5.1).

3.5.3 Anti-gomesina

O anticorpo anti-gomesina foi obtido em coelhos como descrito previamente (LORENZINI *et al.*, 2003b).

3.6 Imunofluorescência

Os hemócitos, obtidos como descrito no item 3.2, foram fixados em formol a 4% diluído em solução anticoagulante (SODERHALL e SMITH, 1983) durante 15 min, no gelo. As células obtidas após a centrifugação por

10 min a 800 x g, foram colocadas em lâminas de imunofluorescência tratadas previamente com poli-L-lisina e armazenadas a -20°C até sua utilização.

As células foram incubadas por 10 min em câmara úmida, à temperatura ambiente, em 25 mM de tampão Tris pH 7,0, contendo 50 mM de cloreto de amônio, 0,2% de gelatina e 0,1% de Triton-X100. Decorrido este tempo, foram realizadas três lavagens de 3 min, sob agitação, com PBS, contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T). Após as lavagens, as células foram incubadas com PBS-T contendo 0,5% de gelatina (PBS-GT) por 1 h à temperatura ambiente, em câmara úmida. Após a incubação foram realizadas três lavagens com PBS-T, como descrito anteriormente. A seguir, as células foram incubadas com o anticorpo primário: anti-gomesina (LORENZINI *et al.*, 2003b) (1:500); anti-acanthoscurrina (1:200) ou anti-pró-domínio C-terminal (1:100), todos diluídos em PBS-GT, por 1h a temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram submetidas novamente a três lavagens de 5 min com PBS-T. Foi realizada então, a incubação com o anticorpo secundário: anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Flúor 488 (1:500, Amersham Biosciences) ou anti-IgG de camundongo conjugado com Texas Red (1:200, Amersham Biosciences), ambos diluídos em PBS-GT. Após 20 min de incubação, em câmara úmida à temperatura ambiente, as células foram lavadas por três vezes de 3 min nas mesmas condições utilizadas anteriormente.

Para as reações de dupla marcação as células foram incubadas com o anticorpo anti-gomesina e em seguida com o seu respectivo anticorpo secundário (anti-IgG de coelho). Posteriormente, as células foram submetidas à incubação com os anti-soros: anti-acanthoscurrina ou anti-pró-domínio C-terminal e em seguida com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo), nas mesmas diluições citadas acima. O controle das reações foi realizado substituindo-se os anticorpos primários pelos soros pré-ímmes de coelho e de camundongo, respectivamente. Em algumas preparações a ordem do anti-gomesina e do anti-pró-domínio C-terminal ou anti-acanthoscurrina foram trocadas.

Para coloração dos núcleos, as células foram incubadas com Dapi a 1 µg/mL por 3 min. As lâminas foram montadas em PBS contendo 50% de glicerol. A análise das reações de imunofluorescência foi realizada em um sistema BioRad 1024UV acoplado a um microscópio Zeiss Axiovert 100 com objetiva PlanApo 40x 1.2 NA de imersão em água, em colaboração com o Dr. Renato Arruda Mortara da Universidade Federal de São Paulo – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

3.7 Desafio da resposta imune da aranha

3.7.1 Ensaios de desafio *in vivo*

3.7.1.1 Experimento 1

No primeiro ensaio foram injetados 100 µL de uma suspensão de 10^5 partículas de látex marcadas com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich) ou de uma suspensão contendo 10^5 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) marcadas com Texas red (Molecular Probe) na região abdominal de duas aranhas (Fig. 1). A hemolinfa foi coletada como descrito no item 3.2, antes e após 1 h, 4 h e 24 h do desafio. As amostras foram então imediatamente depositadas em lâminas de vidro, previamente fornecidas a 200 °C por 2 h (como descrito no item 3.3.1) e, analisadas a fresco em microscópio óptico de fluorescência Axiophot Zeiss com objetivas planacromáticas.

Figura 1- Ilustração de um corte logitudinal da aranha. A **seta 1** mostra a região do abdome onde foi realizada a injeção da suspensão de partículas de látex ou leveduras. A **seta 2** indica o vaso dorsal da aranha, por onde foi realizada a coleta de hemolinfa. Figura modificada de Foelix (1996)(FOELIX, 1996b).

3.7.1.2 Experimento 2

Em um segundo experimento, 50 μL de uma suspensão de 10^3 partículas de látex marcadas com FITC foram injetadas na perna de uma aranha, na região entre o fêmur e a patela (Fig. 2). A hemolinfa (50 μL) foi coletada através da punção na mesma região da injeção, antes e após 1 h, 4 h e 24 h do desafio. Após a coleta da hemolinfa as células foram separadas do plasma por centrifugação a 800 x g por 10 min e, analisadas a fresco no microscópio óptico de fluorescência Axiophot Zeiss com objetivas planacromáticas.

Figura 2- Ilustração da perna da aranha mostrando seus artículos: tarso (Ta); metatarso (Mt); tibia (Ti); patela (Pt); fêmur (Fe); trocanter (Tr); coxa (Cx). A injeção da suspensão contendo as partículas de látex marcadas com FITC, bem como a coleta da hemolinfa, foi realizada na região da articulação entre o fêmur e a patella (seta). Figura modificada de Foelix (1996) (FOELIX, 1996b).

Após 24h do desafio, a perna da aranha que havia sido inoculada foi retirada e, a região que havia sido lesionada pela injeção foi analisada a fresco. Para isso, os tecidos musculares da perna foram separados da cutícula, depositados em lâmina de vidro, previamente fornada (como descrito no item 3.3.1). A amostra foi analisada no microscópio óptico de fluorescência Axiophot Zeiss com objetivas planacromáticas.

3.7.1.3 Experimento 3

Cinqüenta microlitros de uma suspensão de 10^3 leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, suspensas em tampão salino (PBS), foram inoculados na perna de duas aranhas, conforme descrito no item 3.7.1.2. A hemolinfa destes animais foi retirada antes e após 3 h da inoculação. O plasma foi separado das células por centrifugação por 10 min a $800 \times g$ a 4°C . Para a quantificação relativa da gomesina presente no plasma, as amostras foram processadas para análise por cromatografia líquida de alta performance com fluxo na escala de nL/min (NanoHPLC) acoplada à espectrometria de massas com ionização por “spray” de elétrons (nanoHPLC-ESI/MS).

3.7.1.3.1 NanoHPLC-ESI/MS

Foram adicionados como padrão interno, às amostras descritas do item anterior, 10 pmol de um análogo da gomesina (gomesina 167) (FAZIO *et al.*, 2006). A gomesina 167 foi sintetizada quimicamente e apresenta a seqüência primária idêntica à da gomesina, exceto pela substituição de dois resíduos de serinas no lugar dos resíduos de cisteínas das posições 2 e 15, resultando em um peptídeo com apenas uma ponte de dissulfeto.

As amostras foram aplicadas em uma coluna capilar de fase reversa (C_{18} , 15 cm x 100 μm). As colunas C_{18} foram preparadas em capilares de quartzo de 100 μm de diâmetro (Biotag) de acordo com a metodologia descrita por Assunção (ASSUNÇÃO, 2005). Os capilares foram primeiramente preenchidos em uma das extremidades com uma solução de silicato de potássio a 24% e formamida a 16%. Os capilares contendo esta

solução foram mantidos a 60 °C por 30 min. A matriz porosa formada na extremidade do capilar restringe o fluxo de resina pelo mesmo. O empacotamento da coluna foi realizado com uma solução saturada da resina C₁₈ 5 µm (Vydac) em um equipamento desenvolvido no laboratório do Dr. Emanuel Carrilho do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (ASSUNÇÃO, 2005).

A cromatografia foi realizada em um aparelho de nanoHPLC (Ultimate, LC Packings), cujo fluxo foi de 200 nL/min e o gradiente de 5% de ACN em 0,2% de ácido fórmico (AF) a 80% ACN em 0,2% AF em 40 min. Os compostos eluídos da coluna foram introduzidos no espectrômetro de massas (LCQ Duo, Thermo Finnigan) através de uma fonte "nanospray" (Thermo Finnigan). O espectrômetro de massas coletou os dados no modo "full scan" (m/z 300 a 2000). Foram construídos os cromatogramas a partir da somatória das intensidades dos íons da gomesina: m/z 455,3 [M+5H]⁵⁺ e 568,8 [M+4H]⁴⁺ e da gomesina 167: m/z 499,3 [M+5H]⁵⁺ e 561,3 [M+4H]⁴⁺. A quantificação relativa da gomesina foi obtida dividindo-se a área do pico da gomesina pela área do pico do padrão interno. Foram realizadas três injeções de cada amostra, sendo a média (M) +/- erro padrão da média (EPM) representados no gráfico. O coeficiente de variação (CV) foi calculado segundo a fórmula: $CV = DP/M \times 100$ (onde DP é o desvio padrão).

3.7.1.4 Experimento 4

Em um quarto experimento, 100 µL de uma suspensão de 10⁵ partículas de leveduras marcadas com Texas red foram inoculadas no coração de duas aranhas. Como controle do experimento, foram inoculados 100 µL de PBS estéril no coração de outros dois animais. Três horas após a inoculação de leveduras ou tampão salino, foram injetados 50 µL do fixador (2,5% de glutaraldeído em PBS) no órgão. Quinze minutos após a aplicação do fixador, foi realizada a dissecação do órgão que foi transferido para um tubo de polipropileno, contendo o mesmo fixador e mantido a 4 °C por 24 h. O órgão foi dividido longitudinalmente e preparado para análise por microscopia óptica e eletrônica.

Para análise por microscopia óptica, o material foi incluído em historesina (Leica) seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. Foram feitos cortes de 1 μm de espessura que foram depositados em lâminas de vidro. As preparações foram coradas seguindo-se o método de May-Grunwald-Giemsa, modificado por Rosenfeld (ROSENFELD, 1947) e, observados em um microscópio Axiophot Zeiss com objetivas planacromáticas.

Para inclusão em resina Spurr (Sigma-Aldrich), o material fixado foi processado e analisado como descrito no item 3.3.2. Todos os procedimentos descritos no item 3.7.1.4 foram realizados em colaboração com o Dr. José Roberto Machado da Cunha da Silva da Universidade de São Paulo – Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento.

3.7.2 Ensaios de desafio *in vitro*

3.7.2.1 Viabilidade dos hemócitos

A hemolinfa coletada como descrito no item 3.2 foi diluída em 500 μL do meio de cultura L15 modificado (MUNDERLOH *et al.*, 1999), contendo 20% de soro fetal bovino e sem a adição de colesterol. A diluição da hemolinfa foi realizada de maneira que houvesse uma concentração final de 2×10^5 células por poço, de uma placa de cultura de 24 poços, contendo lamínulas de vidro (13 mm de diâmetro) previamente fornadas (como descrito no item 3.3.1). A viabilidade das células foi monitorada por até 5 dias, substituindo-se o meio de cultura pelo corante vital Azul de Tripan a 0,4% em PBS. Imediatamente após a adição do corante, a lamínula foi retirada do poço e depositada sobre uma lâmina de vidro também fornada. Foram realizadas contagens de 100 a 200 células em quatro campos aleatórios, por lamínula, e a porcentagem de células viáveis foi calculada. Em todos os experimentos que envolviam hemócitos mantidos *in vitro* a viabilidade inicial das células foi monitorada.

3.7.2.2 Atividade migratória dos hemócitos

Foram utilizadas placas de cultura de 24 poços contendo insertos “transwells” com filtros de 3 μm (Corning). A hemolinfa recém coletada (item 3.2) foi diluída em 100 μL de meio de cultura L15 modificado (MUNDERLOH *et al.*, 1999) sem a adição de soro fetal bovino e colesterol, para uma concentração final de 10^5 células em cada uma das câmaras superiores. Nas câmaras inferiores foram adicionados 100 μL do mesmo meio de cultura contendo: LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), levedura (5:1; levedura: hemócito) ou gomesina (10 μM). A preparação foi mantida por 5 h a 37 °C e, após este período, as células da câmara superior foram removidas com um cotonete.

As células que haviam migrado para a parte inferior da membrana foram fixadas com 3,7% de paraformaldeído em PBS por 15 min a 37 °C. Após 3 lavagens com PBS as células foram coradas com 0,1% de Azul de Toluidina por 2 min à temperatura ambiente. Os filtros contendo as células coradas foram lavados com água MilliQ para remoção do excesso de corante e incubados em 150 μL de uma solução de SDS a 1% por 1 h a 37 °C para lise das células. Após este intervalo de tempo, 100 μL da solução de SDS foram coletados e colocados em placas de 96 poços para leitura da absorbância a 630 nm, em leitor de microplacas.

Dois experimentos independentes foram realizados: experimento 1 em duplicata e experimento 2 em triplicata. Os valores das absorbâncias obtidas dos experimentos foram corrigidos pela equação:

$$\text{Valor Corrigido} = (\text{Absorbância experimental} - \text{Média das absorbâncias obtidas nas amostras não tratadas dos experimentos 1 ou 2}) / \text{desvio padrão das amostras não tratadas dos experimentos 1 ou 2}.$$

A média dos valores corrigidos e o erro padrão da média foram plotados. As diferenças entre os tratamentos foram analisadas pelo teste estatístico “T-students” para amostras independentes, utilizando o programa SPSS para Windows. As diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0.05$.

3.7.2.3 Atividade fagocítica dos hemócitos

A hemolinfa coletada (item 3.2) foi diluída em 100 μ L do meio de cultura L15 modificado (MUNDERLOH *et al.*, 1999), contendo 20% de soro fetal bovino e sem a adição de colesterol, para uma concentração final de 10^5 células por poço, de uma placa de cultura de 24 poços. *Saccharomyces cerevisiae*, vivas ou mortas por calor (15 min a 120 °C), foram adicionadas ao meio de cultura (5×10^5 por poço). Após 10 min, 30 min e 1h de incubação as células foram fixadas em formol a 4%, diluído em PBS durante 15 min, no gelo. As células foram então transferidas para uma lâmina fornada (como descrito no item 3.3.1) e observadas em contraste de fase no microscópio óptico Axiophot Zeiss com objetivas planacromáticas.

3.7.2.4 Atividade secretória dos hemócitos

A hemolinfa coletada (item 3.2) foi diluída em 100 μ L de meio L15 modificado (MUNDERLOH *et al.*, 1999), contendo 20% de soro fetal bovino e sem a adição de colesterol, para uma concentração final de 10^5 células por poço, distribuídas em placas de 96 poços.

Após 15 min para adesão das células, foram adicionadas diferentes concentrações de LPS (0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 1 μ g/ml) nos poços. Após 1 h, o sobrenadante proveniente de 3 poços, que receberam o mesmo tratamento, foram reunidos em um único tubo e levado à centrifugação a 800 x g por 10 min a 4 °C. A fração do sobrenadante foi então submetida à cromatografia de extração em fase sólida utilizando-se uma coluna de fase reversa (Sep-Pak C₁₈, Waters Associates), previamente equilibrada em água acidificada com TFA 0,046%. As proteínas e peptídeos retidos na coluna foram eluídos, seqüencialmente, com 5 mL de soluções de ACN a 5% /TFA a 0,046%, ACN a 40% / TFA a 0,046% e ACN a 80% / TFA a 0,046%.

A fração eluída com ACN a 40% / TFA a 0,046% foi concentrada em centrífuga a vácuo e suspensa em tampão bicarbonato de sódio 50 mM, pH 9,6. As amostras foram então distribuídas em placas de 96 poços ("High Binding", Costar) e mantidas a 4 °C por 18 h.

Após a sensibilização da placa de E.L.I.S.A., o tampão foi retirado e os poços foram submetidos a três lavagens de 5 min com 100 μ L de PBS-T (PBS contendo 0,1% Tween-20). Após as lavagens, foram adicionados, em cada poço, 100 μ L de PBS contendo 5% de leite desnatado. Após 1 h, à temperatura ambiente, foram realizadas três lavagens, nas mesmas condições que as anteriores. A seguir, foram adicionados aos poços, 100 μ L do anti-gomesina diluído 500 vezes em PBS-T, contendo 5% de leite desnatado. A placa foi incubada por 1 h à temperatura ambiente, em câmara úmida. Após a incubação, os poços foram novamente lavados com PBS-T, seguindo-se os passos já descritos anteriormente. A seguir, foram adicionados 100 μ L do anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, Amersham Biosciences), diluído 1000 vezes em PBS-T contendo 5% de leite desnatado. Novamente, a placa foi incubada por 1 h em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados por mais três vezes com PBS-T, nas mesmas condições descritas anteriormente.

A reação foi revelada adicionando-se, em cada poço, 100 μ L de uma solução composta por: 20 mL de 100 mM de tampão citrato de sódio pH 5, contendo 10 mg de diidrocloreto de o-fenilenodiamina (OPD) e 10 μ L de peróxido de hidrogênio a 30%. Após 15 min, a reação foi interrompida, acrescentando-se 50 μ L de HCl 1 M em cada poço. O resultado do experimento foi analisado pela medida da absorbância a 492 nm, em um leitor de microplacas (Labysistems iEMS Analyzer). Foram realizados três experimentos independentes, sendo que os resultados apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 Localização da molécula precursora da gomesina

A gomesina é expressa na forma de um pré-pró-peptídeo de 84 resíduos de aminoácidos, contendo um peptídeo sinal de 23 aminoácidos, a molécula ativa com 18 resíduos de aminoácidos e um pró-domínio C-terminal de 43 aminoácidos (LORENZINI *et al.*, 2003b). A imunolocalização da molécula precursora da gomesina (peptídeo ativo + pró-domínio C-terminal) foi avaliada nos hemócitos utilizando-se um anticorpo policlonal produzido a partir da molécula recombinante correspondente ao pró-domínio C-terminal da gomesina (pró-domínio C-terminal).

4.1.1 Expressão recombinante do pró-domínio C-terminal

A região 5' do cDNA correspondente ao precursor da gomesina (*prodom*) foi amplificada por reação de PCR utilizando os oligos descritos em Material e Métodos (item 3.4.1.1). A análise do produto da reação em gel de agarose mostrou uma única banda com tamanho esperado de aproximadamente 400 pb (resultados não mostrados). O DNA correspondente a esta banda foi purificado e inserido no plasmídeo pGEM-T, que foi utilizado para transformar as bactérias competentes *E. coli* DH5 α . Este plasmídeo contém o gene lacZ, responsável pela produção da enzima β -galactosidase que cliva X-gal, dando às colônias de bactérias uma coloração azulada. Este gene é interrompido quando o inserto se liga no lugar esperado do plasmídeo, fazendo com que as colônias apresentem uma coloração branca. Assim, algumas colônias brancas foram selecionadas e a presença do inserto, verificada pela amplificação do fragmento por PCR. Os plasmídeos que continham o inserto foram purificados e submetidos à reação de digestão com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI. Desta forma foi possível separar o plasmídeo pGEM-T do inserto *prodom*, que foi subclonado no vetor de expressão pGEX-2T. A presença do inserto, neste plasmídeo, foi confirmada inicialmente por PCR, e então seqüenciado (Fig.

3). A sequência obtida para o *prodom* mostrou 100% de indentidade com a sequência do cDNA da gomesina.

1	-	ATGAACCGAACTCGTCTATTTGCTTGCTTGCTTTTGGCTGTGCTTATCCTCGTTCACGAG	- 60
	-	MetAsnArgThrArgLeuPheAlaCysLeuLeuLeuAlaValLeuIleLeuValHisGlu	
61	-	TCTAACGCCAGTGCCGTAGGTTGTGTTATAAGCAACGCTGCGTCACTTATTGCCGCGGA	- 120
	-	SerAsnAla GlnCysArgArgLeuCysTyrLysGlnArgCysValThrTyrCysArgGly	
121	-	AGAGGAAAAAGA AGTTTAGATGAGACCAACGTTGGA ACTTCAGATGTGGAGAAAAGAGCC	- 180
	-	AGTTTAGATGAGACCAACGTTGGA ACTTCAGATGTGGAGAAAAGAGCC	
	-	Arg GlyLysArgSerLeuAspGluThrAsnValGlyThrSerAspValGluLysArgAla	
181	-	TTCGATGACTCCAACGTTCCATCATTAGTCGAAGAAAGGGAATTAGAGGATGAAGGGAGC	- 240
	-	TTCGATGACTCCAACGTTCCATCATTAGTCGAAGAAAGGGAATTAGAGGATGAAGGGAGC	
	-	PheAspAspSerAsnValProSerLeuValGluGluArgGluLeuGluAspGluGlySer	
241	-	TTTATTTTCGAC TAAGGAGGAACAAAATTCACATCAGGTTTTTCAGCAGAATGAGAAAAGA	- 300
	-	TTTATTTTCGAC	
	-	PheIlePheAsp*	

Figura 3- Sequência do cDNA da gomesina. A sequência deduzida de aminoácidos está representada abaixo das seqüências de nucleotídeos. A região em itálico corresponde ao peptídeo sinal. Em negrito e sublinhado está representada a sequência da molécula madura. Em sublinhado está representada a sequência do *prodom*. Abaixo está representada a sequência obtida após sequenciamento do plasmídeo pGEX-2T contendo a *prodom*. (*) representa o códon de terminação. As seqüências em negrito foram utilizadas para desenhar os oligos OLIGO BamHI e OLIGO EcoRI, respectivamente.

Bactérias competentes *E. coli* DH5 α , transformadas com o plasmídeo pGEX-2T contendo o *prodom*, foram induzidas com IPTG para expressão da proteína recombinante. As proteínas bacterianas insolúveis e solúveis foram analisadas por SDS-PAGE (Fig. 4). Foi verificado um aumento na expressão de uma proteína em torno de 30kDa, que provavelmente corresponde à proteína de interesse, uma vez que a massa molecular da GST (26 kDa) mais a massa molecular do pró-domínio C-terminal da gomesina (aproximadamente 4 kDa), resulta em uma proteína com a massa molecular estimada. Além disso, foi verificado que a proteína recombinante encontrava-se majoritariamente na forma solúvel e que não houve diferenças significativas entre duas a cinco horas de indução por IPTG.

Figura 4- Avaliação da expressão de proteínas das bactérias induzidas por IPTG. SDS-PAGE (12% de poliacrilamida) das proteínas produzidas pelas bactérias competentes transformadas com o plasmídeo pGEX-2T contendo o *prodom*. As proteínas foram coradas com Comassie Blue R. HMW: padrão de peso molecular **i**: Proteínas insolúveis e **s**: Proteínas solúveis. **0**: amostra antes da indução com IPTG; **1**: 1h de indução com IPTG; **2**: 2h de indução com IPTG; **3**: 3h de indução com IPTG; **4**: 4 h de indução com IPTG; **5**: 5 h de indução com IPTG. Um aumento na expressão após a adição do IPTG foi verificado para uma proteína de massa molecular de aproximadamente 30kDa. **(seta)**.

Considerando esse resultado, oitocentos mililitros de bactérias transformadas foram induzidas à produção do peptídeo recombinante. A purificação da proteína quimérica (GST ligada ao pró-domínio C-terminal) foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando-se uma coluna contendo glutationa reduzida. Após o tratamento da proteína quimérica com trombina, a purificação do pró-domínio C-terminal foi obtida por RP-HPLC (Fig. 5A) e a presença do peptídeo de interesse nas frações coletadas foi determinada por espectrometria de massas. A análise no espectrômetro de massas revelou a presença de um peptídeo com massa molecular esperada (4.635 Da) e um segundo peptídeo com massa molecular de 4.673 Da (Fig. 5B). A diferença entre os dois valores é de 38 Da, indicando possivelmente a formação de um aduto de potássio.

Figura 5- Purificação do peptídeo pró-domínio C-terminal. **A:** A amostra contendo a proteína quimérica (GST ligada ao pró-domínio C-terminal) resultante da digestão com trombina foi submetida à HPLC utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈. As proteínas e peptídeos foram eluídos com um gradiente de 2 a 95% de ACN em TFA 0,046%, sendo a absorbância monitorada a 225 nm. A fração contendo o pró-domínio C-terminal foi identificada por espectrometria de massas (ESI-MS) e está assinalada, no cromatograma, pela seta. **B:** Espectro de massas obtido na análise por ESI-MS da fração contendo o pró-domínio C-terminal. Os íons pertencentes ao pró-domínio C-terminal estão marcados em negrito. A massa molecular do peptídeo recombinante (4635 Da) foi calculada a partir da deconvolução do espectro de massas. A outra molécula (4673 Da) corresponde ao pró-domínio C-terminal contendo um aduto de potássio também está assinalada na figura, porém sem destaque.

4.1.2 Imunolocalização do pró-domínio C-terminal

Verificou-se que a marcação obtida nas reações de imunofluorescência, utilizando-se o soro anti-pró-domínio C-terminal, encontrava-se nos grânulos dos hemócitos (Fig. 6). Além disso, através da dupla-marcação, foi possível observar que a gomesina e o pró-domínio C-terminal encontravam-se co-localizados nos grânulos. Foi observado também que algumas células, aproximadamente 40%, não apresentaram marcação para nenhum dos dois anticorpos. O controle negativo foi realizado substituindo-se os antisoros primários (anti-gomesina e anti-pró-domínio C-terminal) pelo soro pré-imune de coelho e de camundongo, respectivamente, onde não foi observada nenhuma marcação (resultados não mostrados).

Figura 6- Imunolocalização da gomesina (verde) e do pró-domínio C-terminal (vermelho) nos hemócitos: Os hemócitos foram submetidos à reação de imunofluorescência com o anticorpo anti-gomesina e o soro anti-pró-domínio C-terminal, diluídos 500 e 100 vezes, respectivamente. Os anticorpos secundários, anti-IgG de coelho, conjugado com Alexa fluor 488 e anti-IgG de camundongo, conjugado com Texas red, foram diluídos 500 e 200 vezes, respectivamente. O núcleo foi corado com Dapi (azul). **Barra, 5µm.**

4.2 Comparação da localização da gomesina e acanthoscurrina

A comparação da localização dos dois PAMs, gomesina e acanthoscurrina, nos hemócitos foi realizada por imunofluorescência utilizando-se anticorpos secundários distintos: anti-IgG de coelho acoplado ao Alexa Flúor 488 (verde) para gomesina e anti-IgG de camundongo acoplado ao Texas red para acanthoscurrina (vermelho). Verificou-se que tanto a marcação da gomesina quanto à da acanthoscurrina aparecia como

pontos fluorescentes distribuídos pelo citoplasma, nos grânulos dos hemócitos. Além disso, observamos que a maior parte das células apresentava marcação para os dois PAMs (58%). Neste caso, os dois peptídeos estavam armazenados tanto no mesmo como em diferentes grânulos. Algumas células apresentaram marcação somente para acanthoscurrina (33%) ou somente para gomesina (2%). Além disso, algumas células (7%) não apresentaram marcação para nenhum dos PAMs (Fig. 7). O controle negativo foi realizado através da substituição do anti-gomesina e anti-acanthoscurrina pelos soros pré-ímmunes de coelho e de camundongo, respectivamente. Neste caso não houve marcação para nenhum dos dois PAMs (resultados não mostrados).

Figura 7- Imunolocalização da gomesina (verde) e da acanthoscurrina (vermelho): Os hemócitos foram submetidos à reação de imunofluorescência com os anticorpos anti-gomesina e o anti-acanthoscurrina, diluídos 500 e 200 vezes, respectivamente. Os anticorpos secundários, anti-IgG de coelho, conjugado com Alexa fluor 488 e anti-IgG de camundongo, conjugado com Texas red, foram diluídos 500 e 200 vezes, respectivamente. O núcleo foi corado com Dapi (azul). **Barra, 5μm.**

4.3 Envolvimento dos hemócitos na resposta imune

4.3.1 Observação dos hemócitos

As observações dos hemócitos provenientes da hemolinfa circulante, realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho, revelaram uma população bastante homogênea. As células apresentavam formas arredondadas ou ovaladas, sendo que a grande maioria dos hemócitos eram granulócitos, ou seja, continham numerosos grânulos no citoplasma (Fig. 8A). Estes grânulos apresentavam-se bastante eletrondensos quando observados por microscópio eletrônico de transmissão (Fig. 8B). O núcleo destas células apresentava-se centralizado, contendo regiões com cromatina densa e regiões com cromatina frouxa. Alguns hemócitos sem grânulos também foram observados, mas estes foram minoritários (1 a 2%) (Fig. 8C). Estas células apresentavam citoplasma homogêneo e reduzido.

Figura 8- Hemócitos da aranha *A. gomesiana*. **A:** Hemócitos observados a fresco em microscópio óptico de contraste de fase. As células apresentam formas arredondadas ou ovaladas. A maioria dos hemócitos possuem grânulos no citoplasma. Inserto: Observação com objetivas Nomarski, evidenciando os grânulos do citoplasma. **B e C:** Hemócitos observados por MET. **B:** Hemócito contendo numerosos grânulos eletrondensos (**G**) no citoplasma e núcleo (**N**) centralizado apresentando regiões com cromatina condensada e regiões com cromatina frouxa. **C:** Hemócito com citoplasma reduzido e uniforme, núcleo (**N**) apresentando regiões com cromatina condensada e frouxa. **Barras, 5 μ m.**

4.3.2 Respostas celulares após desafio *in vivo*

Primeiramente, dois animais foram inoculados com uma suspensão contendo leveduras marcadas com Texas red ou partículas de látex marcadas com FITC. A injeção foi realizada na região posterior do abdome dos animais (Materiais e Métodos, Fig. 1). Amostras de hemolinfa foram analisadas ao microscópio antes da inoculação e, 1 h, 4 h e 24 h após a mesma. Embora as amostras tenham sido exaustivamente analisadas, nenhuma partícula de látex ou levedura injetada foi encontrada dentro ou fora dos hemócitos. Além disso, a morfologia destas células não era diferente em relação às células do controle (aranhas antes do desafio).

Em outro experimento, partículas de látex marcadas com FITC foram injetadas em uma das pernas da aranha, na região entre o fêmur e a patela (Materiais e Métodos, Fig. 2). A hemolinfa foi coletada através da punção na mesma região da injeção, antes e após 1 h e 4 h da inoculação. As células foram separadas do plasma por centrifugação e analisadas a fresco. Foi possível verificar a presença de partículas de látex, marcadas com FITC, livres e em contato com os hemócitos. No entanto, não foi observada a ocorrência de fagocitose em nenhuma das amostras analisadas.

Após 24 h do desafio, a perna da aranha que havia sido inoculada foi retirada e o tecido muscular foi analisado a fresco, quanto à presença das partículas de látex. Foi possível observar a presença de um material de aspecto gelatinoso sobre as fibras musculares contendo numerosas partículas de látex mergulhadas neste material. Foi possível verificar também a presença dos hemócitos neste material, uma vez que cerca de 30% deles exibem auto-fluorescência em 470 nm (Fig. 9). Este resultado indicou que a injeção das partículas de látex desencadeou uma resposta de coagulação, aprisionando as mesmas. Neste experimento não foi possível observar a ocorrência de fagocitose.

Figura 9- Avaliação da presença de partículas de látex na perna da aranha. Partículas de látex conjugadas com FITC foram inoculadas em uma aranha na região da perna. Após 24h da injeção, as fibras musculares foram dissecadas e analisadas em microscópio de fluorescência. Observam-se partículas de látex (verdes) e hemócitos (azuis), que apresentam auto-fluorescência em 470 nm, mergulhados em um material de aspecto gelatinoso. **Barra, 50 μ m.**

Como foi visto que a resposta à infecção era limitada ao local da injeção, leveduras foram injetadas no coração de duas aranhas. Os órgãos foram dissecados e processados para análise em microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Como controle do experimento, uma solução de tampão salino estéril foi inoculada no coração de dois outros animais.

Através das análises dos cortes do coração por microscopia óptica foi verificada a presença de hemócitos contendo numerosos grânulos no citoplasma. Interessantemente, pelo método de coloração de Rosenfeld, foi verificado hemócitos com grânulos acidofílicos, corados em cor-de-rosa e hemócitos com grânulos basofílicos, corados em azul, indicando haver uma diferença na composição dos mesmos (Fig. 10A e B). Foram observados hemócitos tanto aderidos à parede do coração, como livres na luz do mesmo. Verificou-se ainda, a presença de algumas células sem grânulos no citoplasma (Fig. 10B e C). Além disso, foi possível observar a presença de leveduras fora dos hemócitos, não sendo constatada a ocorrência de fagocitose (Fig. 10C).

Durante as observações, foi verificada uma diferença interessante na população de hemócitos dos cortes deste material e dos cortes do coração da aranha que havia sido inoculada apenas com tampão salino estéril. Foi verificado que no segundo caso, havia uma predominância de células sem grânulos (Fig. 10D). Este resultado sugeriu que a injeção de leveduras pode ter ativado a migração dos granulócitos para a região da injeção.

Figura 10- Comparação dos cortes do coração de aranhas desafiadas e não desafiadas. Uma suspensão de leveduras em tampão salino ou somente tampão, foram inoculados no coração de duas aranhas. Após três horas, o coração das aranhas foi retirado e submetido a uma inclusão em historesina. O material foi cortado em secções de 1 μm e corado pelo método de Rosenfeld. A análise foi realizada em microscópio óptico Axiophot Zeiss.

A, B e C: Células presentes no coração da aranha desafiada com leveduras, onde é verificada uma predominância de hemócitos contendo numerosos grânulos basofílicos (azul) e acidofílicos (rosa) (**A e B**). **A, inserto:** Estão mostrados dois hemócitos em maior aumento, um contendo grânulos basofílicos e outro contendo grânulos acidofílicos. Foram observados hemócitos infiltrados e algumas células cujo citoplasma não contém grânulos (**B, setas**). Foi possível observar a presença de leveduras isoladas (**C, setas**).

D: Células presentes no coração da aranha inoculada com tampão, sendo observada uma predominância de células sem grânulos. É possível observar a presença um hemócito contendo grânulos no citoplasma (**seta**). **D, inserto:** Está mostrado um hemócito em maior aumento que não apresenta grânulos no citoplasma. É possível observar um citoplasma homogêneo, sem grânulos.

Barras, 10 μm (5 μm , no inserto).

Durante as observações, por microscopia óptica, dos cortes do coração da aranha que havia sido desafiada com leveduras, não foi observada nenhuma levedura fagocitada. No entanto, quando analisamos este mesmo material por microscopia eletrônica de transmissão, pudemos observar a ocorrência de fagocitose (Fig. 11A). Foi necessária a observação

de diferentes campos desta preparação, totalizando aproximadamente 200 células, para encontrarmos alguns hemócitos (2%) contendo leveduras internalizadas. Nestas células, pudemos observar numerosos grânulos, embora nenhum evento de fusão dos mesmos com o fagossomo tenha sido observado. Nesta preparação foi verificada ainda, a ocorrência de exocitose do conteúdo granular dos hemócitos (Fig. 11B).

Figura 11- Respostas celulares ativadas após desafio com leveduras. O coração da aranha que havia sido inoculada com leveduras por três horas foi dissecado e incluído em resina Spurr. As observações foram realizadas e microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100 CX. **A:** hemócito contendo uma levedura fagocitada. **B:** Detalhe de um hemócito exocitando o conteúdo granular. **(F):** fagossomo; **(G):** grânulos; **(N):** núcleo. Barra, 1µm.

4.3.3 Respostas celulares após desafio *in vitro*

A capacidade de migração dos hemócitos frente a um estímulo foi analisada em experimentos *in vitro*. Primeiramente, a viabilidade dos hemócitos mantidos *in vitro* foi monitorada. Verificou-se que nas condições testadas estas células permaneciam viáveis por até cinco dias (Fig. 12).

Figura 12- Viabilidade dos hemócitos mantidos *in vitro*. A hemolinfa foi coletada e diluída para uma concentração de 2×10^5 células, por poço, em meio L15 contendo 20% de soro fetal bovino, por até 120 h. A viabilidade das células foi monitorada substituindo-se o meio de cultura pelo corante de exclusão Azul de Tripán. Quatro campos aleatórios foram analisados e a porcentagem de células vivas foi calculada.

Para o experimento de migração, os hemócitos foram colocados em uma câmara superior separada da inferior por uma membrana semipermeável. Na câmara inferior foram colocados LPS, levedura ou gomesina. Foi verificado que as células estimuladas com leveduras e LPS apresentaram um comportamento migratório para a câmara inferior, significativamente diferente das células controles que não foram estimuladas ($P < 0.014$ and $P < 0.013$, respectivamente) (fig 13). A gomesina, em uma concentração de $10 \mu\text{M}$, não estimulou a quimiotaxia dos hemócitos.

Figura 13- Migração dos hemócitos *in vitro*. A hemolinfa foi coletada e diluída em meio L15 para uma concentração final de 10^5 células, por inserto. Os hemócitos foram colocados na câmara superior do inserto e os agentes quimiotáticos a serem testados foram colocados na câmara inferior. As células que migraram foram coradas com Azul de Toluidina e, após o rompimento destas células com uma solução de 1% de SDS, a absorbância foi medida a 630 nm em um leitor de microplacas. A absorbância obtida dos experimentos foi corrigida pela equação descrita em Materiais e Métodos (item 3.7.2.2). As leveduras e o LPS ativaram a migração dos hemócitos significativamente ($P < 0.014$ e $P < 0.013$, respectivamente). A gomesina em uma concentração de $10 \mu\text{M}$ não atraiu as células.

A baixa atividade fagocítica dos hemócitos foi também observada em ensaios *in vitro*, onde a incubação dos hemócitos com leveduras vivas ou mortas, por até 1h, não estimulou a fagocitose. Nas preparações que continham leveduras vivas, foram observados hemócitos emitindo filopódios dez minutos após a adição de levedura no meio de cultura (Fig. 14A). Foram observados ainda, alguns hemócitos sem grânulos no citoplasma, trinta minutos após a adição de leveduras (Fig. 14B e C), indicando ter ocorrido a secreção dos mesmos. Os hemócitos que foram mantidos na ausência de leveduras permaneceram com os grânulos no citoplasma e não emitiram filopódios (Fig. 14D).

Figura 14- Exocitose após desafio *in vitro*. A-D: Hemócitos mantidos *in vitro* por 1h na presença ou ausência de leveduras vivas. Observação realizada em microscópio óptico Axiophot Zeiss (contraste de fase) **A:** Hemócito após 10 min de incubação com leveduras emitindo filopódios. **B e C:** Hemócitos sem grânulos após 30 min de incubação com leveduras. **D:** Hemócito mantido na ausência de leveduras não apresentou filopódios nem desgranulação. **Barras, 10 μ m.**

4.3.4 Secreção de gomesina após um desafio

Para avaliarmos a secreção da gomesina para o plasma após um desafio, primeiramente dois animais foram inoculados com uma suspensão de leveduras na perna, na região entre o fêmur e a patela. Antes e após três horas da injeção, a hemolinfa dos animais foi coletada e o plasma, separado das células por centrifugação, foi processado para análise por espectrometria de massas.

Para a realização da quantificação relativa da gomesina secretada para o plasma, adicionamos de um padrão interno às amostras antes de serem aplicadas no nanoHPLC. O padrão interno, gomesina 167, corresponde a um análogo sintético da gomesina, sendo que as cisteínas das posições 2 e 15 foram substituídas por serinas, resultando em um peptídeo com apenas uma ponte dissulfeto (FAZIO *et al.*, 2006). A adição do padrão interno minimiza os erros de injeção das amostras.

A partir dos resultados obtidos foi impossível estabelecer se havia secreção da gomesina após um desafio, uma vez que não foi observada

uma variação entre a quantidade relativa da gomesina antes e após a inoculação de leveduras (Fig. 15). Contudo, estes resultados têm que ser interpretados com cuidado, devido aos altos valores de coeficiente de variação observados (valores entre 37% a 187%, Tabela 1). Ou seja, houve uma grande variação da quantidade de gomesina detectada entre as réplicas de uma mesma amostra.

Figura 15- Quantificação relativa de gomesina secretada após desafio *in vivo*. As amostras de plasma foram coletadas antes e 3h após a injeção de leveduras. A quantificação relativa da gomesina secretada foi realizada por nanoHPLC-ESI/MS. **AG/AG167**: razão entre a área do pico obtida para a gomesina (**AG**) pela área do pico obtido para o padrão interno, gomesina 167 (**AG167**). **0h**: amostras de plasma antes da inoculação de leveduras. **3h**: amostras de plasma 3h após a inoculação. Os valores plotados representam a média dos experimentos realizados em triplicata +/- erro padrão da média.

Tabela 1- Coeficientes de variação das amostras de plasma das aranhas antes (0h) e após (3hs) a inoculação com leveduras. Tabela: A tabela mostra o coeficiente de variação obtido entre as réplicas de cada amostra (CV = desvio padrão/média x 100).

Tratamento	Aranha nº	Tempo (h)	Gomesina C.V.
Leveduras	1	0	187%
		3	46%
	2	0	75%
		3	37%

Devido aos resultados não conclusivos obtidos nas análises por espectrometria, optamos pela quantificação de gomesina secretada pelo método de E.L.I.S.A. Os hemócitos mantidos *in vitro* foram incubados com diferentes concentrações de LPS por 1h. O sobrenadante da cultura foi coletado e submetido ao ensaio. Por esta metodologia, foi possível verificar que a gomesina foi secretada de forma dose-dependente, sendo verificada uma maior secreção de gomesina (160 nM) no meio em que as células haviam sido estimuladas com 1 µg/mL de LPS (Fig. 16).

Figura 16- Quantificação da gomesina secretada pelos hemócitos mantidos *in vitro*. A hemolinfa foi coletada e diluída para uma concentração de 10^5 células, por poço, em meio L15 contendo 20% de soro fetal bovino. Diferentes concentrações de LPS (0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 1 mg/mL) foram adicionadas ao meio. Após 1h, a presença de gomesina no meio de cultura foi avaliada pelo método de E.L.I.S.A. O resultado apresentado representa a média +/- erro padrão da média de três experimentos distintos.

5 DISCUSSÃO

Uma vez que existem poucas informações sobre a imunidade em aranhas, o principal objetivo deste trabalho foi determinar o papel dos hemócitos nas reações imunes ativadas após uma infecção na aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*. Comparando-se com os insetos (RATCLIFFE e WHITTEN, 2004), poucos trabalhos sobre a imunidade nos aracnídeos foram realizados. Alguns trabalhos antigos mostraram a classificação dos hemócitos das aranhas. Embora nenhuma função específica tenha sido determinada, os hemócitos parecem estar envolvidos na coagulação, cicatrização e outras funções imunes (FOELIX, 1996b).

Foi mostrado mais recentemente que a hemocianina do plasma das aranhas podem exibir além da função transportadora de oxigênio, uma atividade de fenoloxidase após clivagem por tripsina e quimotripsina (DECKER e RIMKE, 1998). Sabe-se que a cascata da fenoloxidase culmina na produção da melanina que vai envolver os nódulos e cápsulas formados nos insetos (ASHIDA e BREY, 1998) e nos crustáceos (CERENIUS e SODERHALL, 2004) frente à penetração de microorganismos invasores.

Nosso grupo tem estudado moléculas antimicrobianas de dois aracnídeos: o carrapato de boi *Boophilus microplus* (FOGAÇA *et al.*, 1999; FOGAÇA *et al.*, 2004; FOGACA *et al.*, 2006) e a aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*. Foram isolados dois peptídeos antimicrobianos dos hemócitos da aranha *A. gomesiana* não desafiada, a acanthoscurrina e a gomesina (SILVA JR *et al.*, 2000; LORENZINI *et al.*, 2003a). Além dos PAMs, foi caracterizado um outro fator antimicrobiano, a migalina, uma acilpoliamina que apresentou atividade contra *E. coli*. Sua atividade foi completamente inibida na presença de catalase (PEREIRA *et al.*, 2007).

Estudos anteriores mostraram que a gomesina é traduzida na forma de um pré-pró-peptídeo contendo 84 resíduos de aminoácidos, sendo o peptídeo sinal formado por 23 aminoácidos, a molécula madura com 18 aminoácidos e um pró-domínio C-terminal com 43 aminoácidos (LORENZINI *et al.*, 2003b).

A partir do peptídeo recombinante correspondente ao pró-domínio C-terminal foi produzido um antisoro policlonal que foi utilizado para determinar a localização da molécula precursora da gomesina. A localização do pró-domínio C-terminal nos grânulos dos hemócitos mostrou que este peptídeo é direcionado a estas organelas na forma de pró-peptídeo.

Os trabalhos iniciais do nosso grupo mostraram que a gomesina foi purificada dos hemócitos na sua forma madura através da extração ácida das proteínas dos hemócitos (SILVA JR *et al.*, 2000). Neste procedimento, as células são primeiramente separadas do plasma através de centrifugação e a purificação dos PAMs é realizada a partir do homogenato das células. Durante a homogeneização dos hemócitos, o baixo pH (pH 2,0) empregado pode não inibir completamente a enzima responsável pelo processamento da gomesina, fazendo com que o pró-peptídeo entre em contato com a mesma, resultando assim na purificação do peptídeo maduro. Assim sendo, a enzima responsável pelo processamento da gomesina deve estar armazenada também nos hemócitos.

A sequência de aminoácidos do pró-domínio deduzida a partir do cDNA do precursor da gomesina mostrou um resíduo de glicina seguido de dois aminoácidos básicos (Lys-Arg) (LORENZINI *et al.*, 2003b). Este domínio dibásico é um sítio específico para endopeptidases da família das subtilisinas que são responsáveis pelo processamento de diferentes peptídeos como o fator α de leveduras e a pró-insulina (BARR, 1991). Na biblioteca de cDNA dos hemócitos da aranha *A. gomesiana* foram encontradas duas proteases com similaridade às proteases pertencentes à família das subtilisinas: SPC3, de *Bachistoma californiensis* (clone nº 847761) e SP5, de *Rana esculenta* (clone nº 23266416) (LORENZINI *et al.*, 2006). Assim sendo, após o processamento da pró-gomesina pela subtilisina, os dois aminoácidos básicos remanescentes poderiam ser removidos por carboxipeptidases (VARLAMOV e FRICKER, 1996) e, posteriormente, o resíduo de glicina carboxi-terminal forneceria o agrupamento amina para formação do resíduo de arginina amidado, através

da ação da enzima "peptidylglycine- α -amidating-monooxygenase" (EIPPER *et al.*, 1993).

Peptídeos antimicrobianos das famílias das taquipesinas de limúlídeos e mitilinas de moluscos são traduzidos na forma de pró-peptídeos nos hemócitos. O fato deles terem sido purificados já em sua forma madura, indicou aos autores destes trabalhos que os peptídeos seriam armazenados nos grânulos dos hemócitos já em sua forma madura (SHIGENAGA *et al.*, 1990; MITTA *et al.*, 2000a). Em contrapartida, foi verificado que nas células de Paneth de intestino de humanos, o pH ácido empregado para a extração dos peptídeos não inibe a ação de proteases, resultando na purificação da defensina já em sua forma madura. Quando o mesmo procedimento de purificação foi realizado na presença de um coquetel de inibidores de proteases, a pró-defensina é conservada. Além disso, foi verificado que nestas células a pró-defensina é armazenada nos mesmos grânulos que a enzima responsável pelo seu processamento, sendo que a mesma é armazenada na forma de zimogênio. Ao sinal de uma infecção, o conteúdo dos grânulos é secretado para o meio extracelular, onde a enzima se torna ativa provocando o processamento da pró-defensina (GHOSH *et al.*, 2002).

Da mesma forma, a protegrina, pertencente à família das cathelicidinas, é armazenada na forma de pró-peptídeo dentro dos grânulos dos neutrófilos de suínos. Durante uma infecção, o pró-peptídeo é secretado para o plasma onde é processado por elastases. Neste caso, a enzima responsável pelo processamento encontra-se no plasma (PANYUTICH *et al.*, 1997; ZANETTI *et al.*, 2000).

Assim sendo, nossos resultados mostram que a gomesina encontra-se na forma de pró-peptídeo nos grânulos dos hemócitos. Além disso, sugerem que a enzima responsável por este processamento pertence à família das subtilisinas, que deve estar dentro dos hemócitos, armazenada nos grânulos dos mesmos. O processamento da gomesina pode ocorrer no interior dos hemócitos ou no plasma, após a secreção do pró-peptídeo.

A distribuição relativa dos PAMs, gomesina e acanthoscurrina, foi determinada por dupla-imunomarcção. Embora tenha sido observado que a

maioria dos hemócitos armazena tanto a gomesina como a acanthoscurrina (58%), algumas células apresentam uma distribuição diferenciada dos mesmos, sendo que alguns hemócitos apresentam somente a acanthoscurrina (33%) e outros somente a gomesina (2%). No molusco *Mytilus galloprovincialis* foi mostrado que os hemócitos que armazenam somente o PAM mitilina estão envolvidos na fagocitose e são os primeiros a serem ativados durante uma infecção. O papel dos hemócitos que armazenam somente o outro PAM, a defensina, ainda não está claro. Já os hemócitos que armazenam os dois PAMs são ativados tardiamente e estão envolvidos com a secreção dos mesmos para o plasma (MITTA *et al.*, 2000b). Na aranha, esta distribuição diferenciada dos PAMs também poderia ser atribuída a uma função diferente dos hemócitos durante a infecção, mas não se pode descartar a possibilidade de se tratar de uma diferença na fase de maturação destas células.

A produção e o armazenamento de PAMs nos hemócitos sugerem a importância destas células no sistema imune da aranha *A. gomesiana*. Com o objetivo de se determinar em quais processos os hemócitos poderiam estar envolvidos durante uma infecção, diferentes desafios *in vivo* e *in vitro* foram realizados.

Primeiramente verificou-se que leveduras ou partículas de látex inoculadas no abdôme da aranha, não foram recuperadas através da coleta da hemolinfa pelo vaso dorsal. Este resultado sugeriu que as partículas poderiam ter sido aprisionadas devido à ativação da cascata de coagulação na região em que a injeção havia sido realizada.

Frente a este resultado, nós inoculamos partículas de látex na perna da aranha. Vinte e quatro horas após o inóculo foi verificado que as partículas de látex e os hemócitos estavam mergulhados em um material gelatinoso sobre ou entre as fibras musculares, indicando ter ocorrido a formação do coágulo. A formação do coágulo também é verificada quando coletamos a hemolinfa da aranha sem a solução anticoagulante, pois a hemolinfa adquire um aspecto gelatinoso e por muitas vezes a agulha da seringa, utilizada na coleta, fica obstruída.

Sabe-se que a coagulação é uma resposta bastante conservada na imunidade inata e é muito importante especialmente para os invertebrados, que apresentam o sistema circulatório aberto. A coagulação geralmente está relacionada à prevenção da perda de hemolinfa (THEOPOLD *et al.*, 2004). Estudos realizados em baratas mostraram que a coagulação é ativada em resposta a um ferimento, mas esta resposta é aumentada na presença de partículas exógenas. Além disso, a coagulação evita a dispersão do material particulado na hemocèle e induz uma resposta imune localizada, limitando as reações auto-imune e a destruição dos tecidos (HAINE *et al.*, 2007).

Em limulídeos, foi verificado que a presença de endotoxinas acarreta na ativação da cascata de coagulação que é composta por serina proteases. Quando essa ativação se dá pela presença de LPS, a cascata inicia-se com a auto-ativação do fator C que culmina na conversão do coagulogênio em coagulina, que por sua vez polimeriza, formando um gel insolúvel. No caso da ativação ser via β 1,3-glicana, a cascata é iniciada pela auto-ativação do fator G que vai ativar a enzima da pró-coagulação diretamente (IWANAGA e LEE, 2005).

Na aranha *A. gomesiana* foi verificado que, com exceção do coagulogênio, todos os outros componentes da cascata de coagulação de limulídeos estão presentes na biblioteca de cDNA dos hemócitos (LORENZINI *et al.*, 2006). Frente aos dados apresentados, concluímos que a injeção das partículas exógenas na aranha ativa a cascata de coagulação, sendo que a mesma deve ser similar àquela encontrada nos limulídeos.

A injeção de leveduras no coração da aranha causou uma mudança na população de hemócitos, sendo observada uma predominância de granulócitos. Este resultado indicou a ocorrência de migração destas células para o local de injeção e foi confirmado em experimentos *in vitro*, onde as leveduras e o LPS estimularam a quimiotaxia dos hemócitos.

Foi descrito que no coração da aranha *Eurypelma* são encontradas células sem grânulos denominadas pró-hemócitos. Estas células se desprendem da parede do coração sofrem divisões mitóticas até atingirem a maturação (SHERMAN, 1981). Desta forma, não podemos descartar a

hipótese de que as células sem grânulos observadas no coração da aranha, inoculada com tampão salino, corresponda aos pró-hemócitos e que a injeção das leveduras possa ter, de alguma forma, acelerado o processo de maturação dos mesmos.

Foi verificado ainda, pelos ensaios de migração *in vitro*, que a gomesina em uma concentração de 10 μ M não é capaz de atrair os hemócitos. Diferentemente do que foi visto em nossos resultados, alguns PAMs podem ter uma ação quimiotática. Sabe-se que as defensinas humanas atraem os neutrófilos (YANG *et al.*, 2000). Já as temporinas, PAMs extraídos de pele de sapo, podem estimular a migração dos neutrófilos de sapo, mas também podem atrair neutrófilos murinos e humanos (CHEN *et al.*, 2004).

Outro mecanismo muito conservado na imunidade inata dos animais é a fagocitose. No entanto, os baixos índices de fagocitose observados, tanto nos cortes do coração da aranha desafiada com leveduras (cerca de 2%) como nos experimentos *in vitro*, mostrou que a fagocitose não deve ser o principal mecanismo ativado após uma infecção na aranha. Diferentemente do que foi observado para aranha, em outro aracnídeo, o carrapato *Boophilus microplus*, foi observada uma atividade fagocítica de 20% quando levedura foi inoculada na hemocele desses animais. Neste caso, as células responsáveis pela fagocitose são os plasmatócitos, que não apresentam grânulos no citoplasma (PEREIRA *et al.*, 2001). Em moluscos, os granulócitos são responsáveis pela fagocitose dos microorganismos. A eliminação dos mesmos se dá pela fusão dos grânulos, que contêm as mitilinas, com o fagossomo (MITTA *et al.*, 2000b).

Em limúlídeos, onde cerca de 98% são granulócitos, foi verificada a ocorrência de fagocitose somente quando estas células foram incubadas com partículas inertes livres de endotoxina. Neste animais, foi verificado que a presença de LPS estimula a secreção de 100% do conteúdo granular em até 20 minutos. A secreção se dá pelo processo de exocitose que é iniciado após a ativação do receptor ligado à proteína G. Quando este é ativado, faz com que a fosfolipase C produza 1,4,5 -Inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol.

O IP₃ causa aumento do cálcio intracelular levando a exocitose (SOLON *et al.*, 1996). Neste processo, além dos PAMs os componentes da cascata de coagulação também são secretados (IWANAGA e LEE, 2005).

Em alguns experimentos *in vitro* observamos hemócitos sem grânulos após trinta minutos de incubação com leveduras, indicando que os mesmos poderiam ter sido exocitados quando estimulados com leveduras. Este resultado foi confirmado através dos experimentos *in vivo* de desafio com leveduras, onde foi verificada a exocitose do conteúdo granular dos hemócitos nos cortes do coração da aranha.

Foi verificado anteriormente pelo nosso grupo que a acanthoscurrina é secretada para o plasma 3h após a inoculação de bactérias na aranha *A. gomesina*. Neste caso, a secreção da gomesina não foi detectada (LORENZINI *et al.*, 2003a). Em contrapartida, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que quando os hemócitos são incubados com diferentes concentrações de LPS, a gomesina é secretada de maneira dose-dependente.

No caso do trabalho de Lorenzini e colaboradores (LORENZINI *et al.*, 2003a), a não detecção da gomesina pode ser atribuída à diferentes fatores: (i) as amostras de plasma que foram analisadas por espectrometria de massas eram provenientes das frações cromatográficas das proteínas separadas por HPLC. Neste caso, a coleta das frações foi realizada manualmente, fazendo com que a fração contendo a gomesina pudesse ter sido erroneamente descartada. (ii) A fonte “Eletronspray” do espectrômetro de massas utilizada nesse trabalho é menos sensível (ordem de nanomoles) que a atual “Nanospray”, fazendo com que moléculas em baixíssimas concentrações (picomoles) sejam detectadas. No presente trabalho, apesar da grande variação da quantidade de gomesina, detectada nas análises por espectrometria de massas, observamos a presença deste peptídeo no plasma da aranha antes e após a inoculação de leveduras.

Apesar de incluirmos nas amostras um padrão interno de concentração conhecida, o que permitiu minimizar erros de injeção das amostras no espectrômetro de massas, atribuímos a grande variação entre

as réplicas da mesma amostra (coeficiente de variação de até 187%) ao método de coleta dos dados no espectrômetro de massas. A quantificação relativa foi realizada no modo “full scan”, onde o espectrômetro de massas monitora os íons mais abundantes no intervalo de m/z entre 300 a 2000. Desta forma, os íons menos abundantes podem ter sido subamostrados nas análises. Uma alternativa para esta análise poderia ser a utilização do modo “SIM” para coleta dos dados. Neste caso, somente os íons selecionados são monitorados, o que resultaria num cálculo mais preciso da quantidade do peptídeo na amostra.

6 CONCLUSÃO

O trabalho apresentado mostra que os PAMs, gomesina e acanthoscurrina, produzidos pelos hemócitos são armazenados nos grânulos destas células. Foi verificado também que a gomesina é direcionada para estas organelas na forma de um pró-peptídeo. Seu processamento pode ocorrer no interior dos hemócitos ou no plasma, após a secreção do pró-peptídeo, juntamente com a enzima responsável pela geração do peptídeo maduro.

Com o objetivo de se determinar o papel dos hemócitos no sistema imune da aranha, diferentes experimentos *in vivo* e *in vivo* foram realizados. Os resultados mostraram que a presença de microorganismos na hemocela da aranha deve atrair os hemócitos. Uma vez no local da infecção, estas células devem secretar componentes da cascata da coagulação e peptídeos antimicrobianos, que vão aprisionar e eliminar os microorganismos invasores. A fagocitose deve ter um papel secundário, sendo responsável pela remoção de restos celulares e remodelagem dos tecidos danificados.

REFERÊNCIAS

ARIKI, S.;KOORI, K.;OSAKI, T.;MOTOYAMA, K.;INAMORI, K.;KAWABATA, S. A serine protease zymogen functions as a pattern-recognition receptor for lipopolysaccharides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, n.4, p.953-8. 2004.

ASHIDA, M.;BREY, P. T. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: BREY, P. T.;HULTMARK, D. (Ed.). **Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects**. London: Chapman & Hall, 1998. p.135-72.

ASSUNÇÃO, N. A. **Desenvolvimento de instrumentação e metodologias bioanalíticas aplicadas a análises proteômica**. 218 p. (Doutorado) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

BACHERE, E.;GUEGUEN, Y.;GONZALEZ, M.;DE LORGERIL, J.;GARNIER, J.;ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunol. Rev.**, v.198, n.1, p.149-68. 2004.

BARBOSA, F. M.;DAFFRE, S.;MALDONADO, R. A.;MIRANDA, A.;NIMRICHTER, L.;RODRIGUES, M. L. Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole. **Fems. Microbiol. Lett.**, v.274, n.2, p.279-86. 2007.

BARR, P. J. Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. **Cell**, v.66, n.1, p.1-3. 1991.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRAYNER, F. A.; ARAUJO, H. R.; CAVALCANTI, M. G.; ALVES, L. C.; PEIXOTO, C. A. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). **Micron**, v.36, n.4, p.359-67. 2005.

BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.**, v.198, p.169-84. 2004.

BURGIERMAN, M. R.; MALDONADO, R. A.; ULIANA, S.; FÁZIO, M. A.; MIRANDA, M. T. M.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S. Gomesin activity against *Leishmania sp* and *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.44, p.110. 2002.

CERENIUS, L.; SODERHALL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunol. Rev.**, v.198, p.116-26. 2004.

CHEN, Q.; WADE, D.; KUROSAKA, K.; WANG, Z. Y.; OPPENHEIM, J. J.; YANG, D. Temporin A and related frog antimicrobial peptides use formyl peptide receptor-like 1 as a receptor to chemoattract phagocytes. **J. Immunol.**, v.173, n.4, p.2652-9. 2004.

CORZO, G.; VILLEGAS, E.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L. D.; BELOKONEVA, O. S.; NAKAJIMA, T. Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.26, p.23627-37. 2002.

COURSEY, Y.; AHMAD, N.; MCGEE, B. M.; STEIMEL, N.; KIMBLE, M. Amebocyte production begins at stage 18 during embryogenesis in *Limulus polyphemus*, the American horseshoe crab. **Biol. Bull.**, v.204, n.1, p.21-7. 2003.

DANNHORN, D. R.; SEITZ, K. A. Hemocytes of *Leiobunum limbatum* and two other species of harvestmen (Arachnida, Opiliones): Morphological classification and functional aspects. **J. Morphol.**, v.193, p.185-96. 1987.

DECKER, H.;RIMKE, T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.40, p.25889-92. 1998.

DEEVEY, G. B. The blood cells of the Haitian tarantula and their relation to the moulting cycle. **J. Morphol.**, v.68, p.457-91. 1941.

DU PASQUIER, L. The immune system of invertebrates and vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v.129, n.1, p.1-15. 2001.

EIPPER, B. A.;MILGRAM, S. L.;HUSTEN, E. J.;YUN, H. Y.;MAINS, R. E. Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: a multifunctional protein with catalytic, processing, and routing domains. **Protein Sci.**, v.2, n.4, p.489-97. 1993.

EVANS, C. J.;HARTENSTEIN, V.;BANERJEE, U. Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. **Dev. Cell.**, v.5, n.5, p.673-90. 2003.

FAHRENBACH, W. H. The cyanoblast: Hemocyanin formation in *Limulus polyphemus*. **J. Cell. Biol.**, v.44, p.445-53. 1970.

FARLEY, R. D. The ultrastructure of hemocytopoietic organs in the desert scorpion, *Paruroctonus*. **Tissue Cell**, v.16, n.4, p.577-88. 1984.

FAZIO, M. A.;OLIVEIRA, V. X., JR.;BULET, P.;MIRANDA, M. T.;DAFFRE, S.;MIRANDA, A. Structure-activity relationship studies of gomesin: importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. **Biopolymers**, v.84, n.2, p.205-18. 2006.

FOELIX, R. F. An introduction to spiders. In: FOELIX, R. F. (Ed.). **Biology of spiders**. New York: Oxford University Press, 1996a. p.1-11.

FOELIX, R. F. Metabolism. In: FOELIX, R. F. (Ed.). **Biology of Spiders**. New York: Oxford University Press 1996b. p.56-60.

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

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

FOGAÇA, A. C.;SILVA, P. I., JR.;MIRANDA, M. T.;BIANCHI, A. G.;MIRANDA, A.;RIBOLLA, P. E.;DAFFRE, S. Antimicrobial Activity of a Bovine Hemoglobin Fragment in the Tick *Boophilus microplus*. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.36, p.25330-34. 1999.

GANZ, T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. **Infect. Immun.**, v.55, n.3, p.568-71. 1987.

GANZ, T.;LEHRER, R. I. Antimicrobial Peptides in Innate Immunity. In: LOHNER, K. (Ed.). **Development of novel antimicrobial agents**: emerging strategies. Wymondham, Norfolk, UK: Horizon Scientific Press, 2001. p.139-47.

GHOSH, D.;PORTER, E.;SHEN, B.;LEE, S. K.;WILK, D.;DRAZBA, J.;YADAV, S. P.;CRABB, J. W.;GANZ, T.;BEVINS, C. L. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. **Nat. Immunol.**, v.3, n.6, p.583-90. 2002.

GILLESPIE, J. P.;KANOST, M. R.;TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annu. Rev. Entomol.**, v.42, p.611-43. 1997.

HAINE, E. R.;ROLFF, J.;SIVA-JOTHY, M. T. Functional consequences of blood clotting in insects. **Dev. Comp. Immunol.**, v.31, n.5, p.456-64. 2007.

HERNANDEZ, S.;LANZ, H.;RODRIGUEZ, M. H.;TORRES, J. A.;MARTINEZ-PALOMO, A.;TSUTSUMI, V. Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. **J. Med. Entomol.**, v.36, n.4, p.426-34. 1999.

IWANAGA, S.;LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v.38, n.2, p.128-50. 2005.

KUHN-NENTWIG, L.;MULLER, J.;SCHALLER, J.;WALZ, A.;DATHE, M.;NENTWIG, W. Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). **J. Biol. Chem.**, v.277, n.13, p.11208-16. 2002.

LAVINE, M. D.;STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.32, n.10, p.1295-309. 2002.

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

LEVASHINA, E. A.;MOITA, L. F.;BLANDIN, S.;VRIEND, G.;LAGUEUX, M.;KAFATOS, F. C. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. **Cell**, v.104, n.5, p.709-18. 2001.

LORENZINI, D. M.;DA SILVA, P. I., JR.;FOGACA, A. C.;BULET, P.;DAFFRE, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Dev. Comp. Immunol.**, v.27, n.9, p.781-91. 2003a.

LORENZINI, D. M.;FUKUZAWA, A. H.;SILVA, P. I., JR.;MACHADO-SANTELLI, G.;BIJOVSKY, A. T.;DAFFRE, S. Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.33, n.10, p.1011-6. 2003b.

LORENZINI, D. M.;SILVA, P. I., JR.;SOARES, M. B.;ARRUDA, P.;SETUBAL, J.;DAFFRE, S. Discovery of immune-related genes expressed in hemocytes of the tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Dev. Comp. Immunol.**, v.30, p.545-56. 2006.

MANDARD, N.;BULET, P.;CAILLE, A.;DAFFRE, S.;VOVELLE, F. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. **Eur. J. Biochem.**, v.269, n.4, p.1190-98. 2002.

MITTA, G.;VANDENBULCKE, F.;HUBERT, F.;ROCH, P. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. **J. Cell. Sci.**, v.112, p.4233-42. 1999.

MITTA, G.;VANDENBULCKE, F.;HUBERT, F.;SALZET, M.;ROCH, P. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.17, p.12954-62. 2000a.

MITTA, G.;VANDENBULCKE, F.;NOEL, T.;ROMESTAND, B.;BEAUVILLAIN, J. C.;SALZET, M.;ROCH, P. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. **J. Cell. Sci.**, v.113, p.2759-69. 2000b.

MOREIRA, C. K.;RODRIGUES, F. G.;GHOSH, A.;VAROTTI, F. D.;MIRANDA, A.;DAFFRE, S.;JACOBS-LORENA, M.;MOREIRA, L. A. Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium spp.* **Exp. Parasitol.**, v.116, n.4, p.346-53. 2007.

MUNDERLOH, U. G.;JAURON, S. D.;FINGERLE, V.;LEITRITZ, L.;HAYES, S. F.;HAUTMAN, J. M.;NELSON, C. M.;HUBERTY, B. W.;KURTTI, T. J.;AHLSTRAND, G. G.;GREIG, B.;MELLENCAMP, M. A.;GOODMAN, J. L. Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.8, p.2518-24. 1999.

MUNOZ, M.;VANDENBULCKE, F.;SAULNIER, D.;BACHERE, E. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. **Eur. J. Biochem.**, v.269, n.11, p.2678-89. 2002.

NAGAI, T.;OSAKI, T.;KAWABATA, S. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.29, p.27166-70. 2001.

NAPPI, A. J.;OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays**, v.22, n.5, p.469-80. 2000.

OSAKI, T.;OKINO, N.;TOKUNAGA, F.;IWANAGA, S.;KAWABATA, S. Proline-rich cell surface antigens of horseshoe crab hemocytes are substrates for protein cross-linking with a clotting protein coagulin. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.42, p.40084-90. 2002.

PANYUTICH, A.;SHI, J.;BOUTZ, P. L.;ZHAO, C.;GANZ, T. Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted protegrins. **Infect. Immun.**, v.65, n.3, p.978-85. 1997.

PEREIRA, L. S.;OLIVEIRA, P. L.;BARJA-FIDALGO, C.;DAFFRE, S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Exp. Parasitol.**, v.99, n.2, p.66-72. 2001.

PEREIRA, L. S.;SILVA, P. I., JR.;MIRANDA, M. T.;ALMEIDA, I. C.;NAOKI, H.;KONNO, K.;DAFFRE, S. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.352, n.4, p.953-9. 2007.

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

RAVINDRANATH, M. H. The hemocytes of a scorpion *Palamnaeus swammerdami*. **J. Morphol.**, v.144, n.1, p.1-10. 1974.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia. **Mem. Inst. Butantan**, v.20, p.315-28. 1947.

SHERMAN, R. G. Ultrastructurally different hemocytes in a spider. **Can. J. Zool.**, v.51, p.1155-60. 1973.

SHERMAN, R. G. Chelicerates. In: Ratcliffe, N. A. *et al.* (Ed.). **Invertebrates Blood Cell: Arthropods to urochordates, invertebrates and vertebrates compared**. London: Academic Press, 1981. p.355-83.

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

SILVA JR, P. I. **Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da**

aranha *Acanthoscurria gomesiana*. 104 p. (Doutorado). Departamento de Parasitologia, ICB, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SILVA JR, P. I.;DAFFRE, S.;BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.43, p.33464-70. 2000.

SODERHALL, K.;SMITH, V. J. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Dev. Comp. Immunol.**, v.7, n.2, p.229-39. 1983.

SOLON, E.;GUPTA, A. P.;GAUGLER, R. Signal transduction during exocytosis in *Limulus polyphemus* granulocytes. **Dev. Comp. Immunol.**, v.20, n.5, p.307-21. 1996.

SOUZA, A.;BEVILACQUA, V.;PASTERNAK, J.;MIRANDA, A.;DAFFRE, S.;MAGALHÃES, V. **Strong in vitro activity of Gomesin against multiresistant bacteria.** ANNUAL INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 44., Washington, DC. 2004. F-1930 p.

THEOPOLD, U.;SCHMIDT, O.;SODERHALL, K.;DUSHAY, M. S. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. **Trends Immunol.**, v.25, n.6, p.289-94. 2004.

TOH, Y.;MIZUTANI, A.;TOKUNAGA, F.;MUTA, T.;IWANAGA, S. Morphology of the Granular Hemocytes of the Japanese Horseshoe-Crab *Tachypleus tridentatus* and Immunocytochemical Localization of Clotting Factors and Antimicrobial Substances. **Cell Tissue Res.**, v.266, n.1, p.137-47. 1991.

UNDERHILL, D. M.;OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu. Rev. Immunol.**, v.20, p.825-52. 2002.

VARLAMOV, O.;FRICKER, L. D. The C-terminal region of carboxypeptidase E involved in membrane binding is distinct from the region involved with intracellular routing. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.11, p.6077-83. 1996.

WANG, R.;LIANG, Z.;HAL, M.;SODERHALL, K. A transglutaminase involved in the coagulation system of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Tissue localisation and cDNA cloning. **Fish Shellfish Immunol.**, v.11, n.7, p.623-37. 2001.

YAN, L.;ADAMS, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.4, p.2059-66. 1998.

YANG, D.;CHEN, Q.;CHERTOV, O.;OPPENHEIM, J. J. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. **J. Leukoc. Biol.**, v.68, n.1, p.9-14. 2000.

ZANETTI, M.;GENNARO, R.;SCOCCHI, M.;SKERLAVAJ, B. Structure and biology of cathelicidins. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.479, p.203-18. 2000.

ZHU, S. Y.;LI, W. X.;JIANG, D. H.;ZENG, X. C. Evidence for the existence of insect defensin-like peptide in scorpion venom. **Lubmb. Life**, v.50, n.1, p.57-61. 2000.

ANEXO – Publicações

LORENZINI, D. M.; FUKUZAWA, A. H.; SILVA, P. I., JR.; MACHADO-SANTELLI, G.; BIJOVSKY, A. T.; DAFFRE, S. Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Insect Biochem Mol Biol**, v.33, n.10, p.1011-6. 2003.

Abstract

Gomesin is a cationic antimicrobial peptide of 18 amino acid residues isolated from the hemocytes of unchallenged tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. This paper reports the first study of the processing and cellular location of an antimicrobial peptide (MUNDERLOH *et al.*) in spiders. Gomesin cDNA sequence analysis indicated that it is processed from a precursor containing a signal peptide (23 amino acid residues) and a negative C-terminal region (43 amino acid residues). The gomesin gene was constitutively transcribed in hemocytes and the gene product localised in hemocyte granules. The constitutive production of gomesin by a spider is discussed in the context of an ancient mechanism of AMP regulation and storage.

FUKUZAWA, A. H.; VELLUTINI, B. C.; LORENZINI, D. M.; SILVA, P. I., JR.; MORTARA, R. A. ; DA SILVA, J. M. C.; DAFFRE, S. The role of hemocytes on the immunity of spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Dev. Comp. Immunol.**, *In press*.

Abstract

Invertebrates protect themselves against microbial infection through cellular and humoral immune defenses. Since the available information on the immune system of spiders is scarce, the main goal of the present study was to investigate the role of hemocytes and antimicrobial peptides (AMPs) on defense against microbes of spider *Acanthoscurria gomesiana*. We previously described the purification and characterization of two AMPs from the hemocytes of naïve spider *A. gomesiana*, gomesin and acanthoscurrin. Here we show that 57% of the hemocytes store both gomesin and

acanthoscurrin, either in the same or in different granules. Progoresin labeling in hemocyte granules indicates that goresin is addressed to those organelles as a propeptide. *In vivo* and *in vitro* experiments showed that lipopolysaccharide (LPS) and yeast caused the hemocytes to migrate. Once they have reached the infection site, hemocytes may secrete coagulation cascade components and AMPs to cell-free hemolymph. Furthermore, our results suggest that phagocytosis is not the major defense mechanism activated after microbial challenge. Therefore, the main reactions involved in the spider immune defense might be coagulation and AMP secretion.

ESTEVEZ, E.; LARA, F. A.; LORENZINI, D. M.; COSTA, G. H. N.; FUKUZAWA, A. H.; PRESSINOTTI, L. N.; DA SILVA, J. M. C.; FERRO, J. A.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, Submetido.

Abstract

We propose that a culture of embryonic cells (BME26) from the cattle tick *Rhipicephalus boophilus microplus* can be used for analyzing the immunological interactions of vector with tick borne pathogens. In this work we showed that these cells present glycogen inclusions, numerous mitochondria and vesicles with heterogeneous electron densities dispersed through the cytoplasm. Moreover, the lipid contents and uptake of palladium meso-porphyrin (Pd-mP) and rhodamine-hemoglobin by these vesicles suggest that their involvement in the autophagic and endocytic pathways. Interestingly these cells display immune functions, such as phagocytosis and expression of two antimicrobial peptides coding genes (microplusin and defensin). One cDNA library was constructed and 898 unique sequences were obtained. Among them, 556 sequences did not reveal a significant degree of similarity to any sequences from public databases. The automatic functional annotation on Gene Ontology revealed several transcripts related to the several functional classes. Among them, we identified some transcripts involved in immune response such as ferritin, serine proteases, proteases

inhibitors, antimicrobial peptides, heat shock protein, glutathione S-transferase, peroxidase, and NADPH oxidase. In addition a method for transfecting BME26 cells with exogenous nucleic acid (plasmid carrying the *Sleeping Beauty* transposase and its transposon containing the DsRed2 gene) was also investigated.