ELISA CHAPARRO AGUIRRE

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE INATA EM QUILÓPODES
(SCOLOPENDROMORPHA, MYRIAPODA).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT, Para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Pedro Ismael da Silva Junior

Versão Original

São Paulo
2017

RESUMO

Aguirre, EC. Estudo da Resposta imune inata em quilópodes (Scolopendromorpha, Myriapoda). [Tese de Doutorado (Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Os peptídeos antimicrobianos são elementos fundamentais do Sistema Imune Inato (SII), já que eles ajudam a combater patógenos e fornecem informações sobre o SII e seu funcionamento. Os peptídeos também podem ser uma nova alternativa na luta contra doenças infecciosas. Dentro dos artrópodes, um grupo se destaca devido à falta de estudos dos seus mecanismos de defesa: Os miriápodes. Na medicina tradicional oriental e na medicina alternativa da Latino América, o extrato do corpo das centopeias é conhecido pelas suas diversas propriedades de cura. De fato, atualmente, as centopeias são o animal mais consumido nestas práticas. O objetivo deste trabalho é caracterizar os componentes e as reações que constituem o sistema imune inato dos Miriápodes da ordem Chilopoda. Para isto, analisamos o transcriptoma dos hemócitos de adultos não estimulados de *Scolopendra subspinipes subspinipes*. Também extraímos, purificamos por cromatografia líquida de alta eficiência e caracterizamos por espectrometria de massa os peptídeos antimicrobianos presentes na exúvia, no extrato total e na hemolinfa de *S. s. subspinipes* e *S. viridicornis*. Finalmente, foi comparado o extrato total de espécimes adultos e jovens de *S. s. subspinipes* para avaliar a produção de moléculas bioativas em diferentes estágios do desenvolvimento do animal. Várias frações apresentando atividade antimicrobiana foram isoladas e purificadas do plasma e dos hemócitos. Além disso, dois peptídeos antimicrobianos novos foram caracterizados e sintetizados. Um deles, nomeado Pinipesina, isolado da exúvia de *S. s. subspinipes*, apresentou uma estrutura primária com onze amino ácidos (VAEARQGSFSY), um peso molecular de 1214.3 Da e apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positiva e Gram negativa assim como também contra leveduras e fungos. O segundo peptídeo, nomeado Lacraina, foi isolado do extrato total de *S. viridicornis*, apresentou uma estrutura primária de oito amino ácidos (RYPAVGYT), um peso molecular de 925,5 Da, e uma atividade antimicrobiana específica contra bactérias Gram negativas. A análise preliminar do transcriptoma apresentou que os “contigs” relacionados ao SII foram transcritos com mais frequência moléculas com atividade regulatória (33,7%) e de reconhecimento (11,6%), e as relacionadas a cascata de coagulação (21,4%), indicando a importância desta resposta humoral nestes animais. A comparação entre espécimes adultos e jovens mostrou a presença de diferentes peptídeos em cada grupo, sugerindo uma diferenciação durante o crescimento do ISS nestes animais. Uma análise mais completa do transcriptoma e das moléculas bioativas é apresentado.

Palavras chave: Centípede. Peptídeo Antimicrobiano. Sistema Imune. Transcriptoma.

ABSTRACT

Aguirre, EC. Study of the innate immune response in Chilopoda (Scolopendromorpha, Myriapoda). [PhD thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Bioactive peptides are significant elements of the innate immune system (IIS). Not only because they help fight pathogens, but also provide information about the IIS and its functioning. Peptides also could be an enthralling new alternative of defense (in the fight) against infectious diseases. Within arthropods, a group draws especial attention because there is a lack of studies on their defense mechanisms: the Myriapods. In the Traditional Eastern and Latin American alternative Medicine, the centipedes body extract is known for its widespread healing properties. In fact, currently, the centipedes are the most consumed animals in these historic practices. This study aims to characterize the components and reactions that constitute the innate immune system of Myriapods from the Chilopoda Order. To accomplish this, we analyzed the hemocytes transcriptome from *Scolopendra subspinipes subspinipes* non-stimulated adults. We also extracted, purified, by high performance liquid chromatography, and characterized by mass spectrometry the bioactive peptides presents in the exuviae, in the body extract and in the hemolymph from *S. s. subspinipes* and *S. viridicornis*. Furthermore, we compare the body extract of adults and young specimens of *S. s. subspinipes* to evaluate the production of antimicrobial molecules in different stages of the animal development. Several fractions showing antimicrobial activity from the plasma and the hemocytes were isolated and purified. In addition, two new antimicrobial peptides were characterized and synthesized. One of them, named Pinipessin, was isolated from the exuviae of *S. s. subspinipes*, presented a primary structure of eleven amino acids (VAEARQGSFSY) a molecular weight of 1214.3 Da, displayed activity against the Gram-positive and Gram-negative bacteria, as against yeast. The second one, named Lacrain, isolated from the body extract of *S. viridicornis*, presented a primary structure of eight amino acids (RYPAVGYT) a molecular weight of 925.5 Da,. As well, presented specific activity against Gram-negative bacteria. The preliminary analysis from the transcriptome indicate that the “contigs” related to the IIS were transcribed more frequently, [molecules with regulatory (33,7%) and recognition (11,6%) activities, and those involved in the coagulation cascade (21,4%)] indicating the importance of this humoral response in these animals. The comparison between adults and the young specimens, show different peptides present in each group that was analyzed,. This suggests / suggesting a differentiation during the growth in the ISS of these animals. A more complete analysis of the transcriptome and the bioactive molecules will be furtherly presented.

Keywords: Centipede. Antimicrobial Peptides. Immune system. Transcriptome.

1 INTRODUÇÃO

Os artrópodes são um grupo muito bem sucedido, estimando-se que cheguem a alcançar mais de um milhão de espécies, distribuídas em todos os ecossistemas. Esta ampla distribuição é atribuída à sua grande capacidade adaptativa, reprodutiva e de defesa contra os predadores (Ruppert, Barnes, 2005). Estes animais surgiram no início do Cambriano sofrendo poucas alterações durante a evolução. No entanto, estão bem adaptados a ambientes com alta presença de microrganismos e parasitas patogênicos. Tais características sugerem que uma das razões do sucesso deste filo seja a capacidade de se defender contra esses patógenos, possuindo um eficiente sistema imunológico (Ruppert, Barnes, 2005; Basset, et al, 2012).

O sistema imunológico nos vertebrados está composto por dois tipos de respostas: a inata e a adaptativa. Nesta última, a presença de memória imunológica e de imunoglobulinas marca a principal diferença com a resposta de defesa dos invertebrados, nos quais a ausência destas moléculas, altamente específicas contra invasores, se traduz em uma resposta pouco específica, similar à resposta inata dos vertebrados. (Cerenius, Soderhall, 2004).

Nos artrópodes, após o rompimento da cutícula e invasão de microrganismos, o sistema de defesa é ativado mediante fatores presentes na hemolinfa, que é composta por hemócitos (células) e pelo plasma (rico em proteínas, carboidratos, ácidos graxos, íons e hormônios). Assim, a resposta de defesa consiste em reações celulares (fagocitose, encapsulação e formação de nódulos) e reações humorais (cascatas de coagulação e melanização) além da produção de peptídeos antimicrobianos (PAMs) e de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (Harumi, 2007).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são elementos fundamentais do sistema imunológico que ajudam a combater as invasões dos microrganismos patogênicos. O conhecimento sobre estas moléculas pode fornecer informações sobre o sistema imune e o funcionamento do mesmo, assim como também pode auxiliar na busca de novas alternativas na luta contra doenças infecciosas.

O estudo, isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos em diferentes organismos têm aumentado nos últimos anos. Em artrópodes, foi possível conseguir avanços neste campo, principalmente no estudo de insetos (Bulet et al., 1999; Haine et al., 2008) e de aracnídeos como escorpiões (Ehret-Sabatier et al., 1996), aranhas (Silva Jr, 2000; Riciluca et al., 2012), carrapatos (Fogaça et al., 2006) e opiliões (Sayegh et al., 2011). Entretanto, dentre os artrópodes,

um grupo se destaca devido ao aumento no estudo dos seus peptídeos antimicrobianos, a pesar da falta de estudo dos seus mecanismos de defesa: Os Miriápodes.

Os miriápodes são artrópodes terrestres que apareceram no começo do Siluriano, há 420 milhões de anos. Estão divididos em quatro classes: Chilopoda (Centopéias), Diplopoda (Piolhos-de-cobra), Pauropoda e Symphyla (Ruppert, Barnes, 2005). Apresentam o corpo articulado em vários segmentos, não sendo possível observar uma diferenciação clara entre o abdome e o tórax. Atualmente estão descritas aproximadamente 17.000 espécies.

Entre os miriápodes, Diplopoda e Chilopoda são os grupos mais conhecidos. A classe Chilopoda está dividida em cinco ordens: Geophilomorpha, Scolopendromorpha, Lithobiomorpha, Scutigermorpha e Craterostigmomorpha. Até o momento foram descritas aproximadamente 3.300 espécies de quilópodes, mas calcula-se que este número possa chegar a 4.300 espécies (Minelli et al., 2012). No Brasil, até o presente, já foram descritas aproximadamente 150 espécies (Amazonas Chagas Jr, comunicação pessoal).

As centopéias, tendem a apresentar atividade noturna e se encontram em lugares escuros e úmidos como: cavernas, embaixo de pedras, troncos caídos, folhiço, etc. Os quilópodes se caracterizam por ter um par de pernas por segmento, variando o número segundo as ordens. Se alimentam de pequenos artrópodes, nos quais, quando predados, sofrem injeção de veneno produzido nas glândulas localizadas no primeiro segmento de patas modificadas (as forcípulas).

As espécies da ordem Scolopendromorpha encontram-se frequentemente em regiões tropicais e subtropicais. Desta ordem foram descritas 250 espécies para a região Neotropical, das quais 75 espécies são brasileiras e 8 são encontradas no estado de São Paulo (Minelli et al., 2012).

Nesta ordem encontramos as *Scolopendras*, que vivem em ambientes com uma alta incidência de microrganismo patogênicos. Xylander (2009) trabalhou com este grupo e detectou na hemolinfa a presença de substâncias com atividade antibacteriana, mas não purificou nem caracterizou essas moléculas.

Nos últimos anos, vários peptídeos antimicrobianos tem sido caracterizados nos quilópodes. Em 2016 Chaparro e colaboradores, conseguiram caracterizar o primeiro peptídeo antimicrobiano isolado da extrato total da centopéia brasileira *Scolopendra viridicornis*: a Lacraina. Na *S. subspinipes mutilans* (uma espécie muito utilizada na medicina tradicional oriental) a Escolopendrina I (Wenhua et al., 2006) e a Escolopina I e II (Kanfu et al., 2010), foram os primeiros peptídeos com propriedades antimicrobianas achados no veneno destes animais.

Até agora, poucos trabalhos sobre a defesa imunológica dos quilópodes foram realizados. Xilander no 2009 apresentou um trabalho com a descrição morfológica dos hemócitos e com uma pequena alusão sobre o papel destes numa resposta imunológica (Xilander, 2009).

Por tudo isto o estudo do sistema imune de espécies de quilópodes se fazem tão interessantes.

1.1 Sistema Imune dos Invertebrados

Nos invertebrados, a primeira linha de defesa contra a invasão de agentes patogênicos são as barreiras físicas como a cutícula. Após esta ser rompida, diferentes mecanismos são acionados com o intuito de reconhecer os agentes invasores, para assim poder neutralizá-los e eliminá-los.

A resposta imune do organismo é coordenada pela ação combinada de vários tipos de hemócitos, que fagocitarão ou encapsularão o agente invasor, e de diversos fatores humorais, que disparam cascatas proteolíticas para conseguir a coagulação ou melanização do microrganismo (Lamberty et al., 2001). Este mecanismo de defesa é conhecido como imunidade inata e é o menos derivado dos mecanismos, sendo conservado até a atualidade, estando presente em todos os animais (Hancock, Brown, Mookherjee, 2006).

No sistema imune dos invertebrados, a ausência de imunidade adaptativa é a principal diferença quando comparado com o sistema dos vertebrados. Isto significa, que não se observa uma resposta específica contra os patógenos (atribuída às imunoglobulinas), nem memória imunológica (Hoffman, 2003). Este mecanismo é considerado evolutivamente como o mais derivado ao surgir pela primeira vez em peixes mandibulados há aproximadamente 450 milhões de anos (Hoffman, 2004).

No entanto, no subfilo hexápoda, tem sido descrito algum nível de especificidade na resposta imune após uma segunda exposição ao patógeno (Kurtz, Franz, 2003; Little, Hultmark, Read, 2005; Sadd, Schimdt-Hempel, 2006). Um exemplo disto é a função de moléculas da superfamília das Imunoglobulinas Gs que atuam suprimindo a ausência de moléculas que promovem a memória imunológica. (Watson et al., 2005). Isto mostra um maior desenvolvimento na resposta imune deste grupo de animais quando comparado com os outros subfilos dos Artrópodes.

Na aranha *Acanthoscurria rondoniae* (Theraphosidae), foi isolada a Rondonina, um peptídeo com atividade antifúngica que poderia representar uma nova via no sistema imune inato em

invertebrados, onde moléculas grandes como a hemocianina, podem gerar fragmentos com atividade antimicrobiana, constituindo-se em uma primeira barreira após a ruptura da cutícula e invasão de microrganismos (Riciluca et al., 2012). Isto já foi observado também em camarões e em lagostins, de onde foram isolados peptídeos antimicrobianos do plasma derivados da hemocianina (Destoumieux –Garzon et al., 2001; Lee et al., 2003).

A resposta inata esta composta por diferentes reações (celulares e humorais) que ocorrem quase simultaneamente (Hoffman et al., 2004). A primeira resposta de defesa se baseia na migração de células de reconhecimento ao local onde ocorreu a invasão. Assim que o microrganismo e o tamanho da infecção são identificados, ocorre uma resposta imune celular, na qual os hemócitos (células presentes na hemolinfa) fagocitam, encapsulam ou formam nódulos para conter o agente invasor (Strand, Pech, 1995; Irving et al., 2005; Strand, 2008). Ocorre também a ativação das cascatas proteolíticas: a de profenoloxidase, (que resulta na melanização dos nódulos), e a da coagulação, (que contém a infecção mediante a formação de um coágulo). Ao mesmo tempo a produção rápida de PAMs, ajuda na aniquilação do patógeno. Estas duas últimas respostas são consideradas a imunidade humoral. (Hoffmann A., 1995; Blandin, Levashina, 2004; Cornelis, Soderhall, 2004; Theopold et al., 2004; Strand, 2008).

1.1.1 Hemocitos

Como já foi mencionado, a resposta celular da imunidade inata dos invertebrados, é principalmente mediada pelas células presentes na hemolinfa destes animais, conhecidos como hemocitos (Strand, 2008). Estas células são derivadas dos pró-hemócitos (células jovens que aparecem na parede do coração, nos estágios mais novos do desenvolvimento do organismo, dando origem aos hemócitos) os quais dependendo das suas características morfológicas, histoquímicas e funcionais vão se diferenciar em três tipos de células: os granulócitos, os plasmátocitos e os cianócitos (Strand, 2008).

A fagocitose e o encapsulamento, duas das funções imunológicas mais importantes, são controladas principalmente pelos hemócitos (**Figura 1**). Estas células também tem um papel fundamental na regulação e reconhecimento de microrganismos invasores, assim como no fechamento da ruptura da cutícula para evitar a perda de hemolinfa (Lavine e Strand, 2002).

Figura 1- Hemócitos presentes no sistema imune e suas funções. Adaptado de: Nentwing, 2013.

Os granulócitos (GRs) são encontrados principalmente no citoplasma e constituem mais do 50% dos hemócitos achados na hemolinfa dos artrópodes. Possuem os fatores que induzem a coagulação e sua função nos invertebrados seria equivalente a dos linfócitos B e T nos vertebrados (Gupta, 1986; Fukuzawa et al., 2008).

O outro tipo celular de grande importância no sistema imune dos artrópodes são os plasmócitos (PLs), que teriam o mesmo papel das células natural killers nos vertebrados. Estas células encontram-se em grandes quantidades na hemolinfa dos artrópodes (Gupta, 1986).

Na aranha *Acanthoscurria gomesiana* (Theraphosidae) foi demonstrado em experimentos *in vivo* e *in vitro* que os hemócitos são atraídos quimicamente por LPS ou leveduras, provocando a degranulação das células (Fukuzawa et al., 2008).

Os invertebrados apresentam então, uma grande variedade de moléculas capazes de lisar os microrganismos, unir suas paredes celulares aglutinando-os e, assim, favorecer a fagocitose por meio de moléculas líticas e antimicrobianas (Abbas, Lichtman, 2005). Estas moléculas podem ser produzidas de duas maneiras diferentes: constitutivamente (como nos aracnídeos) ou após estímulo (como nos insetos).

Em miriápodes, um estudo realizado por Xilander em 1990 com os diplópodes *Rhapidostreptus virgator* e *Chicobolus* sp. e com os quilópodes *Lithobius forficatus* e *Scolopendra* sp. mostrou que quando comparadas as duas classes, os quilópodes apresentam maior dependência da resposta imune celular enquanto os diplópodes apresentaram uma menor presença de hemócitos na hemolinfa (Xilander, Nevermann, 1990). Ao comparar a resposta imune dos miriápodes com a dos insetos, utilizando *Manduca sexta* (Lepidoptera) como modelo animal, foi observado uma menor capacidade de coagulação, de substâncias antimicrobianas menos eficientes e processo de encapsulação lento por parte dos miriápodes (Xilander, 1990). Também foi observada a presença de moléculas bioativas após o animal ser desafiado por um microrganismo, como também sem ter recebido o dito estímulo. Estas moléculas são diferentes entre si (Chaparro, 2011).

1.1.2 Fagocitose e Exocitose

A fagocitose é uma resposta celular altamente conservada durante a evolução, ocorrendo em muitos protozoários e em todos os metazoários e é a primeira resposta dos hemócitos contra pequenos invasores (Jiravanichpaisal et al., 2006).

Após o reconhecimento do microrganismo pelas moléculas do sistema de defesa, as diferentes reações intracelulares são ativadas, para posterior eliminação do organismo invasor.

A fagocitose, nos invertebrados, é iniciada quando uma molécula de reconhecimento se liga a um receptor da célula fagocítica, levando a formação do fagossomo e na ingestão do microrganismo invasor, através de uma via dependente da polimerização de actina. Uma vez no fagossomo, o microrganismo é eliminado através de moléculas tais como os PAMs e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Lavine, Strand, 2002).

Os hemócitos também podem combater os invasores através da secreção dos PAMs. A presença de LPS vai ativar um receptor ligado à proteína G. Após este ser ativado, a fosfolipase C produz 1,4,5 –Inositol trifosfato (IP₃) e diaciglicerol, gerando o aumento do cálcio intracelular levando a exocitose dos grânulos (Solon et al., 1996). Nos limúlídeos, foi observado que tanto os PAMs como os componentes da cascata de coagulação são secretados via exocitose (Iwanaga, Lee, 2005).

1.1.3 Nodulação e Encapsulação

A nodulação e a encapsulação fazem parte da resposta celular encarregada de defender o animal contra patógenos muito grandes e que não podem ser contidos na fagocitose.

A nodulação refere-se a agregados de hemócitos, os quais podem capturar um grande número de bactérias extracelularmente. Os nódulos podem se aderir aos tecidos e eventualmente, podem ser encapsulados e posteriormente eliminados no momento da ecdise (Jiravanichpaisal et al., 2006).

A encapsulação se dá quando é necessária uma ligação de hemócitos para conter invasores de grande tamanho, como parasitas ou nematoides. Diferente da fagocitose, a encapsulação resulta na formação de uma cápsula de várias camadas de hemócitos ao redor do invasor. Este processo ocorre simultaneamente com a ativação da cascata de fenoloxidase, o que vai resultar no escurecimento da cápsula devido à melanização, onde o parasita é morto por hipóxia (Nappi et al., 2005).

1.1.4 Cascata de Coagulação e de Fenoloxidase

As cascatas de coagulação e de fenoloxidase, são uma parte fundamental da imunidade dos invertebrados, onde as respostas humorais e celulares se sobrepõem envolvendo uma combinação de fatores celulares e proteolíticos (Theopold et al., 2004).

Quando o sistema imune dos artrópodes é ativado, os hemócitos se organizam formando cápsulas ou nódulos ao redor do microrganismo invasor, após isto duas respostas humorais podem ser ativadas: a cascata de Fenoloxidase ou de coagulação, para que os nódulos sejam melanizados/coagulados e eliminados por hipóxia ou por ação de substâncias tóxicas liberadas (Cerenius, Soderhall, 1998, 2004).

A cascata da coagulação e da Fenoloxidase são ativadas pelo contato de proteínas de membrana liberadas no plasma, como lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram-negativas ou β -1,3-glucano das leveduras. O resultado final destas reações é a produção da coagulina a partir de coagulogênio, na cascata da coagulação (Ulrich et al., 2004), e de melanina originada de quinonas,

na cascata da fenoloxidase (Cerenius, Soderhall, 2004). Ambas têm papel fundamental no aprisionamento dos microrganismos nos nódulos e evitam a perda de hemolinfa após rompimento da cutícula.

1.1.5 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

As moléculas com atividade antimicrobiana nos artrópodes podem ser produzidas constitutivamente ou após a indução por infecção, rompimento da cutícula ou estímulo inflamatório (Jenssen; Hamill; Hancock, 2006).

Dois dos primeiros peptídeos antimicrobianos caracterizados em quelicerados foram isolados dos hemócitos do limulideo não estimulado *Tachypleus tridentatus*. Estes peptídeos conhecidos como Taquiplesina e Poliphemusina apresentam atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, assim como contra fungos (Miyata et al., 1989).

Em escorpiões da espécie *Androctonus australis* foram encontrados dois PAMs na hemolinfa de animais não desafiados: a butinina e a androctonina. O primeiro apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas enquanto o segundo possui atividade contra bactérias e fungos (Ehret-Sabatier et al., 1996).

A gomesina é um peptídeo antimicrobiano constitutivamente expresso nos hemócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana* (Silva jr; Daffre; Bua, 2000), sendo liberado no lugar da infecção após o animal ser desafiado (Fukuzawa et al., 2008). Nesta mesma espécie foi separada outra molécula com atividade contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*: a Migalina, uma acilpoliamina que também está presente nos hemócitos desta aranha, mesmo sem um estímulo prévio (Pereira et al., 2007).

Da hemolinfa do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* não estimulado, foram isolados e caracterizados dois PAMs: a microplusina (no plasma) e uma defensina presente na hemolinfa (Fogaça et al., 2004).

Nesse contexto, acredita-se que os PAMs e as moléculas bioativas nos quelicerados são constitutivamente expressos na hemolinfa, sendo liberados no plasma após o animal ser desafiado por microrganismos. Charlet e colaboradores em 1996 sugeriram que a presença de moléculas

antimicrobianas expressas constitutivamente nos invertebrados é um mecanismo imune primitivo quando comparado com o sistema de indução de produção de PAMs presentes nos invertebrados superiores. Considerando que a origem dos insetos há 390 milhões de anos foi posterior a dos quelicerados há 445 milhões de anos (Ruppert, Barnes, 2005), a hipótese de que o sistema imune dos insetos é mais derivado do que dos quelicerados torna-se plausível, uma vez que neles encontramos vários organismos que necessitam de um estímulo para produzir as substâncias antimicrobianas. Estas desaparecem aproximadamente três semanas depois do desafio e são produzidas novamente ao receber um novo estímulo (Bulet et al., 1999).

O principal órgão produtor de PAMs nos insetos holometábolos é o corpo gorduroso e sua síntese é induzida poucas h após a infecção, sendo liberadas posteriormente na hemolinfa (Lamberty et al., 2001).

No entanto, nos hemimetábolos, a produção destas moléculas é realizada nos hemócitos (Bulet, Stocklin, 2005). Em estudos com térmitas, *Pseudacanthotermes spiniger* (Isoptera), foram encontrados PAMs constitutivamente expressos (Lamberty et al., 2001), sugerindo uma resposta imune similar a observada em quelicerados, sendo esta menos derivada do que a presente em insetos holometábolos.

A informação acerca do sistema imune em insetos é baseada principalmente nos estudos realizados na mosca *Drosophila melanogaster*. Após a injúria, a produção de PAMs e moléculas bioativas pode ser induzida por dois mecanismos. O primeiro é mediado pelo receptor transmembranaral *Toll* que ativa fatores de transcrição para a síntese de peptídeos ativos contra microrganismos, após o reconhecimento de componentes da parede bacteriana de bactérias Gram-positivas ou da membrana plasmática de leveduras (Ferrandon et al., 2007). O segundo é a via de deficiência imune (IMD) desencadeada pelas proteínas presentes na membrana das bactérias Gram-negativas. Os produtos deste mecanismo são homólogos ou altamente similares aos precursores da cascata da sinalização do receptor do fator necrótico tumoral (TNF) em mamíferos (Hoffman, 2004).

Em miriápodes já foi descrita a presença de substâncias antimicrobianas que estão constitutivamente expressas na hemolinfa como também moléculas específicas que são induzidas após infecção ou injúria (Xilander, 1990, 2009). Estas últimas chegam a sua máxima atividade de

3 a 5 dias após a injúria, o que é considerado lento quando comparado com insetos, que alcançam o seu máximo entre 6 a 24 h depois do estímulo.

Nas centopeias, o veneno e o pó do extrato total têm sido amplamente estudados resultando na caracterização de diferentes peptídeos bioativos (You et al., 2004; Kanfu et al., 2010; Kong et al., 2013).

Os peptídeos antimicrobianos de origem animal possuem características estruturais diversas. Na sua maioria são peptídeos catiônicos (com elevado pI), compostos por 9 a 100 resíduos de aminoácidos, não tendo tamanho superior a 10 kDa. São de natureza anfipática, podendo ser lineares ou cíclicos (De Simone et al., 2002; Brogden, 2005). São classificados em cinco grupos principais dependendo da sua estrutura primária e secundária (**Tabela 1**). Apesar do fato da maioria dos PAMs serem catiônicos, alguns são aniônicos, como a microplusina, um peptídeo com atividade contra a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (Fogaça et al., 2004).

Tabela 1- Características estruturais das principais classes de peptídeos catiônicos.

Fonte: De Simone et al., 2002.

Classe	Estrutura	Fonte
Lineares com estrutura β	2-3 β o 2-3 enlaces Cys (defensinas, thioninas, protegrinas, polifemusinas).	Plantas, insetos, crustáceos, serpentes, células de mamíferos (Neutrófilos, plaquetas, macrófagos, células de Paneth), laringe, traquéia e intestino.
Lineares com hélice α	Hélices anfipáticas freqüentemente com torção no meio.	Insetos, anfíbios, crustáceos, mamíferos e bactérias.
Lineares com ombros	Hélice de Poli-Pro Tipo II	Neutrófilos bovinos e insetos.
Cíclicos com Loops	Estrutura cíclica covalente que pode apresentar uma ou mais pontes de SH.	Neutrófilos bovinos, bactérias e serpentes.
Derivados de grandes peptídeos com função desconhecida	Complexa e apresenta ponte de SH.	Plantas

O mecanismo de ação dos peptídeos se dá através do aumento da permeabilidade da membrana plasmática, o que provocaria o extravasamento do conteúdo celular ao interferir no empacotamento dos fosfolipídios, inviabilizando a sobrevivência do animal (Andreu e Ribas, 1998).

Os peptídeos são primeiramente atraídos para a superfície da membrana do microrganismo por meio das interações eletrostáticas entre as cargas negativas da superfície da membrana do patógeno e as positivas dos peptídeos (Huang, 2000). Após a ligação do peptídeo na membrana, o aumento na permeabilidade da membrana plasmática é explicado por três modos de ação diferentes (**Figura 2**) pelos quais os peptídeos interferem no arranjo fosfolipídico da membrana (Brogden, 2005):

- **Modelo Carpete.** A desestruturação da membrana plasmática ocorre quando os peptídeos ficam orientados horizontalmente cobrindo a bicamada lipídica formando sobre esta um “tapete” que pode levar à formação de micelas.

- **Modelo Barril-estável.** O poro é formado somente pelos peptídeos, os quais alinham sua fração hidrofóbica com as caudas dos fosfolipídios da membrana, deixando no interior da membrana a porção hidrofílica.

- **Modelo do Poro Toroidal.** O lúmen do poro é formado pela cabeça polar dos fosfolipídios (os quais foram induzidos para adotar uma curvatura mais positiva) e pela porção hidrofílica do peptídeo. A porção hidrofóbica forma o “interior” do poro.

Figura 2- Mecanismos da ação peptídica em interação com a membrana plasmática.

Após o peptídeo entrar se ligar na membrana plasmática, eles podem desnaturar a membrana de três maneiras diferentes: modelo barril estável (esquerda), modelo poro Toroidal (centro) ou modelo carpete (direita). *Adaptado de: Brogden, 2005.*

Até o momento, já foram descritos peptídeos com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos (leveduras e filamentosos), vírus e parasitas. Outro elemento importante com relação à atividade dos PAMs é que os mesmos podem ser divididos em citotóxicos (atividade contra hemáceas de mamíferos) e não citotóxicos (Shai, 2002).

A ação dos peptídeos pode se apresentar em diferentes compartimentos celulares e, por isso, esses compostos são considerados fundamentais nos estudos para o desenvolvimento de drogas importantes contra patógenos resistentes aos antibióticos que existem atualmente.

1.2 Centopeias nas Medicinas Tradicionais

Na China e Coréia é comum encontrar pessoas que praticam a “medicina científica” e a Medicina Tradicional Oriental (MTO). Existem clínicas com doutores especializados em medicina tradicional, prescrevendo medicamentos baseados em diferentes plantas, artrópodes e vertebrados (Pemberton, 1999).

Esta medicina tem sido utilizada cada vez mais no ocidente. Estudos mostram que nos Estados Unidos mais de 40% da população utiliza ou esteve em contato em algum momento da sua vida com a MTO (Kesler et al., 2001) e acredita-se que este dado tende a aumentar nos próximos anos. Esta tradição apresenta dois benefícios: o primeiro é que possui milhares de anos de experimentação, pois se conhecem registros de 1610 a.C. (Pemberton, 1999); o segundo é que estas práticas ainda estão vigentes, bem como sua utilização está crescendo por mostrarem bons resultados.

Dentre os medicamentos baseados em artrópodes da MTO, os prescritos com maior frequência provêm de quilópodes (centopéias) (**Figura 3**), como por exemplo, de *Scolopendra subspinipes mutilans*, da qual se utiliza o pó obtido do corpo seco para o tratamento de dores reumáticas, gripes, convulsões e prevenção do câncer. A sua capacidade de absorção de água pode prevenir e tratar a tuberculose fungo-bacteriana e a micoses de pele (Pemberton, 1999; Yoon 2006).

Figura 3- Centopeias a venda nos mercados de medicina tradicional.

A. Medicamento para a tosse, feitas com centopeias secas vendidas na Tailândia. *Fonte: Ingrid Booz Morejohn, 2013.* B e C. Venda de Centopeias e outros invertebrados no mercado de agricultores em Singapura. *Fonte: Xing Fu, 2017.*

Na prática popular, a escolopendra viva é fervida em água, colocada para secar ao sol e depois moída sem a cabeça e o último segmento. O pó obtido é utilizado para fazer chá ou óleos para tratar as diferentes doenças supracitadas.

Devido à grande importância destes animais na MTO, a análise das moléculas do corpo das lacraias tem levado ao isolamento de várias moléculas com propriedades bioativas como a centipedina (Kim et al., 1998), uma molécula com atividade antibiótica; a escolonase, uma serino protease de 25 kDa com atividade fibrinolítica (You et al., 2004), e finalmente o jineol, uma quinolina alcalóide com atividade antioxidante e altamente citotóxica contra células tumorais (Moon et al., 1996; Yoon et al., 2006).

Na medicina tradicional oriental, acredita-se que vários quilópodes têm a propriedade de reduzir os sintomas da degeneração do sistema nervoso central, como por exemplo, a perda da memória. Ren et al. (2006) trabalharam com o efeito da *Scolopendra subspinipes mutilans* na doença de Alzheimer, obtendo uma melhora dos pacientes com um aumento na função cognitiva. Eles atribuíram este resultado aos ácidos graxos achados no corpo da lacraia, os quais apresentaram atividade quelante que resulta numa inibição da acetilcolinesterase, enzima encarregada da degradação da acetilcolina.

Um dos maiores problemas da utilização dos medicamentos da MTO foi descrito por Yuen et al. (2006). Eles concluíram que um dos principais efeitos colaterais destes medicamentos (incluindo o pó de escolopendra) é a alta taxa de hepatotoxicidade e a perda da função do fígado. Isto foi observado em pacientes submetidos a este tratamento por cerca de seis meses a um ano, resultando em alguns casos que necessitaram de transplante de fígado e/ou outros que vieram ao óbito. Por esta razão a análise dos princípios ativos e o mecanismo de ação destes medicamentos tornam-se fundamental.

Dentro desse contexto, com o objetivo de entender melhor o sistema de defesa dos miriápodes contra os patógenos, o presente trabalho se propôs a isolar e caracterizar moléculas com atividade antibiótica presentes na hemolinfa e no extrato total dos quilópodes *Scolopendra viridicornis* e *Scolopendra subspinipes subspinipes*, bem como estudar o transcriptoma dos hemócitos para conhecer mais do sistema imune destes animais

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados resultados que podem contribuir para o conhecimento do sistema imune dos quilópodes e miriápodes. Além de fornecer a caracterização de dois novos peptídeos antimicrobianos: A Lacraina e a Pinipesina.

No análise do transcriptoma da hemolinfa de *S. subpinipes* foi observado que a grande maioria dos “contigs” obtidos não apresentaram nenhuma similaridade com as proteínas já descritas nos bancos de dados com os que foram comparados. O que demonstra a necessidade deste tipo de estudos devido a pouca informação existente até agora sobre este grupo taxonômico.

Também na análise do transcriptoma, os “contigs” que apresentavam relação com o sistema imunológico e suas respostas (celular ou humoral), foi observada uma maior expressão de transcritos com funções de regulação e de reconhecimento. A importância de uma alta eficiência imunológica esta claramente relacionada à capacidade do animal de reconhecer os patógenos invasores e conseguir regular as respostas celulares e humorais com uma alta eficiência.

Ainda nos dados obtidos no transcriptoma, foi observada uma expressão significativamente maior de “contigs” relacionados à cascata de coagulação, quando comparado com a expressão obtida para a cascata de fenoloxidase. O que pode significar que no sistema imune dos quilópodes, a coagulação apresenta um papel mais importante do que a melanização, assim já como tem sido descrito nos quelicerados (Cerenius, Söderhall, 2004).

A presença de proteínas e peptídeos antimicrobianos sem a necessidade de um estímulo pode indicar que estas moléculas se encontram de maneira constitutiva nestes animais assim como tem sido observado em outros artrópodes. Foi observada uma sequência com uma alta similaridade com os peptídeos antimicrobianos Gomesina e Tachiplesina evidenciando a importância deste tipo de peptídeos na imunidade inata destes artrópodes.

Na análise do extrato ácido da ecdise de *S. s. subpinipes* foi caracterizado um novo peptídeo com um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo ativo contra bactérias Gram-Positivas, Gram-negativas, Fungos e Leveduras. A Pinipesina e um peptídeo com uma massa molécula de 1214,3 Da e cuja estrutura primária apresentou 11 resíduos de aminoácidos (VAEARQGSFSY).

Descrevemos um novo peptídeo antimicrobiano extraído do corpo do quilópode brasileiro *Scolopendra viridicornis* que exibe atividade antibacteriana específica contra bactérias Gram-negativas. A Lacraina é um peptídeo composto apenas por oito resíduos de aminoácidos (RYPAVGYT) e com uma massa molecular de 925,5 Da. Devido ao seu pequeno tamanho, a Lacraina pode ser sintetizada rapidamente e não apresenta atividade citotóxica contra eritrócitos humanos. A Lacraina pode representar um novo alvo para o desenvolvimento de novos antibióticos. A análise adicional da atividade do peptídeo sintético contra alvos como vírus e células cancerígenas, por exemplo, é necessária para determinar o biopotencial desta molécula. Vale ressaltar que esta nova molécula é o primeiro peptídeo descrito a partir do extrato corporal de um miriápode com atividade antimicrobiana.

Na comparação da produção de moléculas bioativas entre adultos e juvenis Foi observado ao comparar as diferentes bioatividades, que os adultos apresentaram uma maior quantidade de moléculas com atividade antimicrobiana que os juvenis. Deste análise foram obtidas as estruturas primarias dos oito peptídeos que apresentaram atividade antimicrobiana.

Estes resultados sobre a imunidade inata nos quilópodes podem ser um bom começo para o esclarecimento do funcionamento do sistema de defesa dos quilópodes, abrindo novos caminhos e perspectivas para continuar com o seu estudo.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman-Pober AH, Jordan S. Cellular and molecular immunology. 6th Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2005. 572 p.

Albiol Matanic VC, Castilla V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 23:382–9.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990; 215:403-10.

Andreu, D.; Rivas, L. Antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*. 1998; 47(6): 415-33.

Ayroza G, Ferreira ILC, Sayegh RSR, Tashima AK, da Silva PI Jr. Juruin: an antifungal peptide from the venom of the Amazonian Pink Toe spider, *Avicularia juruensis*, which contains the inhibitory cysteine knot motif. *Front Microbiol*. 2012;3:324.

Basset Y, et al. Arthropod diversity in a tropical forest, *Science*. 2012; 338: 1481-84.

Blandin S, Levashina EA. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Mol Immunol*. 2004;40(12):903-8.

Breckenridge L, Gorini L. Genetic analysis of streptomycin resistance in *Escherichia coli*. *Genetics* 1970;65:9–25.

Brogden KA. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?. *Nature*. 2005; 3: 238-50.

Bulet P, Stocklin R, Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Peptide Lett*. 2005; 12(1): 3-11.

Bulet P; Hetru C; Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial Peptides in Insects; Structure and Function Dev Comp Immunol. 1999 ; 23 (4-5): 329-44.

Cantú MD, Carrilho E; Wulff NA, Palma MS. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. Química Nova. 2008; 31: 669-75.

Cerenius L, Söderhöl K. Role of prophenoloxidase – activating system in Invertebrate immunity. Curr Opin Immunol. 1998; 10: 23-28.

Cerenius L, Söderhöl K. The prophenoloxidase – activating system in invertebrates. Immunol Rev. 2004; 198: 116-26.

Chaparro E, da Silva Junior PI. Lacrain: The first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis*. J Antimicrob Agents. 2016; 48: 277-85.

Chaparro E. Moléculas Bioativas em Quilópodes. 2011. 120 f. Dissertação de Mestrado em Ciências- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetru C, Hoffmann JA, Bulet P. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. J Biol Chem 1996; 271(36): 21808-813.

Cornelis L, Soderhall K. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. Immunol Rev. 2004; 198: 116-26.

Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS, Nakajima, T. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. The Bioch J. 2001; 359: 35-45.

De Simone SG, Souza ALA. Peptídeos microbicidas: uma alternativa viável para a terapia antimicrobiana. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasil. 2002 ; 24: 12-16.

Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, Bachere E. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J Biol Chem*. 2001; 276(50) : 47070-077.

Dunn CW. et al. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*. 2008; 452: 745–49.

Ehret-Sabatier L. et al. Characterization of Novel Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood. *J Biol Chem*. 1996 ; 271(47) : 29537–544.

Falick AM, Hines WM, Medzihradszky KF, Baldwin MA, Gibson BW. Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1993; 4(11): 882-93.

Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(11): 862-74.

Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Prot Res*. 1990; 35: 161-214.

Fogaça AC et al. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides*. 2006; 27: 667-74.

Fogaça AC, et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev Comp Immunol*. 2004; 28(3): 191-200.

Fukuzawa AH, et al. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev Comp Immunol*. 2008; 32(6): 716-25.

Gao Y, et al. Whole transcriptome analysis provides insights into molecular mechanisms for molting in *Litopenaeus vannamei*. *PLoS One*. 2015; 10(12), e0144350.

Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 3784-88.

Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol.*, **2**, 1-33.

Grabherr MG et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(7): 644-52.

Gupta AP. Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods. New York: Wiley-Interscience Publications, 1986. 535 p.

Haine ER, Moret Y, Siva-Jothy MT, Rolff J. Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects. *Science.* 2008 ; 322(5905) : 1257- 59.

Hancock RE, Brown KL, Mookherjee N. Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology.* 2006 ; 211(4) : 315-22.

Hao G, Shi YH, Tang YL, Le GW. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. *Peptides.* 2009; 30(8): 1421-7.

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

Hoffmann JA. Primitive immune systems. *Immunol Rev.* 2004 ; 198(1) : 5-9.

Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature.* 2003 ; 426(6962) : 33-38.

Huang HW. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry.* 2000; 39(29): 8347-52.

Imler JL, Bulet P. Antimicrobial Peptides in *Drosophila*: Structures, Activities and Gene Regulation. *Chem Immunol and Allergy*. 2005; 86: 1-21.

Irving P et al. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol*. 2005; 7(3): 335-50.

Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol*. 2005; 38(2): 128-50.

Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(3): 491-511.

Jiravanichpaisal P, Lee BL, Oderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 2006; 211: 213–36.

Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem*. 1970; 34: 595-98.

Kanfu P et al. Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. *Toxicon*. 2010 ; 55 : 274-79.

Kesler RC et al. Long-term trends in the use of complementary and alternative medical therapies in the unites states. *Complement Altern Med*. 2001; 135: 262-68.

Kim K, Kim H, Park K, Cho K. Structural Characterization of a New Antibiotic Substance Purified from *Scolopendra Subspinipes Mutilans* L. Koch. *J Korean Chem Soc*. 1998; 42(2): 236-39.

Kong Y, Huang SL, Shao Y, Li S, Wei JF. Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J Ethnopharmacol*. 2013; 145: 182–6.

Kuhn-Nentwig L, Müller J, Schaller J, Walz A, Margitta DM, Nentwig W. Cupiennin 1, a New Family of Highly Basic Antimicrobial Peptides in the Venom of the Spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). The J. of Biolog. Chem. 2002; 277: 11208-16.

Kurtz J, Franz K. Evidence of memory in invertebrates immunity. Nature. 2003; 425: 37-8.

Lamberty M, et al. Insect Immunity, Constitutive Expression of a Cysteine-Rich Antifungal and a Linear Antibacterial Peptide in a Termite Insect. J Biol Chem. 2001 ; 276(6): 4085–92.

Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol. 2002; 32(10): 1295-1309.

Lee SY, Lee BL, Söderhäll K. Processing of an Antibacterial Peptide from Hemocyanin of the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J Biol Chem. 2003 ; 278(10) : 7927-33.

Little TJ, Hultmark D, Read AF. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. Nat Immunol. 2005; 6(7): 651-4.

Lorenzini DM, da Silva PI Jr, Soares MB, Arruda P, Setubal J, Daffre S. Discovery of immune-related genes expressed in hemocytes of the tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. Dev Comp Immunol. 2006; 30(6): 545-56.

Mars-Brisbin M, McElroy AE, Pales-Espinosa E, Allam B. Antimicrobial activity in the cuticle of the American lobster, *Homarus americanus*. Fish Shellfish Immunol. 2015; 44: 542-46.

Martin L, Ivancich A, Vita C, Formaggio F, Toniolo C. Solid phase synthesis of peptides containing the spin-labeled 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid. J Pep Res. 2001; 58: 424-32.

Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. J Am Chem Soc. 1963; 14: 2149–154.

Minelli A, Bonato L, Dioguardi R, et al. Chilobase: a web resource for Chilopoda taxonomy. 2012 onwards.

Miyata T, et al. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. J Biochem. 1989; 106(4): 663-8.

Moon SS, et al. Jineol, a cytotoxic alkaloid from the centipede *Scolopendra subspinipes*. J Nat Prod. 1996; 59(8), 777-79.

Moore AJ, BeazleyWD, BibbyMC, Devine DA. Antimicrobial activity of cecropins. J Antimicrob Chemother 1996; 37: 1077-89.

Nagai T, Kawabata S. A link between blood coagulation and prophenoloxidase activation in arthropod host defense. J Biol Chem. 2000; 275: 29264-267.

Nagai T, Osaki T, Kawabata S. Functional conversion hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. 2001; J Biol Chem. 276: 27166-170.

Nappi AJ, Christensen BM. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. Insect Biochem Mol Biol. 2005;35(5): 443-59.

Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y. Nitric oxide involvement in Drosophila immunity. Nitric Oxide Biol Chem. 2000; 4: 423-30.

Nentwig KL. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. Cell Mol Life Sci. 2003; 60: 2651-68.

Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends Biotechnol. 2011; 29: 464-72.

O'Driscoll NH, et al. Production and evaluation of an antimicrobial peptide-containing wafer formulation for topical application. *Curr Microbiol.* 2013; 66: 271–8.

Pemberton RW. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 1999; 65: 207-16.

Pereira LS, et al. Structural and biological characterization of one antibacterial aclypolyamine isolated from the hemocytes of the spider *acanthocurria gomesiana*. *Biochem and Biophysical Res Comm.* 2007; 352: 953–59.

Regier JC, et al. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature.* 2010; 463: 1079-83.

Ren Y, Houghton P, Hider RC. Relevant activities of extracts and constituents of animals used in traditional Chinese medicine for central nervous system effects associated with Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol.* 2006; 58: 989-96.

Riciluca KCT, et al. Rondonin: an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Results Immunol*, 2012; 2: 66-71

Roepstorff P, Fohlman J. Letter to the editors. *Biol Mass Spectrom.* 1984; 11(11): 601.

Ruppert EE; Barnes RD. *Zoologia dos invertebrados*. 6a ed. São Paulo : Editora Roca ; 2006. 1029 p.

Sadd BM, Schimdt-Hempel P. Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Curr Biol.* 2006; 16(12): 1206-10.

Sayegh RSR. Purificação e caracterização de Peptídeos Antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae;Opiliones) [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Seidler J, Zinn N, Boehm ME, Lehmann WD. De novo sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics.* 2010; 10(4): 634-49.

Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2002; 66(4): 236-48.

Silva Jr PI, Daffre S, Bulet P. Isolation and full characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J Biochem Chem*. 2000 ; 275 ; 33464-70.

Söerhäll K, Smith VJ. Separation of the hemocyte opulation of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Develop Comp Immunol*. 1983; 7(2): 229-339.

Solon E, Gupta AP, Gaugler R. Signal transduction during exocytosis in *Limulus polyphemus* granulocytes. *Dev Comp Immunol*. 1996; 20(5): 307-21.

Strand MR, Pech LL. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Ann Rev Entomol*. 1995; 40: 31-56.

Strand MR. The insect cellular immune response. *Insect Sci*. 2008; 15: 01-14.

Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS. Coagulation in arthropods, defense, wound closure and healing. *Trends Immunol*. 2004; 25(6): 289-94.

Turillazzi, S., et al. Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-Ion Trap. *J Am. Soc Mass Spectrom*. 2006; 17: 376-83.

Ulrich, T.; Schimdt, O.; Söderhäll, K.; Dushay, M. S. Coagulation in arthropods: defense, wound closure and healing. *Trends Immunol*. 2004; 25(6): 289-93.

Watson FL, Püttmann-Holgado R, Thomas F, Lamar DL, Hughes M, Kondo M, Rebel VI, Schumucker D. Extensive Diversity of Ig-Superfamily Proteins in the Immune System of Insects. *Science*. 2005; 309: 1874-78.

Wenhua R, Shuangquan Z, Daxiang S, Kaiya Z, Guang Y. Induction, purification and characterization of an antibacterial peptide scolopendrin I from the venom of centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. Indian J Biochem Biophys. 2006 ; 43 : 88-93.

Xylander W, Nevermann L. Antibacterial Activity in the Hemolymph of Myriapods (Arthropoda). J of Invert. 1990; 56: 206-14.

Xylander W. Hemocytes in Myriapoda(Arthropoda) : A review. Research Report, Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz, Görlitz, Germany. 2009; 114-24.

Yang B. et al. Analysis of gene expression in the midgut of *Bombyx mori* during the larval molting stage. BMC Genomics. 2016; 17: 866.

Yoon MA, et al. Antioxidant effects of quinoline alkaloids and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from *Scolopendra subspinipes*. Biol Pharm Bull. 2006; 29(4): 735-39.

You WK. et al. Purification and Molecular Cloning of a Novel Serine Protease from the Centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. Insect Biochem Mol Biol. 2004; 34:239-50.

Yuen MF. et al. Traditional Chinese Medicine Causing Hepatotoxicity in Patients with Chronic Hepatitis B Infection: a 1- Year Prospective Study. Aliment Pharmacol Ther. 2006; 24: 1179-86.